

MUSEUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2015

N°attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Biologie et génétique des microalgues

Présentée et soutenue publiquement par

Adrien Bussard

Le 01 octobre 2015

Capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales

Sous la direction de : Monsieur Lopez, Pascal Jean, Chargé de Recherche CNRS

JURY :

M. Lopez, Pascal Jean

Chargé de recherche, CNRS

Directeur de Thèse

M. Cock, Mark

Directeur de recherche, CNRS

Rapporteur

M. Sabbe, Koen

Professeur, université de Ghent

Rapporteur

M. Moreau, Hervé

Directeur de recherche, CNRS

Examineur

M. Meziane, Tarik

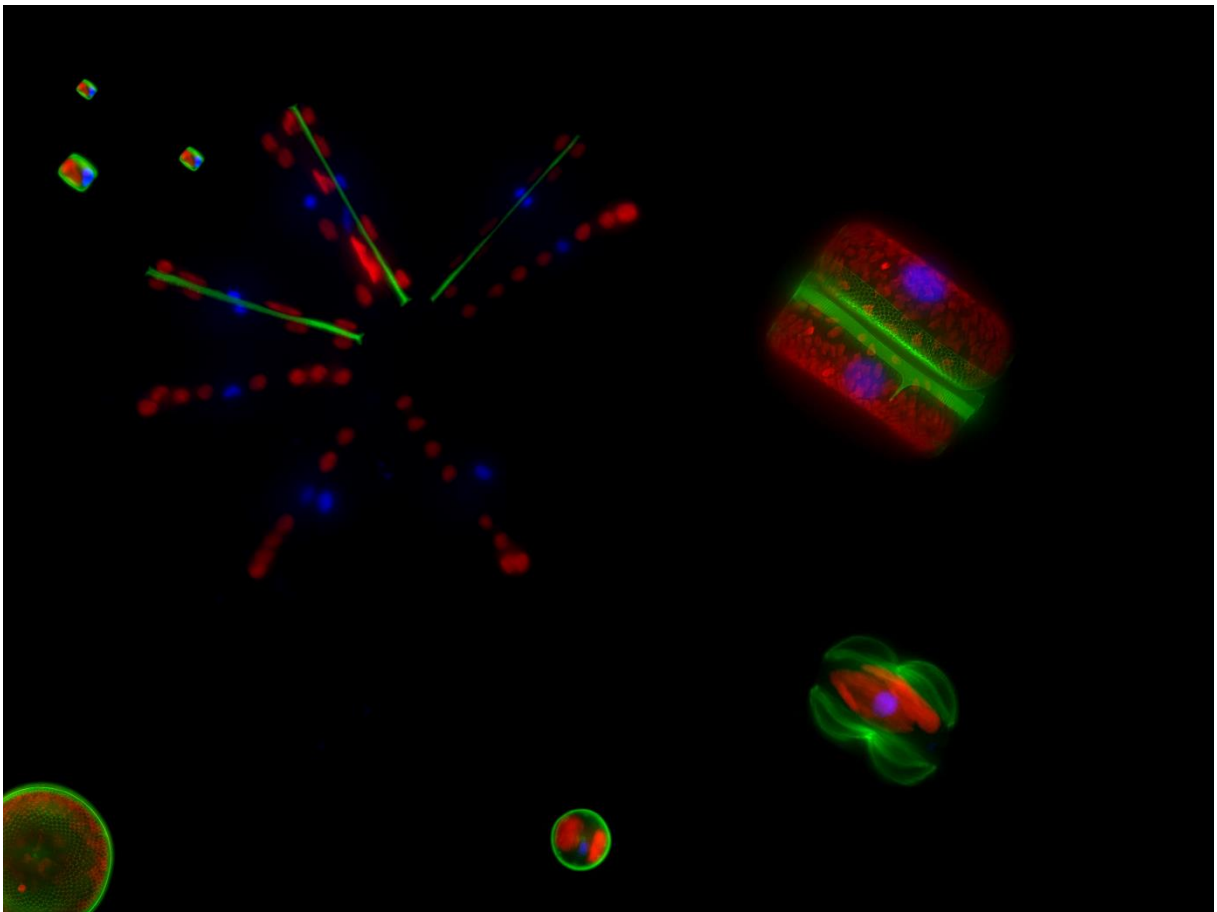
Professeur, MNHN

Examineur

A ma famille et mes amis,

Donnez-moi une vésicule organique douée de vitalité, et je vous rendrai le monde organisé

Raspail, 1833



Remerciements

C'est avec émotion que je suis en train d'écrire les dernières lignes de ce manuscrit qui résume trois années de doctorat, trois années au cours desquelles des moments de doute ont côtoyé de nombreux moments de joie. J'ai vécu ce doctorat comme un enrichissement personnel et professionnel considérable qui m'a fait beaucoup évoluer. Cependant, cette aventure n'aurait pas été possible sans l'aide amicale, professionnelle, technique ou morale de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Mark Cock, Koen Sabbe, Hervé Moreau et Tarik Meziane qui ont accepté de juger la qualité de ce travail de recherche.

Je remercie Pascal Jean Lopez, qui m'a permis de découvrir le monde fabuleux des diatomées et de me donner l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant. Je remercie également tous les membres de l'équipe, Jaison, Jérôme Fournier, Gilles Luquet et Sophie Berland et l'ensemble des stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer ou d'aider. Je tiens à remercier tout particulièrement Michèle et William, les stagiaires les plus bavards au monde mais également les plus attachants qui sont devenus aujourd'hui de réels amis.

Je tiens également à apporter tous mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, Hervé Moreau, Pascal Claquin et Francois Robert, qui ont accepté de suivre avec intérêt l'évolution annuelle de mon projet de recherche. J'ai senti un réel investissement de leur part pour mon projet qu'ils n'ont pas hésité à enrichir grâce à leurs questions, leurs remarques et leurs conseils pertinents.

J'ai pu réaliser l'ensemble de ces analyses grâce à de nombreux collaborateurs que je tiens vraiment à remercier pour leur professionnalisme et leur disponibilité :

Evelyne Duvernois-Berthet, Erwan Corre et Laurent Jourden pour toute la partie bioinformatique. J'aimerais apporter un remerciement spécial pour Evelyne qui, malgré mes nombreuses sollicitations (parfois stupides il faut l'avouer), m'a toujours aidé avec le sourire (je compte aussi les smileys dans les échanges d'email) ;

Cédric Hubas pour m'avoir aidé dans les analyses multivariées toujours dans la bonne humeur ;

Julien Derr et Patricia Wills pour le développement de scripts d'analyse d'images ;

Bernard Hugueny pour son aide et ses conseils dans le traitement de données ;

Chakib Djediat pour m'avoir formé à la microscopie électronique à transmission et m'avoir renommé Johnny, à chacun de mes passages à la plateforme ;

Jerôme Sueur qui, grâce à ses formations de qualité sous R, m'a permis de donner une autre dimension à certaines analyses. J'ai réussi à "dompter" R, du moins en partis, malgré des débuts (plus que) difficiles ;

Les membres de l'institut de Formation Doctorale de l'UPMC qui fournissent un travail remarquable et efficace pour la formation des doctorants.

Au cours de ma troisième année, j'ai eu l'opportunité d'effectuer une mission doctorale de "Doctorant-Conseil" dans la Valorisation au sein de la SATT LUTECH. J'aimerais remercier Isabelle Coquilleau de m'avoir accepté dans son département et Fabienne Billiard pour m'avoir encadré et appris les "ficelles" de la valorisation. Tous les membres de l'équipe m'ont parfaitement intégré et je tiens à les en remercier. Mon seul regret : ne pas avoir réussi à sortir à temps lors de l'Escape Game !

Je tiens à remercier chaleureusement Paule Biaudet, membre de l'IFD de l'UPMC, qui m'a personnellement aidé à développer mon projet professionnel. Ce projet ne serait pas ce qu'il est sans son aide, ses conseils pertinents et son implication remarquable dans les moments importants. Je l'associe grandement à la réussite de ce projet de recherche et à mon avenir professionnel. Merci !

Pour terminer, car on garde toujours le meilleur pour la fin, j'aimerais remercier ma famille, mes amis et celle qui partage ma vie :

Merci à ma famille pour m'avoir soutenu dans mes choix et surtout accepté de m'entendre parler régulièrement d'une chose, quelque peu étrange, appelée "diatomée". Après octobre, promis j'arrête ! Je tiens tout particulièrement à remercier ma super maman qui a accepté de relire toute ma thèse de nombreuses fois. Si je suis malade le jour de la soutenance, je suis persuadé qu'elle peut me remplacer ;

Merci à tous mes amis, Matthieu (qui a contribué grandement à la qualité de cette thèse), Nicolas (maître phôck), Gaëtan (shallot), Yanouk, Sébastien, Michèle, Maud, Pandy (manfifle #1), Tòmas (manfifle #2), Fabien, William, Salomé, Carole, Jaison, Sarah (X3), Maxime, Adrien, Karine, Gâelle, Mélissa, Aymeric et tous les autres pour avoir été là de près ou de loin ;

Merci à la plus belle, Agathe, pour me supporter et surtout de faire de moi l'Homme le plus heureux du monde au quotidien.

Avant-propos

Ce manuscrit de thèse résume trois années de recherche effectuées sur les capacités d'acclimatation des diatomées au sein de l'équipe "*Evolutions des biominéralisations et adaptations aux contraintes environnementales*" de l'UMR BOREA 7208 CNRS-MNHN-IRD-UPMC-UCBN-UAG et de mes deux mois de mission scientifique à Taiwan au sein du *National Taiwan Ocean University* dans le laboratoire *Algae Research Center* de Keelung.

Ce manuscrit de thèse présente une analyse bibliographique, les méthodes d'analyses et quatre chapitres présentant les résultats et les conclusions de chaque étude. Les chapitres II et III seront présentés en anglais sous forme d'article et les chapitres I et IV en français sous forme classique d'un chapitre de thèse.

Pour faciliter la lecture, un encadré gris de quelques lignes présente les informations, les résultats et les interprétations essentiels à la fin de chaque partie.

Sommaire

Remerciements	1
Avant-propos	5
Sommaire	7
Etat de l'art et objectifs de la thèse	13
A. Origine, évolution et rôle des diatomées.....	14
1. Apparition des diatomées : fossile et datation moléculaire	14
2. L'histoire évolutive des diatomées : clés de leur réussite ?.....	15
3. Diatomées et cycles biogéochimiques.....	18
4. Diversité taxonomique	23
B. Diatomée : description, reproduction et mode de vie.....	26
1. Le frustule siliceux	26
2. Cycle de vie des diatomées.....	31
3. Chloroplaste, photosynthèse et acquisition du carbone.....	34
4. Autres caractéristiques des diatomées	42
5. Variétés des modes de vie.....	45
C. Acclimatation des diatomées aux fluctuations environnementales	53
1. Impact des variations de pH sur les diatomées	53
2. Impact des variations de salinité sur les diatomées	59
D. Le genre <i>Thalassiosira</i> dans l'étude des diatomées	67
1. L'ordre <i>Thalassiosirales</i> : évolution et intérêt.....	67
2. Le genre <i>Thalassiosira</i> : diversité et écologie	71
3. Les <i>Thalassiosira</i> : modèle d'étude pour la biominéralisation	72
4. Apport de la génomique chez les <i>Thalassiosira</i>	76
5. Intérêt du modèle <i>Thalassiosira weissflogii</i>	79
E. Objectifs du projet de recherche.....	81
Méthodes d'analyses	85
A. Conditions de culture	86
B. Analyses physiologiques.....	86

1.	<i>Mesure du temps de génération des cellules</i>	86
2.	<i>Extraction et caractérisation pigmentaire</i>	87
3.	<i>Mesure fluorimétrique des paramètres photosynthétiques</i>	89
4.	<i>Mesure de l'incorporation du carbone</i>	90
5.	<i>Dosage des différentes fractions du métabolisme du carbone</i>	91
6.	<i>Mesure in vivo du pH cytosolique</i>	92
7.	<i>Tentative de mesure in vivo du pH vacuolaire</i>	95
8.	<i>Dosage du silicium intracellulaire et biogénique</i>	95
C.	Analyses morphologiques	97
1.	<i>Purification et observation au microscope électronique des valves</i>	97
2.	<i>Morphométrie des frustules des différentes diatomées</i>	97
3.	<i>Analyse in vivo du processus de biominéralisation</i>	103
D.	Analyses transcriptomiques	104
1.	<i>Extraction et purification des ARN totaux et contrôle qualité</i>	104
2.	<i>Séquencage Illumina et assemblage du transcriptome de novo</i>	104
3.	<i>Analyse de la composition nucléotidique et de l'usage des codons</i>	105
4.	<i>Annotation du transcriptome de novo: Blast2GO et Trinotate</i>	105
5.	<i>Identification des gènes des organelles et des transposons</i>	106
6.	<i>Analyse de paralogie et d'orthologie</i>	107
7.	<i>Analyse RNA-Seq</i>	108
8.	<i>Validation des résultats RNASeq par RT-qPCR</i>	108
	Chapitre I : Un nouveau modèle d'étude du genre <i>Thalassiosira</i>	111
A.	Contexte	112
B.	Protocole expérimental	114
C.	Séquencage et assemblage du transcriptome <i>de novo</i> de <i>T. weissflogii</i>	116
1.	<i>Tests préliminaires et vérifications des librairies</i>	116
2.	<i>Séquencage Solexa/Illumina</i>	117
3.	<i>Assemblage bioinformatique des séquences</i>	118
D.	Analyse complète du transcriptome <i>de novo</i> : caractérisation et comparaison	120
1.	<i>Annotation</i>	120
2.	<i>Composition nucléotidique</i>	122
3.	<i>Paralogie et orthologie : définition des groupes de gènes</i>	123
E.	Discussion et conclusion	125

Chapitre II : Capacité d'acclimatation de la diatomée *T. weissflogii* à un gradient hyposalin.

.....	131
A. Contexte	132
B. Protocole expérimental.....	134
C. Article: Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in acclimation to salinity gradients in diatoms.....	134
1. Abstract	135
2. Introduction	136
3. Material and methods	138
4. Results.....	141
5. Discussion	150
D. Informations Supplémentaires.....	156
1. Supplementary Tables.....	156
2. Supplementary Figures	160
3. Supplementary Methods.....	168

Chapitre III : Les pompes à protons vacuolaires chez les diatomées177

A. Contexte	178
B. Protocole expérimental.....	180
C. Article: Evolution of vacuolar pyrophosphatases and vacuolar H ⁺ -ATPases in diatoms.....	180
1. Abstract	181
2. Introduction	182
3. Material and methods	185
4. Results and Discussion	187
5. Concluding remarks and future directions	194
6. Acknowledgements.....	194

Chapitre IV : Réponse couplée au pH et à la salinité de deux espèces de *Thalassiosira* écologiquement éloignées197

A. Contexte	198
B. Protocole expérimental.....	200
1. Mesure du métabolisme du silicium, purification des valves et extraction ARN.....	200
2. Mesure du pH cytosolique.....	201
3. Tentative de mesure du pH vacuolaire.....	201
4. Cinétique de formation du frustule	202

5.	<i>Analyses statistiques</i>	202
6.	<i>Analyse du transcriptome</i>	202
C.	Résultats	204
1.	<i>T. weissflogii et T. oceanica tolèrent les variations de salinités et pHe</i>	204
2.	<i>Homéostasie du pH cytosolique</i>	206
3.	<i>Tentative de mesure in vivo du pH vacuolaire chez les diatomées</i>	207
4.	<i>Impact différentiel sur le métabolisme du silicium</i>	208
5.	<i>Morphologie du frustule</i>	209
6.	<i>Description de la cinétique du processus de biominéralisation</i>	211
7.	<i>L'effort de transcription des deux souches est différent en fonction des facteurs étudiés</i> ...	214
8.	<i>Analyse fonctionnelle</i>	217
D.	Discussion	220
1.	<i>Le couplage pH/salinité affecte le silicium intracellulaire</i>	220
2.	<i>Homéostasie du pH cytosolique</i>	221
3.	<i>Processus de biominéralisation et morphologie du frustule</i>	222
4.	<i>Réponse différentielle du transcriptome</i>	223
	Discussion et perspectives	229
A.	Evolution des stratégies d'acclimatation	230
1.	<i>Acclimatation et fitness</i>	230
2.	<i>Acclimatation en fonction du temps</i>	231
3.	<i>Stratégies d'acclimatation selon les espèces</i>	235
B.	Cinétique du processus de biominéralisation	236
	Annexes	241
	Abréviations et symboles	249
	Bibliographie	253
	Curriculum vitæ	291
	Summary	295
	Résumé	296

Etat de l'art et objectifs de la thèse

A. Origine, évolution et rôle des diatomées

1. Apparition des diatomées : fossile et datation moléculaire

Les diatomées sont des microalgues brunes unicellulaires qui ont la particularité de présenter un exosquelette siliceux appelé frustule. Grâce à ce biominéral, des traces de diatomées fossiles ont été retrouvées dans des sédiments géologiques anciens. Les premiers fossiles de diatomées retrouvés datent du Jurassique (-190 Ma) avec deux espèces acceptées par la communauté scientifique, du genre *Pyxidicula* (*P. liasica* et *P. bollensis*) (Sims et al 2006). Ces "premières" diatomées ont la particularité de présenter une morphologie assez éloignée des diatomées modernes avec un frustule sous la forme de deux hémisphères bombés appelés "caged ballon" (Figure 1) (Round and Crawford 1981). La

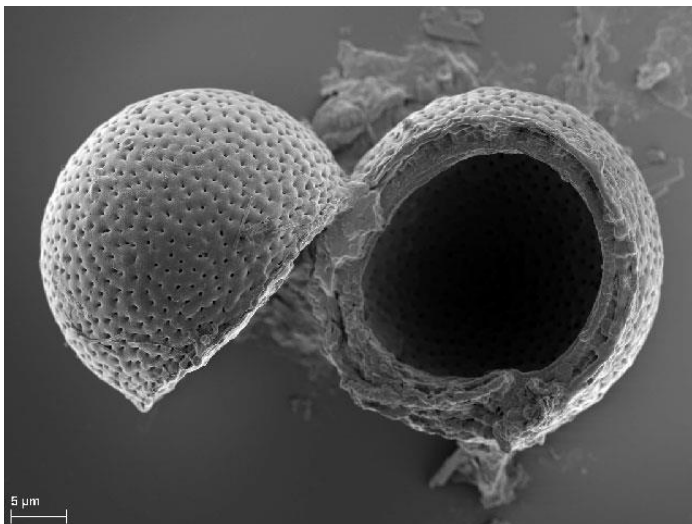


Figure 1: Image en microscopie électronique à balayage (MEB) de *Pyxidicula patens*. Les deux valves ressemblent à des demi-sphères perforées de pores. Image MEB d'Eckard Voelcker.

découverte de gisement datant du Crétacé de terre de diatomée, appelée diatomite et composée majoritairement de frustules, traduit la forte présence de diatomée à cette époque géologique (Kooistra and Medlin 1996). Cependant, l'étude des fossiles est-elle un bon moyen pour dater l'origine des diatomées ? La présence de fossiles ne marquerait-elle pas davantage l'origine de l'apparition des diatomées silicifiantes plutôt que celle du groupe ? Cette théorie est supportée par

des scientifiques comme Round, Crawford ou encore Simonsens qui suggèrent que l'ancêtre commun de l'ensemble des diatomées est une cellule photosynthétique dépourvue d'exosquelette qui serait apparue entre le Protérozoïque et le Jurassique inférieur (650-140 Ma). Cette diatomée "nue" aurait acquis au cours de l'évolution des plaques siliceuses qui se seraient peu à peu différenciées en valves (Round and Crawford 1981). En accord avec cette hypothèse, la diatomée polymorphe *Phaedactylum tricornutum* présente 2 de ses 3 formes qui sont dépourvues d'exosquelette siliceux. La silicification serait donc un processus acquis au sein même du groupe des diatomées étant donné que le groupe sœur, les Bolidophyceae, n'en soit pas pourvu (Guillou et al 1999). Nous verrons au cours de cette analyse

bibliographique que la silicification n'est cependant pas un processus propre aux diatomées et qu'il peut être retrouvé dans plusieurs ordres du vivant (Knoll 2003).

Les analyses génétiques de datation moléculaire basée sur les séquences des ARN ribosomaux convergent vers une origine plus ancienne que celle des premiers fossiles retrouvés, même si la datation exacte reste encore discutée. Ainsi, Medlin et Kooistra (Kooistra and Medlin 1996) suggèrent une origine à -266 Ma (Permien) alors que Philippe et Sorhannus (Philippe et al 1994) tendent à placer cette origine aux alentours de -300 à -400 Ma d'années. Cette différence pourrait s'expliquer par les séquences d'ARN ribosomal ciblées (*ssu* ou *lsu*) et/ou par les modèles d'arbres phylogénétiques utilisés, mais ces deux études proposent bien une origine des diatomées antérieure au Protérozoïque. De façon intéressante, l'hypothétique apparition des diatomées au Permien proposée par Medlin et Kooistra coïnciderait à la crise Permien/Trias. La collision d'un astéroïde ou alors la méga-éruption des trappes Sibériennes aurait abouti à la disparition de 96 % des espèces marines et 70 % des espèces terrestres (Song et al 2013) libérant ainsi de nombreuses niches écologiques dont auraient profité les diatomées.

La colonisation de nombreux écosystèmes aquatiques et la rapide diversification aurait permis aux diatomées d'acquérir des rôles écologiques primordiaux dont certains correspondent à ceux des grands cycles biogéochimiques. Aujourd'hui les diatomées constituent l'une des lignées les plus diverse dans l'ensemble du règne Eucaryote (Alverson et al 2011).

2. L'histoire évolutive des diatomées : clés de leur réussite ?

Plus que les plantes ou bien d'autres organismes photosynthétiques terrestres, les diatomées ont eu une histoire évolutive complexe en relation avec deux processus d'endosymbiose (Armbrust 2009, Parker et al 2008). Pour bien comprendre leur histoire, il faut remonter à l'origine de la photosynthèse oxygénique apparue aux alentours de 2,5 milliards d'années chez les cyanobactéries peu après l'apparition de la vie il y a environ 3,8 milliards d'années (Des Marais 2000).

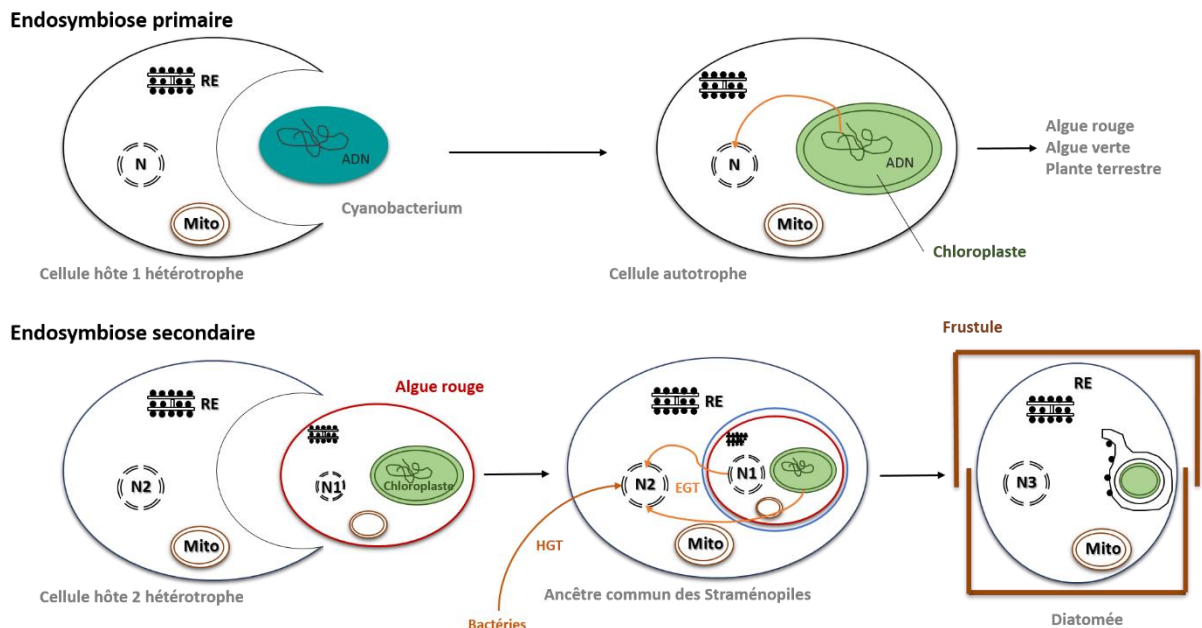


Figure 2 : Processus cellulaires impliqués lors de l'endosymbiose primaire et secondaire. La partie supérieure du schéma illustre le processus d'endosymbiose primaire avec une cyanobactérie. La partie inférieure présente l'une des endosymbioses secondaires ayant conduit à l'apparition des diatomées. Les différentes abréviations sont : *N*, noyau ; *Mito*, mitochondrie ; *RE*, réticulum endoplasmique ; *EGT* : Endosymbiotic Gene Transfer ; *HGT* : Horizontal Gene Transfer. Schéma d'Adrien Bussard

L'appareil photosynthétique, qui permet l'hydrolyse des molécules d'eau libérant ainsi de l'oxygène, des protons et des électrons, a certainement été l'innovation métabolique la plus importante au cours de l'évolution. L'accumulation d'oxygène dans l'atmosphère a conditionné l'apparition de la respiration aérobie qui s'est révélée être l'un des processus biologiques les plus efficaces en terme énergétique (Dismukes et al 2001). Même si le plaste des plantes et des diatomées ont comme origine commune les cyanobactéries, leurs histoires endosymbiotiques divergent (Armbrust 2009). Le premier processus d'endosymbiose aurait eu lieu il y a environ 1,5 milliards d'années lorsque une cellule eucaryote hétérotrophe a "incorporé" une cyanobactérie, appelée "*cyanobacterium*", conduisant à la première cellule eucaryote photosynthétique. Le plaste des plantes terrestres, des algues vertes ainsi que celui des algues rouges dériveraient tous d'un unique événement d'endosymbiose primaire (Figure 2). Cet événement permet d'expliquer l'origine monophylétique de l'ensemble des plastes à l'intérieur des cellules eucaryotes (Gould et al 2008). Même si toute la communauté scientifique s'accorde sur le fait qu'il n'y a eu qu'un phénomène d'endosymbiose primaire, le nombre d'évènements d'endosymbiose secondaire reste encore controversé. En effet des endosymbioses secondaires multiples se seraient produit du fait des différentes combinaisons possibles entre hôtes et symbiontes. Dans la lignée des algues vertes, le séquençage du génome chloroplastique de la chlorarachniophyte *Bigeloviella natans* a apporté des éléments de réponse quant à l'évolution du plaste des différentes algues vertes. Ces algues seraient constituées de deux grandes lignées, les *Euglenids* et les

Chlorarachniophytes, qui dépendent de la cellule eucaryote à la base (respectivement les Trypanosomes *Excavata* et les Cercozoan *Rhizaria*) (Rogers et al 2007). L'évolution des plastes issus de l'endosymbiose des algues rouges reste encore sujette à de nombreuses hypothèses. Ces plastes sont retrouvés chez les cryptomonades, les haptophytes, les dinoflagellés, les straménopiles (contenant les diatomées) et les apicomplexants (parasites pathogènes). De nos jours, deux hypothèses font débats pour essayer de comprendre l'évolution de l'endosymbiose secondaire avec une algue rouge :

L'hypothèse des *Hacrobia* suggère un ancêtre commun des deux grandes lignées algale que sont les haptophytes et les cryptomonades. Cette hypothèse repose en partie sur la présence commune du gène plastidique *rpl36* qui aurait été transféré horizontalement ;

L'hypothèse des *Chromalveolates* propose que tous les plastes à l'origine d'une algue rouge proviennent d'un seul évènement endosymbiotique.

Ces deux hypothèses sont actuellement très discutées et controversées même si, à notre connaissance, aucune autre hypothèse n'a été proposée par la communauté scientifique (Keeling 2010).

En ce qui concerne les diatomées, la nature même de l'algue incorporée lors de l'endosymbiose secondaire il y a 1,4 milliards d'années a elle aussi récemment été discutée (Prihoda et al 2012). En effet, même si les diatomées possèdent une composition pigmentaire spécifique, quatre membranes plastidiales et une composition génomique permettant d'assigner une origine endosymbiotique avec une algue rouge, de nombreux gènes appartenant aux algues vertes ont été retrouvés au sein de leurs génomes nucléaires. Durant les processus endosymbiotiques, de nombreux gènes sont perdus ou transférés du symbiote vers le génome nucléaire de la cellule hôte et sont appelés EGT pour *Endosymbiotic Gene Transfert* (Martin and Herrmann 1998). Ce phénomène de transfert serait directement impliqué dans la réduction de la taille des génomes chloroplastiques. En effet, même si les génomes chloroplastiques ne contiennent qu'une centaine de gènes, le nombre de protéines retrouvées au sein des chloroplastes est estimé entre 2 000 et 5 000. Cette différence importante montre bien la semi-autonomie de cette organelle et la nécessité d'établir une multitude de transferts d'information et de protéines entre le génome nucléaire et le chloroplaste (Prihoda et al 2012). Dans le génome nucléaire des deux premières diatomées séquencées, *Thalassiosira pseudonana* et *Phaeodactylum tricornutum*, 2 533 et 2 423 EGT ont respectivement été identifiés. Des analyses phylogénétiques des protéines correspondantes ont montré que, contre toute attente, plus de 70 % de ces gènes ont une origine d'algue verte remettant en question la nature même de l'endosymbiose secondaire avec une algue rouge (Moustafa et al 2009). Cependant, une autre étude a permis de réévaluer la contribution des algues vertes dans le génome des diatomées et d'attribuer les conclusions de Moustafa *et coll.* à des biais d'échantillonnage et des insuffisances au niveau de la résolution

phylogénétique des arbres. Même si une origine avec une algue verte ne peut pas être exclue, une origine avec une algue rouge serait donc plus probable (Deschamps and Moreira 2012).

Les EGT sont des cas particuliers de transferts horizontaux de gènes (HGT) qui conditionnent fortement l'évolution. Ce type de transfert est un processus par lequel un organisme intègre dans son génome du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans nécessairement partager de relation de descendance (Figure 2). Ce transfert contribuerait de manière importante à l'évolution des génomes des eucaryotes comme ceux des procaryotes (Keeling and Palmer 2008). L'analyse du génome de *P. tricornutum* a permis d'identifier 784 gènes ayant été acquis horizontalement à partir de bactéries de différents types (protéobactérie, cyanobactérie et archée) (Bowler et al 2008). Une fois assimilés dans le génome nucléaire, ces HGT ont permis l'acquisition de nouvelles voies et fonctions métaboliques. Le métabolisme des polyamines, qui est impliqué dans la silicification, certaines enzymes spécialisées dans l'utilisation du carbone organique et de l'azote (glucanase, xylanase,...) et un cycle fonctionnel de l'urée sont parmi les exemples d'acquisitions les plus remarquables. Les diatomées semblent posséder une grande capacité d'acquisition horizontale de nouveaux gènes comparées aux autres eucaryotes et auraient participé grandement à leur évolution génomique et à leur diversification (Chan et al 2012). Ainsi la mixité de leur génome (straménopiles, divers donneurs bactériens, algues rouges et vertes) leur aurait permis d'être écologiquement très compétitives et d'avoir une grande importance pour la biosphère.

3. Diatomées et cycles biogéochimiques

Les diatomées contribuent à plusieurs cycles biogéochimiques dont principalement celui du carbone, de l'azote ou encore du silicium.

a) Cycle du carbone

Avec l'impact des changements globaux, le cycle du carbone semble être celui qui est le plus directement impliqué avec des effets négatifs probables sur de nombreux écosystèmes (Figure 3) (Bauer et al 2013). Malgré le fait que le carbone ne soit pas l'élément majeur en masse sur Terre (~0,2 % du globe terrestre, ~0,19 % sur la croûte terrestre et ~0,0014 % dans l'eau de mer), il a un rôle fonctionnel primordial de par son implication directe comme support de la vie et comme élément régulateur notamment du pH océanique.

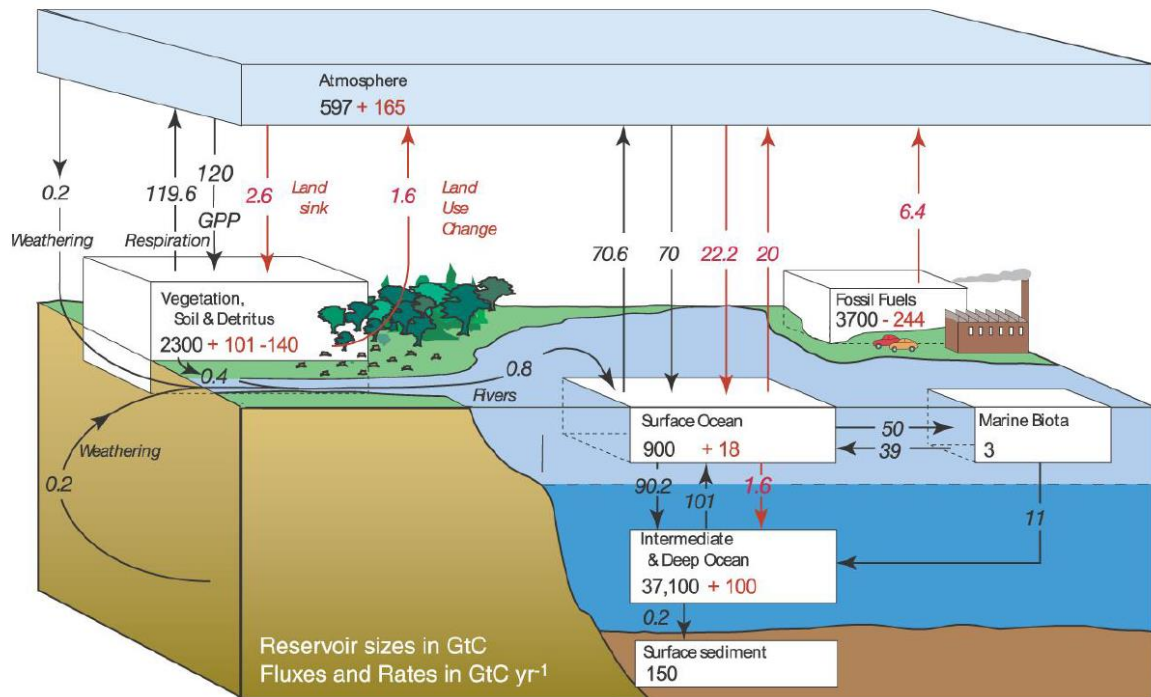


Figure 3 : Estimation des flux de carbone en milliards de tonnes entre les différents réservoirs. Il existe 4 réservoirs de carbone à savoir l'hydrosphère, la lithosphère, la biosphère et l'atmosphère. L'essentiel du cycle se fait entre l'atmosphère, la biosphère et les couches superficielles du sol et des océans. Au niveau de la biosphère, les organismes photosynthétiques fixent le carbone dans la matière organique alors que les organismes hétérotrophes, par fermentation et respiration, dégagent du CO₂. A titre d'exemple, les organismes photosynthétiques marins fixent environ 50 GtC par an les plaçant comme des acteurs importants du cycle du carbone. Les données représentées en rouge sont d'origine anthropique. Schéma et valeurs tirés du 4^{ème} rapport du GIEC (groupe d'expert sur l'évolution du climat, 2007).

Le passage du carbone inorganique sous forme de CO₂ vers une forme organique est réalisé par la photosynthèse oxygénique et constitue ce que l'on appelle la production primaire. Cette production est nécessaire à tous les écosystèmes aussi bien terrestres qu'aquatiques. Etant donné que la surface océanique représente 70 % de la surface du globe et que les diatomées dominent majoritairement cet écosystème, on estime que ces microalgues représentent environ 35 à 40 % de la productivité primaire océanique (Armbrust 2009). Ainsi, les diatomées seraient responsables de près de 20 à 25 % de la productivité primaire Terrestre. Contrairement à ce que la majorité des gens pensent, les forêts tropicales ou encore les savanes ont une productivité moins importante que celle des diatomées qui constituent le "poumon terrestre" le plus efficace (Field et al 1998). Cette productivité primaire passe par une photosynthèse efficace qui permet la formation de carbone organique. Ce carbone organique, sous forme de carbohydrates ou de lipides, peut être utilisé par le zooplancton puis les chaînes trophiques supérieures. Les particules organiques en suspension, issues des matières fécales ou des polysaccharides excrétés par les diatomées qui sédimentent vers le fond des océans, pourront être

réutilisés par d'autres organismes hétérotrophes. La fixation phytoplanctonique du carbone et son transport vertical, est communément appelé "*pompe biologique*" des océans (Volk and Hoffert 2013). Même si ce chiffre est soumis à de nombreuses incertitudes, cette pompe biologique est estimée à $0,83 \text{ PmolC.an}^{-1}$ (10 GtC.an^{-1}) (Boyd and Trull 2007). L'exportation de carbone organique dans les zones disphotiques permet de fournir du carbone organique aux organismes méso et bathypélagiques et une infime partie, de l'ordre de 1 %, atteint les sédiments profonds. Cette infime proportion sera séquestrée dans le sédiment sans être dégradée et participera à la formation des carbones fossiles. Les diatomées ont donc un rôle important dans l'utilisation du carbone inorganique et l'exportation verticale de carbone organique biosynthétisé qui conditionne de nombreux autres écosystèmes.

b) Le cycle de l'azote

L'azote est le quatrième élément le plus abondant sur Terre et possède un cycle biogéochimique important qui interconnecte de nombreux autres grands cycles comme celui du carbone précédemment exposé. Malgré sa faible concentration dans les écosystèmes aquatiques, cet élément est néanmoins primordial au développement de la vie et à son expansion. L'azote est le constituant des protéines et des acides-nucléiques et est donc essentiel à toute forme de vie (Vitousek and Howarth 1991). La plupart des cyanobactéries et algues eucaryotiques sont capables d'assimiler les différentes formes d'azote inorganique (NO_2^- , NO_3^- et NH_4^+) et organique (urée, acide-aminés, ...). Même si les changements globaux tendent à modifier le cycle de l'azote, celui-ci est contrôlé principalement par des transformations biologiques complexes opérées par les microorganismes.

La fixation azotée (contrôlée par la nitrogénase, EC 1.18.6.1), la dénitrification, l'assimilation ou l'oxydation aérobie de l'ammonium (Zehr and Kudela 2011) sont les grandes voies biologiques contrôlant ce cycle. Les diatomées possèdent de nombreux transporteurs et enzymes relatifs au métabolisme de l'azote (Armbrust et al 2004) et plus particulièrement un cycle fonctionnel de l'urée lui conférant un avantage vis-à-vis des limitations azotées. Ce cycle permet de fixer le carbone inorganique dans des composés azotés sans passer par la photosynthèse. Les produits de ce cycle confèrent également d'autres avantages physiologiques importants dans l'osmoprotection et la silicification (Allen et al 2011). De plus, une étude récente montre que les diatomées sont capables de vivre et survivre pendant des mois sans lumière en respirant des nitrates (Kamp et al 2011). Contrairement à l'ensemble des organismes phytoplanctoniques qui ne sont pas capables de fixer l'azote gazeux, quelques diatomées du genre *Hemiaulus*, *Rhizosolenia* et *Chaetoceros* peuvent entretenir des relations symbiotiques avec des cyanobactéries du genre *Richelia* capables de fixer l'azote gazeux (Foster and Zehr 2006, Foster et al 2007). Plus récemment, il a pu être montré que les diatomées de la famille des

Rhopalodiaceae contiennent un endosymbiote dont l'origine serait une cyanobactérie qui permettrait notamment d'utiliser la forme gazeuse de l'azote (Nakayama and Inagaki 2014).

La distribution ubiquitaire des diatomées dans les écosystèmes aquatiques et les importantes densités de ces cellules dans certaines régions font de ces micro-organismes des acteurs importants dans la fixation de l'azote inorganique et l'exportation de ses formes organiques dans la colonne d'eau.

c) Le cycle du silicium

Le cycle du silicium a connu de profond bouleversement au cours des temps géologiques. Avant le Phanérozoïque (0 à -544 MA), des procédés inorganiques et des bactéries régulaient le cycle biogéochimique du silicium (Kidder and Erwin 2001). Après -544 MA ce cycle aurait été davantage contrôlé par les radiolaires et les éponges siliceuses qui sont parmi les autres organismes silicifiants

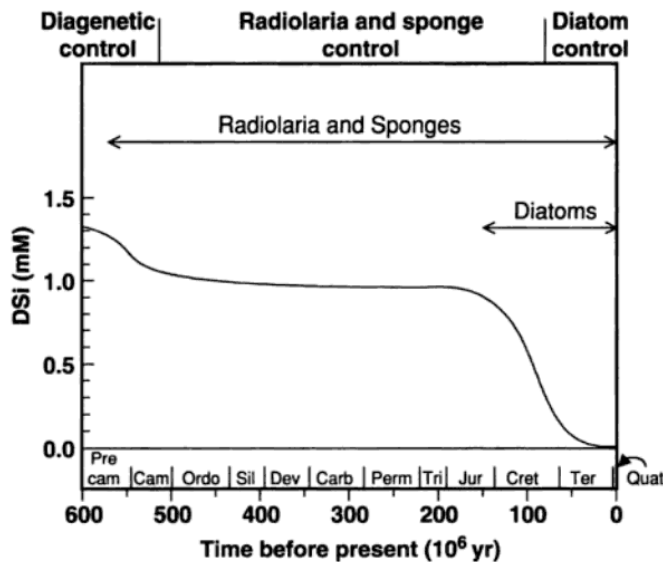


Figure 4 : Evolution du cycle du silicium du Précambrien inférieur à nos jours. Les changements temporels dépendent des organismes silicifiants comme les radiolaires, les éponges et les diatomées. Ce schéma est issu du livre de Canfield *et coll.* (Canfield *et al* 2005).

70 μM en moyenne avec des concentrations plus fortes notamment au fond et plus faibles en surface de l'ordre de quelques μM . Aujourd'hui le cycle moderne du silicium est largement influencé par les diatomées (Figure 5).

(Racki and Cordey 2000). La concentration en silicium dissous (DSi) serait alors passée de 1,3 mM à 1,0 mM. Ce n'est qu'avec l'essor des diatomées que le cycle du silicium aurait connu un réajustement sans précédent (Maldonado *et al* 1999). Avec l'apparition des diatomées et leur rapide diversification au Jurassique, ces microalgues auraient, en quelques millions d'années, contribuées à une diminution de plus de 70 % de la concentration en DSi (Figure 4).

De 1,0 mM au début du Jurassique, la concentration actuelle des océans est de

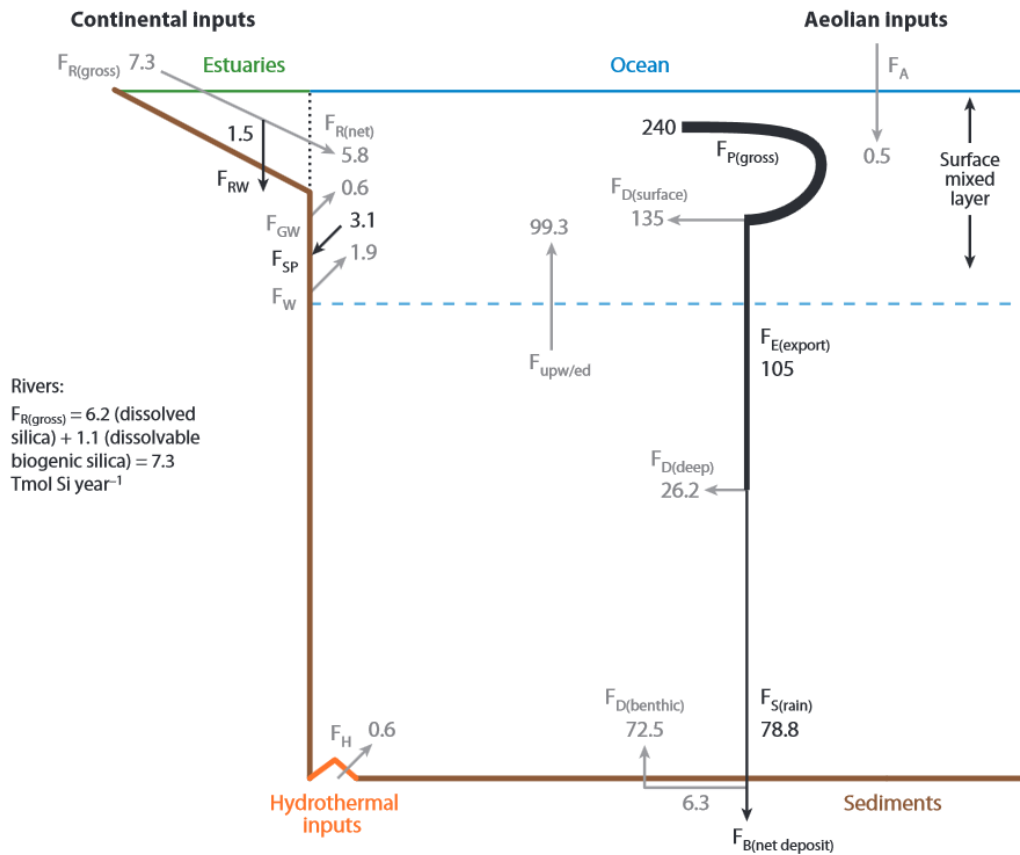


Figure 5 : Schématisation du cycle biogéochimique du silicium au niveau océanique. Les flèches grises représentent les flux de silicium dissous et les flèches noires représentent les flux de silice biogénique. Ce schéma est issu de l'article de Tréguer et De La Rocha (Treguer and De La Rocha 2013).

Ce cycle serait d'ailleurs fortement entrecroisé avec celui du carbone (Pondaven et al 2000) sans pour autant être influencé par les activités anthropiques (Treguer and De La Rocha 2013). L'apport de DSi dans les océans viendrait majoritairement de l'érosion progressive de la croûte terrestre par différents facteurs tel que les rivières, les sources hydrothermales et le vent. Cette fraction va s'accumuler dans les océans où elle sera biominéralisée par les organismes silicifiants dont très majoritairement les diatomées. La concentration en silice biominéralisée à partir du silicium dissous, aussi appelée silice biogénique (BSi), pourrait atteindre annuellement environ 240 Tmol Si ($F_{P(gross)}$). Il existe cependant des différences notables entre les zones côtières, l'océan ouvert et l'océan austral qui ne seront pas détaillées ici. Environ 55 % de la BSi va être dissoute dans la zone euphotique (135 Tmol Si. an⁻¹; $F_{D(Surface)}$) alors que la fraction restante sera exportée vers les zones disphotiques ($F_{E(Export)}$) du fait de la gravité et du poids des structures siliceuses. Au niveau de la zone disphotique, environ 25 % de la silice biogénique sera dissoute ($F_{D(Deep)}$) et 75 % sera déposée au niveau du plancher océanique ($F_{S(rain)}$) pour y être enfouie ou dissoute. Etant donné que les diatomées sont les organismes silicifiants majoritaires, leur action sur le cycle du silicium est primordiale au niveau de la biominéralisation du DSi et de l'exportation de la BSi vers les fonds océaniques (Treguer and De La Rocha 2013).

4. Diversité taxonomique

L'analyse de la diversité des espèces d'algues révèle que les algues chromophytes représentent le groupe le plus important en termes d'abondance et de diversité. A l'intérieur de ce grand groupe taxonomique comprenant les Haptophytes, les Dinoflagellés et les Glaucophytes, on remarque que les Bacillariophycées, c'est-à-dire les diatomées, représentent le groupe taxonomique le plus divers.

Tableau I : Diversité des taxons des différents types d'algues.

Groupes	Taxons	Nombre d'espèce reconnue	Nombre d'espèce estimée
Algue rouge	Rhodophycea	4 000-6 000	5 500-20 000
Algue verte	Prasinophycea	140	500
	Ulvophyceae	1 100	3 000
	Chlorophycea	2 600	10000-100000
	Conjugatophyceae	10 000-12 000	20 000
	Charophyceae	350	500
Algue chromophyte	Bacillariophyceae	10 000-12 000	100 000-1 000 000
	Bicosoecophyceae	< 50	1 000
	Chlorarchniophyceae	3-10	20
	Chrysophyceae	1 200	2 400
	Dictyochophyceae	10	15
	Eustigmatophyceae	12	1 000-10 000
	Phaeophyceae	1 500	2 000
	Prymnesiophyceae	500	2 000
	Raphidophyceae	15	100
	Synurophyceae	135-250	1 000
	Xanthophyceae	600	2 000
	Dinoflagellates	2 500-4 000	3 500-11 000
	Euglenophytes	900	2 000
	Cryptophytes	200	1 200
	Glaucophytes	13	50

A titre de comparaison le nombre d'espèces de Chlorophycée, arrivant en deuxième position dans le classement, possède une diversité spécifique estimée de 10 à 100 fois moins importante que celle des diatomées (Tableau I).

On peut alors se demander pourquoi les chromophytes, et plus particulièrement les diatomées, dominant autant cette diversité ? Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, il est important de

décrire les caractéristiques des diatomées en les plaçant dans un contexte comparatif avec les autres microalgues existantes.

Origine, rôle et évolution des diatomées

Depuis leur apparition vraisemblablement au Permien-Trias, les diatomées ont connu une diversification sans précédent avec près de 100 000 espèces estimées et ont colonisé un grand nombre d'écosystèmes aquatiques. De nos jours, elles sont impliquées dans le contrôle de grands cycles biogéochimiques comme celui du silicium, de l'azote ou du carbone. A titre d'exemple, 25 % de la production primaire nette de la Terre serait réalisée par ces microalgues brunes unicellulaires attestant de leur importance écologique. Tout comme les autres membres de la famille des hétérochontes, les diatomées sont issues de deux épisodes d'endosymbioses successifs et possèdent de nombreux gènes qui ont été acquis horizontalement (HGT). Il a notamment été estimé qu'environ 8 % des gènes nucléaires de *Phaeodactylum tricornutum* proviendraient d'un processus de HGT. Cette mixité et plasticité génétique pourraient être des facteurs importants dans leur évolution et leur aurait permis d'acquérir des voies métaboliques singulières.

B. Diatomée : description, reproduction et mode de vie

1. Le frustule siliceux

a) Morphologie du frustule

Tout comme les radiolaires (membres du zooplancton) et les éponges siliceuses, les diatomées sont des organismes capables de former un exosquelette siliceux. Comme nous l'avons vu précédemment, même si les premières diatomées avaient été dépourvues de frustule, le processus de silicification aurait été acquis spécifiquement et conservé au cours de l'évolution ce qui aurait conféré des avantages écologiques majeurs (Guillou et al 1999, Round and Crawford 1981). En se basant sur la morphologie du frustule, on peut classer les diatomées en deux grands groupes : celui des pennées qui présentent une symétrie bilatérale et sont pourvues ou non d'un raphé (raphide et araphide) et celui des centriques avec une symétrie radiale (Figure 6) (Round et al 1990, Simonsen 1972, Simonsen 1979).

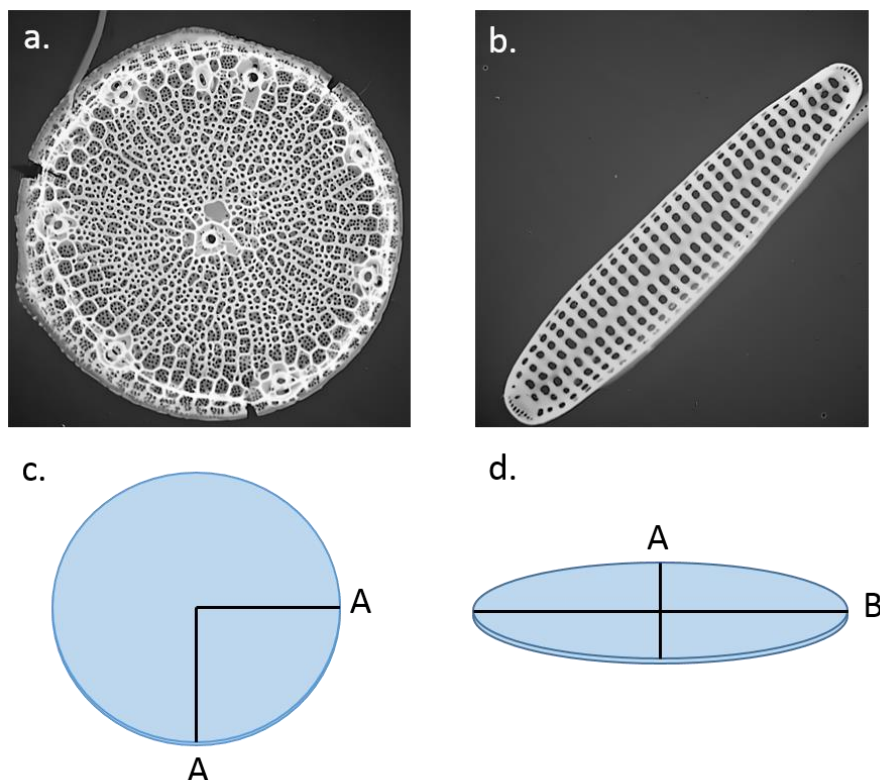


Figure 6 : Morphologie du frustule des diatomées centriques et pennées. Les images MET correspondent au frustule de *T. oceanica*, une diatomée centrique (a.) et *Talaroneis posidoniae*, une diatomée pennée (b.). Les morphologies sont facilement discernables avec les diatomées centriques qui présentent elles une symétrie radiale (c.) alors que les pennées présentent une symétrie bilatérale (d.). Images d'Adrien Bussard.

Tout comme les fossiles, les analyses de datation moléculaire montrent que les diatomées centriques constituent le groupe le plus ancien alors que les diatomées pennées forment un groupe beaucoup plus jeune. A l'intérieur de ce dernier, les diatomées pennées présentant un raphé correspondent au groupe le plus jeune et le plus diversifié (Kooistra et al 2003). L'analyse des fossiles existants, a permis de proposer que les diatomées centriques et pennées seraient séparées de 90 Ma. Cependant leur divergence moléculaire serait du même ordre que celui de la cione (*Ciona intestinalis*), un urochordé positionné à la base de l'évolution des Vertébrés, et l'Humain ayant 550 Ma d'années de séparation (Bowler et al 2008). Cette rapide divergence pourrait s'expliquer par les modes de vie totalement différents adoptés par ces deux grands types de diatomées que nous développerons dans un second temps.

La présence d'un exosquelette ne constitue pas une particularité des diatomées étant donné qu'il est retrouvé chez d'autres microalgues. Les coccolithophoridés, membre des Alvéolates, possèdent un test calcique (CaCO_3) alors que les dinoflagellés ont un test fait de cellulose et d'inclusion siliceuse. Pourquoi le frustule siliceux des diatomées est-il si avantageux?

b) Rôles du frustule

- **Barrière physique contre la prédation**

Le chercheur hollandais du XVII^{ème} siècle Antoni van Leeuwenhoek, ayant mis au point le premier microscope optique à lumière transmise, observa, dans un échantillon d'eau de mer, de nombreux micro-organismes alors inconnus mais aussi des "cristaux". Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que le botaniste Carl Adolph Agardh a montré que ces "cristaux" étaient en fait des organismes vivants de couleur jaune-brunâtre possédant un exosquelette siliceux qu'il appela *Diatomeae*. Le premier rôle proposé de cet exosquelette a été une protection mécanique efficace.

Dans l'évolution simultanée de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques, un paramètre semble crucial à leur succès : la protection contre la prédation. Plus les défenses sont nombreuses et efficaces et moins les espèces phytoplanctoniques seront prédatées ce qui permettra le maintien de la population (Smetacek 2001). Avec la présence d'un frustule, les diatomées semblent posséder un avantage important qui permettrait de réduire la prédation. Des expériences de résistance mécanique menée sur un frustule de la diatomée centrique *Thalassira punctigera* de 50 μm de diamètre montre qu'il peut supporter des pressions considérables allant jusqu'à 730 μN ce qui représente 700 t.m^{-2} . Cette même étude, transposée à *Coscinodiscus granii*, une des diatomées centriques la plus large (130 μm), montre que la résistance mécanique est inversement proportionnelle à la taille. Plus la cellule est petite et plus la pression à exercer sur le frustule pour le rompre doit être importante (Hamm et al 2003).

Chez les autres microalgues, l'exosquelette calcifié des coccolithophoridés ainsi que celui en cellulose des dinoflagellés confèreraient une résistance mécanique plus faible et donc une protection contre les prédateurs moins efficace que celle du frustule des diatomées (Kooistra et al 2007). De plus, chez les diatomées modernes, la potentielle présence d'épines siliceuses ou chitineuses (Durkin et al 2009) ainsi que la grande variété de formes 3D du frustule serait le résultat d'un processus évolutif visant notamment à réduire les pressions de prédation. Cette protection physique, qui a permis le maintien et développement des populations de diatomées (Hamm et al 2003), présentent néanmoins des avantages et des intérêts quant à la localisation des cellules dans la colonne d'eau (flottaison, rotation, ...).

- **Protection solaire contre les UV et propriétés optiques**

La lumière du soleil est composée d'un spectre continu de radiations électromagnétiques qui peut être divisé en 3 grandes régions : les ultraviolets (UV), le visible et l'infrarouge. Les UV comprennent les longueurs d'onde allant de 200 à 400 nm et se répartissent en trois grandes classes : les UV-A (320-400 nm), les UV-B (280-320 nm) et les UV-C (200-280 nm) (Matsumura and Ananthaswamy 2004). Contrairement aux UV-C qui sont bloqués au niveau de la couche d'ozone de la stratosphère, les UV-A et UV-B peuvent atteindre la surface de la Terre de manière suffisamment importante pour engendrer d'importants troubles biologiques comme des mutations génétiques ou des altérations de certaines fonctions biologiques comme la photosynthèse. De nombreuses espèces phytoplanctoniques synthétisent des polysaccharides externes contenant des composés phénoliques capables d'absorber ces UV. Les diatomées vont utiliser leur frustule et les molécules organiques associées comme double protection contre les rayonnements UV. Dans une expérience d'acclimatation de l'espèce *T. weissflogii* à une exposition longue aux UV-B, Zudaire *et coll.* montre que dans les premiers jours le taux de croissance et la concentration de l'ensemble des pigments, excepté la diatoxanthine, tendaient à diminuer. Cependant au bout de 16 jours une synthèse massive de mycosporine-like amino acids (MAAS) a été détectée et s'accompagne d'une augmentation du taux de croissance. *T. weissflogii* est donc capable de s'acclimater au rayonnement UV tout en préservant son système photosynthétique (Zudaire and Roy 2001). Ces MAAS sont liés au frustule et permettent d'absorber spécifiquement les rayonnements UV avant qu'ils puissent pénétrer à l'intérieur même de la cellule (Ingalls et al 2010).

L'indice de réfraction de la silice (SiO_2) est légèrement supérieur à celui de l'eau mais reste relativement plus faible que celui du CaCO_3 . Cette différence viendrait en partie du fait que le CaCO_3 a une structure cristalline alors que la silice biogénique est amorphe (Raven and Waite 2004). Le frustule

seul, c'est-à-dire sans ses composés organiques, serait donc moins efficace que l'exosquelette en CaCO_3 des coccolithophoridés pour se protéger des UV.

Récemment, de nombreuses études tendent à montrer que le frustule des diatomées posséderait des propriétés optiques intéressantes. En effet l'architecture 3D des valves procurerait différents effets photoniques comme la diffraction, la réflexion et la focalisation. L'éclairement dans le visible ou dans l'UV de la valve unique d'*Arachnoidiscus sp.* a montré que la focalisation de la lumière se ferait en plusieurs points spatialement séparés (Ferrara et al 2014). Ces propriétés, identifiées il y a quelques années, pourraient être intéressantes dans les applications biotechnologiques comme les panneaux solaires. Cependant, ces découvertes posent aussi de nombreuses questions sur les effets potentiels dans la gestion et l'utilisation des photons par la cellule.

- **Positionnement dans la colonne d'eau et préservation des populations**

Contrairement aux dinoflagellés, les diatomées ont perdu leur flagelle qui est un moyen actif pour se déplacer dans la colonne d'eau. Ces microalgues brunes restent cependant capables de se déplacer verticalement et de se positionner stratégiquement en fonction des différents besoins physiologiques. En effet la présence conjointe d'un protoplaste vacuolé ainsi qu'une paroi extérieure silicifiée permet aux diatomées planctoniques de se positionner dans la colonne d'eau. Plus la pression de turgescence effectuée par le protoplaste est importante et plus la cellule va remonter dans la colonne d'eau. La présence du frustule permet de contenir efficacement cette pression mais permet aussi de jouer un rôle de "ballast". En effet, plus la densité du frustule est importante pour un volume donné et plus la diatomée sera dense et pourra donc descendre dans la colonne d'eau et inversement. De plus, cette densité de silice biogénique ($2,1 \text{ g.cm}^{-3}$) excède celle de n'importe quel polymère algal ou exosquelette connu. Ainsi, pour une taille donnée, le frustule permet de couler passivement plus profondément et plus rapidement dans la colonne d'eau que bien d'autres organismes phytoplanctoniques et donc d'occuper des niches écologiques plus difficilement accessibles. Comme précédemment mentionné, la présence d'épines siliceuses ou encore de fibres chitineuses, leur permettrait également de limiter la sédimentation ou de former des chaînes capables de sédimenter plus profondément (Durkin et al 2009).

Comme nous l'avons décrit précédemment, le frustule des diatomées ne seraient pas une barrière stricte au parasitisme. Une hypothèse a été proposée sur son rôle dans le maintien des populations (Raven and Waite 2004). Ainsi, pour pallier les risques de diffusion d'une contamination, les diatomées infectées sédimenteraient plus rapidement vers les zones aphotiques, c'est-à-dire plus loin du reste de la population. Ce processus résulterait d'une augmentation de la densité protoplastique couplée à celle du frustule.

- Locomotion des diatomées benthiques

Dans les assemblages des biofilms, les diatomées benthiques, très majoritairement de forme pennée raphide, sont capables de se déplacer activement. Le frustule des diatomées pennées raphides ont la particularité de présenter une fente linéaire suivant l'axe de symétrie bilatérale (Figure 7) (Ruck and Theriot 2011). Au travers de ce raphé, les diatomées secrètent un mucilage composé de différentes

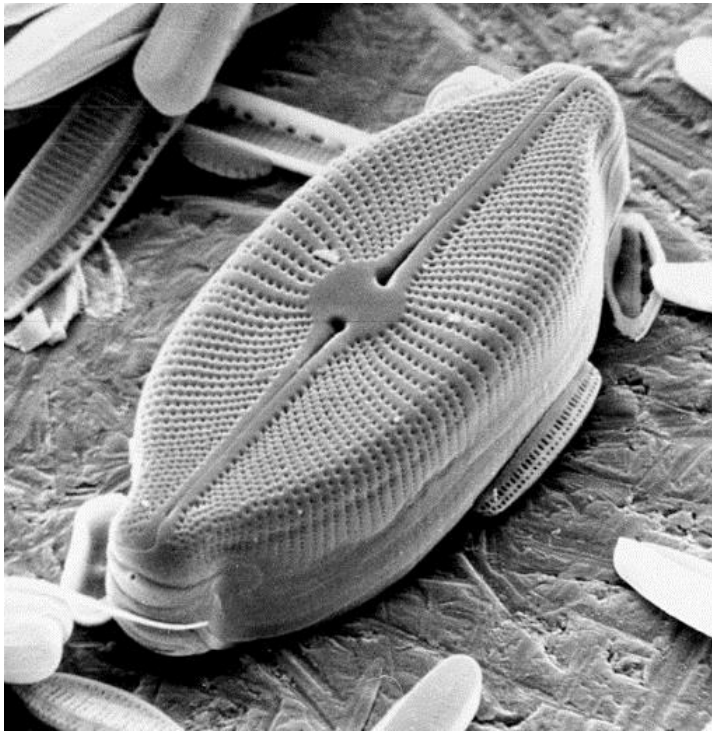


Figure 7 : Frustule de la diatomée pennée *Cosmioneis pusilla* observé au microscope électronique à balayage (MEB). Ce frustule présente un raphé en son milieu. Ce raphé permet, grâce notamment à la sécrétion d'EPS et des éléments du cytosquelette (actine-myosine), l'adhésion et la mobilité des cellules. Image de tolweb.org/raphid_diatoms/125307.

substances polymériques correspondant aussi à ce que l'on appelle les exopolysaccharides sécrétés (EPS) (Hoagland et al 1993). Ces EPS permettent l'adhésion, la colonisation des différents substrats mais servent aussi de source de carbone par les organismes hétérotrophes tels que les bactéries et les invertébrés (Underwood and Smith 1998). Même si des incertitudes subsistent, il a été montré que l'action conjointe du système actine-myosine au travers du raphé permet aux diatomées de "glisser" sur le substrat (Poulsen et al 1999). La mobilité des diatomées peut varier suivant certains paramètres physico-chimiques

comme la disponibilité en lumière (Perkins 1960, Serodio et al 2006), le spectre lumineux (Cohn et al 1999), la perturbation du sédiment (Hopkins 1966), l'alternance immersion/émersion (Mitbavkar and Anil 2004), l'hydrodynamisme (Kingston 1999), la température (Cohn et al 2003), les nutriments (Kingston 2002) et la pollution (Coquille et al 2015). La réponse à la disponibilité à la lumière est un des paramètres les plus étudiés car conditionne la photosynthèse et donc la productivité primaire. Dans les zones intertidales, il a été montré que les diatomées benthiques se déplacent à la surface de celui-ci en période d'immersion et migrent à l'intérieur du sédiment pendant les périodes d'émersion pour éviter la dessiccation (Sauer et al 2002). En plus d'optimiser leur physiologie, les diatomées benthiques mobiles peuvent également fuir des zones polluées pour préserver leur intégrité. Ainsi, une étude d'écotoxicologie récente a montré que la mobilité de la diatomée *Gomphonema gracile* était supérieure, en terme de vitesse et de distance, lorsque la concentration en herbicide *Metolachlor* (interdit depuis 2003 en France) augmentait (Coquille et al 2015). Ce résultat suggère la mise en place

d'une stratégie échappatoire efficace et nécessaire. Cette capacité de mobilité correspond donc à une stratégie cellulaire essentielle pour la viabilité, le maintien et la composition des assemblages des diatomées dans les écosystèmes aquatiques.

- **Un rôle tampon ?**

Outre les propriétés physiques mentionnées ci-dessus, le frustule pourrait également jouer un rôle de régulation du pH facilitant ainsi l'activité des anhydrases carboniques (AC) extracellulaires (Milligan and Morel 2002). L'une des étapes limitantes de la réaction d'interconversion entre le CO_2 et le HCO_3^- , est la régénération du site actif de ces enzymes par un proton. Cette dernière serait facilitée par la présence des silanols à la surface du frustule, qui correspondent à des groupements dont le proton est facilement mobilisable. Les résultats de Milligan et Morel ont montré que la silice biogénique dépourvue de matière organique joue le rôle d'un tampon pH permettant la régénération du site actif de l'AC tout en augmentant leurs activités (Milligan and Morel 2002). Les composants organiques des parois cellulaires non silicifiées ne sont pas de bons tampons. Les diatomées tireraient donc un avantage direct du frustule en maximisant l'incorporation du carbone inorganique (Raven and Waite 2004).

2. Cycle de vie des diatomées

a) Division mitotique et reproduction sexuée

Comme de nombreux organismes phytoplanctoniques, le cycle de vie des diatomées comprend 2 stades principaux : un stade végétatif, où la diatomée est diploïde et se reproduit par mitose, (reproduction asexuée) et un stade relativement court de reproduction sexuée (Chepurnov et al 2008 , Lewis 1984).

Comme bien des cellules aux cours des cycles de divisions, les cellules diploïdes passent par les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) qui sont régulées par des cyclines spécifiques. Avec l'analyse des deux premiers génomes de diatomées, 52 et 24 cyclines potentielles ont été identifiées chez *T. pseudonana* et *P. tricornutum*. Parmi ces gènes, il semblerait que certaines cyclines forment une nouvelle classe comparées aux Chromalvéolates. Ces cyclines spécifiques aux diatomées sont appelées dsCYCs pour *diatom specific cyclins* et représenteraient 11 des 52 cyclines de *T. pseudonana*. Ces dsCYCs présenteraient des profils d'expression différents en fonction des différentes

phases du cycle : dsCYC1, dsCYC2, dsCYC5, dsCYC6, dsCYC7, dsCYC8, dsCYC9 et dsCYC11 seraient surexprimées en phase G1 et/ou S, les dsCYC3 et dsCYC4 durant la transition G2/M et la dsCYC10 durant la transition G1/S (Huysman et al 2010). D'autres éléments sont également importants dans la progression du cycle cellulaire comme les phosphatases et les kinases qui sont généralement dépendant des cyclines. Sans rentrer dans les détails, des kinases cyclines dépendantes (CDKA) régulent la progression du cycle cellulaire à des moments précis du cycle. Par exemple, la CDKA2 de *P. tricornutum* serait exprimée majoritairement durant la transition G2/M et agirait comme régulateur mitotique. Son inactivation entrainerait une augmentation du temps de génération dû à un allongement de la phase mitotique (Huysman et al 2015). L'activité des cyclines est modulée en réponse à certains facteurs environnementaux (concentration en silicium, lumière, nutriments, ...). Nous verrons dans le Chapitre IV, que modifier ces facteurs environnementaux permet de synchroniser majoritairement les cellules à un même stade cellulaire.

Après la réplication de l'ADN et la cytodivision lors de la phase S et G2, les cellules de diatomées entre en phase M durant laquelle une nouvelle hypovalve par protoplaste va être synthétisée avant la séparation physique (Figure 8). Durant le stade végétatif, une réduction graduelle de la taille des cellules est observée à cause de contraintes physiques imposées par le frustule. Cette réduction graduelle est due au fait que la valve maternelle, héritée par chacune des cellules filles, est toujours l'hypervalve. L'hypovalve est donc toujours synthétisée par les cellules. En théorie lorsque les cellules arrivent à une taille critique, un cycle de reproduction sexuée peut être déclenché afin de reconstituer des cellules de "tailles initiales" (Bowler et al 2010, von Dassow and Montresor 2011). En plus du critère de taille, les conditions physico-chimiques jouent aussi un rôle important dans l'initiation d'un cycle de reproduction sexuée. Ce cycle est également différent entre les diatomées centriques et pennées (Chepurnov et al 2004 , Falciatore and Bowler 2002). Chez les diatomées centriques, la reproduction sexuée se fait par oogamie c'est-à-dire que les gamètes mâles (flagellés et petits) et femelles (non mobiles et larges) sont différents. Une première cellule, le gamétange mâle commence une série de divisions pour former un nombre limité de microspores qui, par division méiotique, forment des spermatozoïdes flagellés.

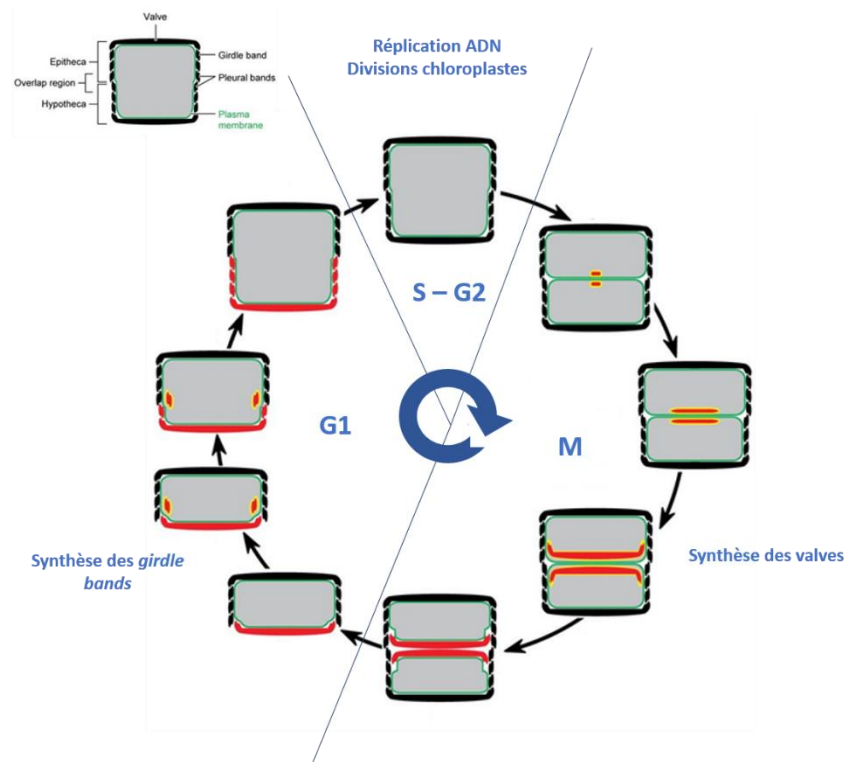


Figure 8 : Représentation schématique du cycle de vie des diatomées. Lors de la phase G1, la diatomée augmente en taille par la synthèse de *girdle bands* siliceuses. Durant la phase S, l'ADN est répliqué puis, durant la phase G2, les chloroplastes se divisent et se répartissent dans le cytoplasme. Lors de la phase M, la cytotéiose et la synthèse de nouvelles hypoalves vont permettre aux deux cellules filles de se séparer physiquement. Ce schéma est inspiré de l'article de Kröger *et coll.* (Kroger and Poulsen 2008).

Les cellules gamétanges femelles donnent un ou deux "œufs". Certains gènes, appelés *Sig* (*Sexually Induced Gene*), identifiés chez *T. weissflogii* seraient surexprimés dans les stades les plus précoces de la reproduction sexuée (Armbrust 1999). La protéine *Sig1* aurait été identifiée comme un acteur clé dans la reconnaissance spermatozoïdes/œufs (Sorhannus 2003). La fertilisation produit un zygote qui tend à s'élargir massivement par incorporation d'eau pour former une auxospore qui donnera la nouvelle diatomée (Chepurnov et al 2004). Chez les diatomées pennées, cette reproduction se fait par isogamie (les gamètes mâles et femelles ne sont pas différenciables) ou anisogamie (les gamètes mâles et femelles sont différenciables et le gamète mâle ne possède pas de flagelle). Étant donné que les gamètes mâles et femelles ne sont pas mobiles, il a été proposé que les différentes cellules seraient capables de se rapprocher les unes des autres en réponse à des phéromones émises dans l'environnement (Gillard et al 2013). Une fois proche, les cellules gamétanges s'apparient et commencent la gamétogénèse avec deux gamètes formés par cellule parentale. Ainsi le zygote va, comme pour les cellules centriques, s'élargir fortement par incorporation d'eau et donner une auxospore qui donnera une cellule "initiale" (Chepurnov et al 2004).

b) Stade de survie

La majorité des algues chromophytes et vertes sont capables de se mettre dans un état de dormance qui leur permet de survivre à un épisode non propice à leur développement comme lors de variations de luminosité, de pH, de salinité ou encore la présence de virus (Kooistra et al 2007). Avec l'alternance des saisons, les assemblages phytoplanctoniques varient en termes de diversité et d'abondance et, dans certains cas, sont indétectables temporairement dans la colonne d'eau. La formation de cellule dormante, entourée d'un mur cellulaire épais qui se dépose dans le sédiment, permet aux organismes de survivre aux conditions environnementales défavorables (Montresor et al 2013). Ce processus de survie n'est cependant qu'efficace dans les environnements côtiers où le sédiment est relativement proche de la surface contrairement aux environnements océaniques. Une étude de Zonneveld et coll. a montré que des cystes de dinoflagellés n'étaient retrouvés que dans les environnements côtiers (Zonneveld et al 2013). La grande majorité des algues chromophytes possèdent cette capacité de dormance probablement héritée de leur ancêtre hétérotrophe commun. Contrairement aux dinoflagellés, qui sont capables de produire des cystes en passant par un cycle de reproduction sexuée, les diatomées produisent des cellules dormantes qui ressemblent soit à la cellule végétative soit à des spores. Cet état de dormance n'est néanmoins pas induit par un cycle de reproduction sexuée. Les algues vertes, et plus particulièrement les chlorophytes et les prasinophytes, ont également acquis la possibilité de produire des cystes pouvant expliquer leur présence lors des blooms côtiers. A l'inverse, les algues rouges possèdent aucune forme connue de stade de survie pouvant peut-être expliquer leur faible diversité actuelle (Fogg 1996). La présence d'un stade de survie permet également de pouvoir coloniser de nouveaux environnements. Emmener par les courants océaniques ou les eaux de ballast des bateaux, certains stades de survie peuvent parcourir passivement des milliers de kilomètres et reprendre une vie végétative dans une nouvelle niche écologique (Hallegraeff and Bolch 1992).

3. Chloroplaste, photosynthèse et acquisition du carbone

a) Architecture du chloroplaste et spécificités

Le chloroplaste est une organelle acquise au cours des phénomènes d'endosymbioses ayant permis aux organismes eucaryotiques d'acquérir le processus de photosynthèse. Le chloroplaste des diatomées a été bien décrit par Bedoshvili *et coll.* (Bedoshvili et al 2009) et possède 4 spécificités permettant de le différencier de celui des algues non hétérochontes (Figure 9) :

- (1) cette organelle est entourée de 4 membranes plasmiques dont la plus extérieure est continue avec le réticulum endoplasmique. Cette continuité pose de réelles interrogations sur les contraintes d'échange entre le chloroplaste et les autres éléments cellulaires (Kroth et al 2008) ;
- (2) le réticulum périplastique (PR) agit comme un complexe de vésicules et de citernes entre les 2 membranes extérieures et les 2 membranes intérieures ;
- (3) les lamelles chloroplastiques sont constituées d'un empilement de 3 thylakoïdes ;
- (4) ces lamelles suivent la périphérie du chloroplaste.

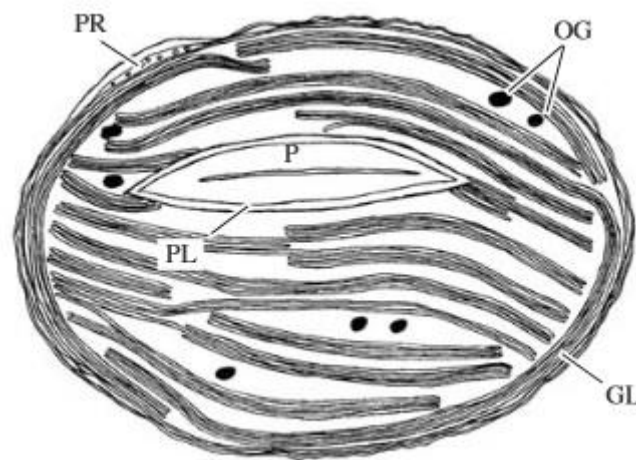


Figure 9 : Schéma représentant la structure du chloroplaste de *Thalassiosira proshkinae*. GL, lamelles suivant la périphérie du chloroplaste; OG, gouttelettes lipidiques ; PR, réticulum périplastique ; PL, membrane entourant le pyrénioïde ; P, pyrénioïde. Schéma provenant de l'article de Bedoshvili *et coll.* (Bedoshvili et al 2009).

La forme et l'architecture des chloroplastes peuvent différer à l'intérieur même des ordres de diatomées et pourraient être des bons indicateurs taxonomiques et phylogénétiques. Les diatomées centriques présentent de multiples chloroplastes en forme de disque alors que les pennées possèdent un ou deux chloroplastes allongés. Le pyrénioïde, structure contenant la Rubisco et d'autres enzymes de la photosynthèse, varie en termes de forme et de position intraplastidique.

b) Les antennes collectrices

Sous le terme antenne collectrice (LHA pour *Ligh-harvesting antenna*) se cachent des complexes protéiques pigmentaires qui absorbent l'énergie lumineuse à différentes longueurs d'onde et la transmettent aux centres réactionnels de la photosynthèse (CR). Ces CR vont alors transformer cette énergie lumineuse en énergie chimique mettant ainsi en mouvement des électrons indispensables à la fabrication d'ATP.

Les pigments sont classés en deux catégories à savoir ceux photosynthétiques, qui vont permettre la conversion des photons en énergie chimique, et ceux dits accessoires qui sont incapables d'effectuer cette conversion mais qui permettent d'optimiser le spectre lumineux d'absorption et qui jouent des rôles dans la photoprotection (Green 2007). Pour comprendre la spécificité des antennes collectrices des diatomées, il est important de retracer l'évolution et la diversité des antennes collectrices existantes chez les algues rouges et vertes et de les replacer dans un contexte environnemental.

Les algues rouges possèdent une composition pigmentaire qui leur est propre avec de la chlorophylle *a* (Chl_a) et des pigments accessoires comme le β -carotène ou les phycobilisomes. Ces algues sont capables "d'absorber" des longueurs d'onde comprises entre 480 et 580 nm. Les phycobilisomes, également présents chez les cyanobactéries ou encore les cryptophytes, sont situés sur la membrane du thylakoïde juste au-dessus des photosystèmes. Ces pigments spécifiques jouent le rôle d'antenne collectrice permettant de capter des photons de différentes longueurs d'ondes et acheminent leur énergie efficacement vers les CR (Figure 9). Cette structure macromoléculaire est composée d'hexamères de phycobiliprotéines où chaque hexamère est lui-même constitué de 3 chaînes polypeptidiques α et β . Ces hexamères sont organisés avec comme base un cœur d'allophycocyanine (AP) surmonté d'un empilement de phycocyanines (PC) puis de phycoérythrines (PE) (Figure 10). L'ordre d'agencement des phycobiliprotéines, maintenues entre elles par des liens thioethers entre cystéines, correspond à un ordre croissant d'énergie de transition permettant d'optimiser l'absorption : phycoérythrine (absorption maximale à 495 / 545-560 nm) - phycocyanine (~620 nm) - allophycocyanine (~650 nm) (Liu et al 2005).

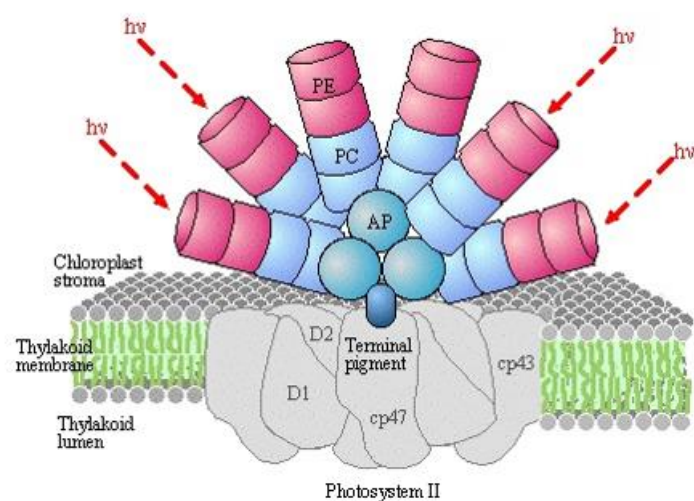


Figure 10 : Structure des phycobilisomes localisés au-dessus du photosystème II (PSII) chez les algues rouges. Figure extraite du site web regroupant toutes les KEGG pathways.

De manière assez intéressante, les algues rouges et vertes, issues du même processus d'endosymbiose, ne possèdent pas la même composition pigmentaire (Kooistra et al 2007). A la différence des algues rouges, les algues vertes possèdent dans leurs antennes collectrices de la chlorophylle *b* (Chl_b) ainsi qu'un pool de carotènes (Figure 11). Cette composition leur permet d'absorber des longueurs d'onde comprises entre 400 et 520 nm. Aucun phycobilisome n'a été détecté chez les algues vertes. La Chl_b diffère de la Chl_a uniquement par la présence d'un groupe *formyl* plutôt que d'un groupe *méthyle* au niveau du carbone en position 7 (Tanaka et al 1998). L'avantage de la chlorophylle *c* (Chl_c), comparé à celui de la Chl_a, est qu'elle permet d'élargir le spectre d'absorption des longueurs d'onde rouges et bleues.

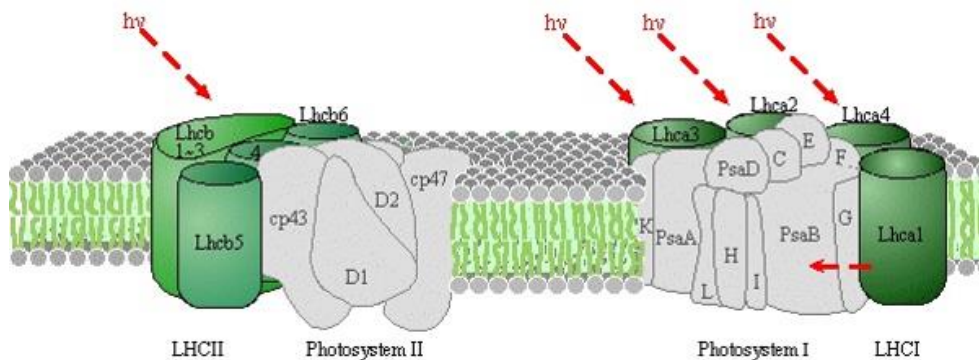


Figure 11 : Organisation pigmentaire des algues vertes au niveau des photosystèmes I et II. Les antennes collectrices (LHCI et LHCII) s'organisent autour des deux photosystèmes et sont composées en particulier de Chl_a, Chl_b et de carotènes. Figure extraite du site web représentant toutes les KEGG pathways.

Les algues chromophytes comme les diatomées, issues d'un second processus d'endosymbiose avec vraisemblablement une algue rouge, ont une signature pigmentaire facilement identifiable. Les phycobilisomes ont été perdus, la Chl_a et le β -carotène sont restés et d'autres pigments photosynthétiques ont été acquis comme la Chl_c et la fucoxanthine. Cette composition pigmentaire confère un plus large spectre d'absorption que celui des algues rouges et vertes allant de 400 à 580 nm (Kooistra et al 2007). La Chl_a, la Chl_b et la fucoxanthine correspondent à des pigments photosynthétiques. Les β -carotènes ont été définis comme des photoprotecteurs mais pourraient également servir de "quencher" énergétique en dissipant l'excès d'énergie au niveau des CR pour ne pas les endommager (MacIntyre et al 2002). Au même titre que le β -carotène, on retrouve chez les diatomées deux pigments xanthophylles que sont la diadinoxanthine (DD) et diatoxanthine (DT). Ces derniers ont un rôle photoprotecteur et permettent aussi une rapide acclimatation à des modifications de l'environnement lumineux. L'identification par chromatographie en phase liquide (HPLC) de ces 2

xanthophylles couplés à la fucoxanthine constituent un bon moyen de déterminer la présence de diatomées dans des assemblages de micro-organismes (Passarelli et al 2015).

Comme nous venons de le voir, les algues rouges, vertes et chromophytes possèdent des spectres d'absorptions différents permettant de s'acclimater préférentiellement à différents environnements aquatiques. Pour comprendre cette notion, il est utile de rappeler qu'il existe une atténuation du spectre lumineux en fonction de la profondeur mais aussi en fonction de l'environnement (Green 2007). En effet, la zone euphotique diffère en terme de profondeur et de qualité du spectre entre les écosystèmes côtiers et océaniques (Doron et al 2007). Les environnements côtiers présentent une concentration importante en phytoplancton et en particules en suspension induisant une forte réflexion de la lumière. Dans ces écosystèmes, la zone euphotique ne dépasse pas 50 m de profondeur et les longueurs d'onde correspondantes au bleu sont très vite réfléchies. L'océan

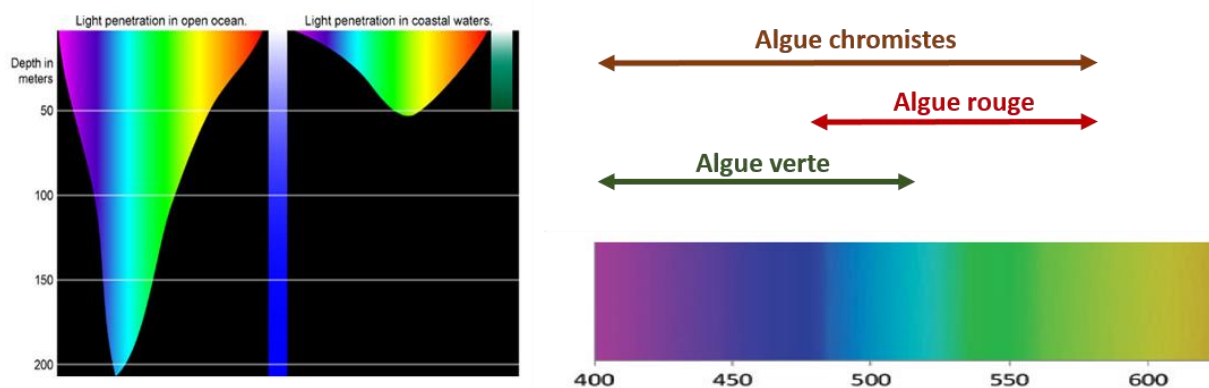


Figure 12 : Spectres lumineux et capacité d'absorption des algues. A gauche, la figure illustre la pénétration du spectre lumineux dans l'océan ouvert et les environnements côtiers révélant une différence dans la profondeur de la zone euphotique et de la qualité du spectre lumineux en fonction de l'environnement. A droite, le schéma représente la capacité d'absorption en fonction du spectre lumineux chez les trois grands types d'algues.

ouvert est lui beaucoup moins turbide et possède une abondance phytoplanctonique plus faible laissant passer la lumière jusqu'à des profondeurs pouvant aller jusqu'à 200 m (Figure 12). La composition pigmentaire couplée aux caractéristiques environnementales de distribution verticale de la lumière permettent en partie de comprendre la distribution des algues. Les algues rouges, absorbant préférentiellement entre 480 et 580 nm, sont plus adaptées à vivre dans les environnements côtiers où ces longueurs d'onde sont majoritaires. Au contraire, les algues vertes possèdent un spectre d'absorption décalé vers le bleu (absorption de 400 à 520 nm) leur permettant de vivre préférentiellement dans l'océan ouvert. Les algues chromophytes, pouvant absorber de 400 à 580 nm, peuvent vivre aussi bien dans les environnements côtiers qu'océaniques (Figure 12) (Kooistra et al 2007).

c) Acquisition du carbone inorganique

Dans le système marin, le carbone inorganique est un équilibre complexe entre différentes formes (CO_2 , HCO_3^- , ...) qui proviennent du CO_2 atmosphérique ($\text{CO}_{2 \text{ air}}$), de la dissolution des carbonates sous forme de calcite ou d'aragonite et de son utilisation par les organismes photosynthétiques. Le $\text{CO}_{2 \text{ air}}$ est dissous au niveau de la surface des océans jusqu'à ce que les pressions partielles de CO_2 ($p\text{CO}_2$) entre ces 2 compartiments arrivent à l'équilibre. La dissolution du $\text{CO}_{2 \text{ air}}$ dans l'eau de mer forme du CO_2 dissous ($\text{CO}_{2 \text{ aq}}$) qui peut directement réagir avec des molécules d'eau pour former de l'acide carbonique (H_2CO_3) instable qui va se dissocier principalement en ions bicarbonates (HCO_3^-). Ce dernier, en fonction du pH peut se transformer en carbonates (CO_3^{2-}). Avec l'augmentation du $\text{CO}_{2 \text{ air}}$ d'origine anthropique, les $p\text{CO}_2$ sont modifiées et s'accompagnent d'une augmentation de la concentration en $\text{CO}_{2 \text{ aq}}$. L'étape de dissociation de H_2CO_3 sous ses deux formes entraîne la libération de protons qui est responsable de l'acidification des océans. Avec un pH actuel de l'ordre de 8,1, la forme majoritaire de carbone inorganique est principalement la forme HCO_3^- avec une concentration moyenne estimée à 2 mM alors que celle du $\text{CO}_{2 \text{ aq}}$ est 80 à 400 fois moins concentrée (5 à 25 μM).

La Rubisco (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase, EC 4.1.1.39) est une enzyme composée de 2 sous-unités (rbcL et rbcS) capable de fixer le carbone inorganique dans la biomasse en initiant le cycle de Calvin. Cette enzyme clé, présente chez tous les eucaryotes photosynthétiques, ne fixe que la forme CO_2 et possède une affinité relativement peu élevée pour cette molécule. La Rubisco possède également une fonction oxygénase réduisant la photo-assimilation du carbone inorganique dans la biomasse organique. Lorsque la Rubisco est oxydée par une molécule d'oxygène (O_2), cette enzyme produit du glycolate ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) qui peut inhiber le cycle de Krebs. Le glycolate est donc sécrété activement à l'extérieur de la cellule ou encore recyclé par une voie relativement énergivore appelée la photorespiration. La production de glycolate et l'activation de la photorespiration entraînent une perte de carbone et d'énergie conséquente pour la cellule (Obata et al 2013).

Avec l'apport des génomes des diatomées, il a été montré que *T. pseudonana* et *P. tricornutum* possédaient l'ensemble des gènes de la photorespiration et que cette voie est active. Cependant la glycérate kinase (EC 2.7.1.31), dernière enzyme de la photorespiration permettant de transformer le glycérate en 3-P-glycérate, n'a pas été identifiée. La majorité des hétérochontes et alvéolates ne présentent également pas cette enzyme contrairement aux cyanobactéries et aux algues vertes et rouges (Kroth et al 2008).

Etant donné que la diffusion du CO_2 dans l'eau est 5 000 fois plus lente que dans l'air et que la concentration en $\text{CO}_{2 \text{ aq}}$ est très faible, l'acquisition de carbone inorganique par le phytoplancton est

limitée. Pour pallier ce problème, la majorité des microalgues a développée des mécanismes d'acquisition du carbone (CCM) pour accumuler une concentration suffisamment élevée de CO₂ proche de la Rubisco et ainsi favoriser une fixation optimale de carbone tout en évitant l'induction de la photorespiration (Obata et al 2013). Dans la littérature deux grands types de CCM sont décrits :

- **Les CCM biophysiques**

Ce type de CCM permet le transport des formes inorganiques du carbone (HCO₃⁻ et CO₂) du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule en faisant intervenir des transporteurs et des AC. Ces enzymes catalysent l'hydratation réversible du CO₂ et sont réparties en trois classes (α, β et γ) qui auraient été acquises indépendamment au cours de l'évolution.



Malgré les différences de séquence et de structure tridimensionnelle, le site actif fonctionne de la même manière en utilisant un atome de zinc (Zn) essentiel dans la catalyse. La classe α représente l'unique classe présente chez les vertébrés. Chez ces derniers, ces AC sont par exemple retrouvées à la membrane des érythrocytes pour libérer du CO₂ en fonction des besoins de l'organisme et participent à la régulation le pH sanguin (Tripp et al 2001). D'autres classes largement moins distribuées existent également comme les δ, ε et ζ (Tableau II).

Tableau II : Caractéristiques des anhydrases carboniques décrites chez les organismes vivants.

Classe	Metal du site actif	Identification	Particularité(s)
α	Zinc	Vertébrés, algues, plantes et eubactéries	Monomère de 30kDA avec 3 histidines modelant l'atome de zinc
β	Zinc	Plantes, cyanobactéries, microalgues, eubactéries, archéobactéries et fungi	Une histidine et 2 cysteines modelent l'atome de zinc
γ	Zinc	Archéobactéries, eubactéries, plantes et algues	Contient 3 atomes de zinc
δ	Zinc	Quelques micro-algues dont les diatomées	NA
ε	Zinc	Bactéries	Une histidine et 2 cysteines modelent l'atome de zinc
ζ	Cadmiun (ou Cobalt)	Diatomées	Une histidine et 2 cysteines modelent l'atome de cadmiun

Les AC de classe ζ ont été décrites pour la première fois chez *Thalassiosira weissflogii* (Lane et al 2005), et ne sont retrouvées que chez les diatomées (Tachibana et al 2011). Elles sont également nommées anhydrase carbonique cadmium (CDCA) à cause de leur capacité à utiliser le cadmium (Cd) à la place de l'atome de Zn au niveau du site actif. Le changement spontané entre Cd/Zn permettrait de combler les potentielles carences dans l'environnement de l'un de ces 2 atomes, permettant ainsi aux cellules de s'acclimater à des environnements limités comme celui de l'océan ouvert. Ainsi, il a été proposé que l'utilisation du cadmium par les CDCA externes pourrait avoir joué un rôle dans l'expansion et la diversification des diatomées lors du Cénozoïque où la concentration en CO₂ était faible (Xu et al 2008). Nous verrons dans le Chapitre II, qu'il existe probablement 4 CDCA chez *T. weissflogii* alors que 2 séquences sont référencées dans l'ensemble de la littérature à ce jour. Le gène CDCA1 posséderait une séquence nucléotidique constituée de 617 amino-acides avec trois régions répétées de 178 amino-acides chacun. Une recherche d'amplification de gènes par oligos dégénérés de séquence CDCA-like chez 15 diatomées (*Thalassiosira oceanica*, *Nitzschia cf. pusilla*, *Skeletonema costatum*, *Dictylum brightwellii*, *Chaetoceros calcitrans*, *Asterionellopsis glacialis*, *Thalassiosira rotula* et *Phaeodactylum tricornutum*) proches phylogénétiquement de *T. weissflogii* a permis de proposer que des gènes codant pour cette classe existeraient et seraient présents chez au moins 8 espèces (Park et al 2007). Cette même étude n'a pas permis de mettre en évidence ce gène chez les algues vertes ou les coccolithophoridés.

En plus des CDCA, les diatomées semblent posséder un transporteur HCO₃⁻ au niveau de la membrane plasmique (SLC4) permettant de pomper directement du HCO₃⁻ du milieu extérieur vers le cytoplasme. Les SLC4, d'abord identifiés chez les mammifères, possèderaient 10 à 14 segments transmembranaires et seraient divisés en 2 groupes : les co-transporteurs Na⁺/HCO₃⁻ et les échangeurs Cl⁻/HCO₃⁻ (Romero et al 2013). Plusieurs gènes potentiellement codant pour des SLC4 ont récemment été retrouvés chez les diatomées (10 pour *P. tricornutum*), et des évidences physiologiques suggèrent que ces transporteurs jouent un rôle primordial dans les CCM chez les microalgues (Nakajima et al 2013). De manière assez surprenante, les SLC4 des diatomées ne présentent aucune homologie avec les autres transporteurs bicarbonates des autres algues connues à ce jour suggérant une acquisition ultérieure au premier évènement d'endosymbiose (Badger et al 2002).

- **Les CCM biochimiques**

Tout comme les CCM de types biophysiques, ceux dits biochimiques font référence au métabolisme C4. Ce métabolisme permet de synthétiser dans le cytoplasme des composés organiques de type C4 à partir du CO₂ incorporé. Ces composés C4, tels que le malate ou l'oxaloacétate, vont être décarboxylés

au niveau du chloroplaste pour fournir du CO₂ proche de la Rubisco. Ce mécanisme est largement retrouvé chez les plantes. D'après l'état actuel des connaissances, il semblerait que les diatomées soient les seuls hétérochontes à posséder ce type de métabolisme. De nombreuses enzymes appartenant au métabolisme C₄ ont été identifiées chez *T. pseudonana* et *P. tricornutum* comme la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.32), la pyruvate ortho-phosphate dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1) ou la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31). Parmi ces trois enzymes essentielles au métabolisme C₄, la PEPC, qui catalyse l'addition d'un anion bicarbonate HCO₃⁻ au phosphoénolpyruvate (PEP) donnant de l'oxaloacétate, est l'une des enzymes la plus étudiée. Il a été montré que son inhibition diminue de 90 % l'efficacité photosynthétique dans une culture de *T. weissflogii* acclimatée à une faible concentration en CO₂ (10 μM) (Reinfelder et al 2004).

En plus d'apporter un fort avantage écologique dans l'acquisition et la fixation du carbone inorganique (Reinfelder et al 2000), le métabolisme C₄ conférerait également d'autres avantages comme dans la dissipation de l'énergie lumineuse en excès mais également dans la régulation de l'homéostasie de pH (Obata et al 2013).

4. Autres caractéristiques des diatomées

a) La vacuole

Tout comme les algues vertes, les plantes terrestres et d'autres algues hétérochontes, les diatomées possèdent une grande vacuole cytoplasmique douée de multiples rôles. La vacuole, composée majoritairement d'eau, constitue une réserve d'ions minéraux (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ et NO₃⁻) importante et possède un pH acide de l'ordre de 5,0 à 5,5 (soit 2 unités pH de moins que le cytosole). Pour réguler les flux entre le cytoplasme et l'intérieure de la vacuole, on retrouve de nombreux transporteurs qui ont un rôle majeur dans les différents flux transmembranaires tels que les aquaporines et les transporteurs de protons (V-ATPases, H⁺-PPases,...) (Bussard and Lopez 2014).

- **Incorporation efficace et stockage massif des nutriments**

Les diatomées peuvent incorporer et stocker de nombreux nutriments dans leur vacuole. Les chrysolaminaranes, sucre de réserve soluble présentant des liaisons carbone de type β-1,3, s'accumulent dans la vacuole et peuvent représenter jusqu'à 20 % de son contenu (Kroth et al 2008,

Obata et al 2013). A l'inverse le sucre de stockage des algues vertes et rouges, à savoir l'amidon, est stocké respectivement dans les chloroplastes et dans le cytosol sous forme cristallisée qui est une forme moins rapidement mobilisable (Shimonaga et al 2008, Wilhelm et al 2006).

Dans les phénomènes d'incorporation et de stockage des ions minéraux et autres composés, le gradient électrochimique créé entre le cytoplasme et la vacuole joue un rôle majeur. Dans certains cas, l'accumulation de composés plus concentrés dans la vacuole que dans le cytosol est permise grâce à des mécanismes de transports actifs. Ces transports utilisent la force proton-motrice et la différence de potentiel transmembranaire instaurée entre la vacuole et le cytoplasme pour transporter des molécules contre le gradient électrochimique (Hedrich and Schroeder 1989, Kluge et al 2003). La régulation du pH intra-vacuolaire réalisée par les V-ATPases et les H⁺-PPases est un mécanisme fondamental. En tant que transporteurs électrogéniques agissant en permanence, la translocation de protons génère aussi un gradient pH et une différence de potentiel transmembranaire qui sont tous deux favorables à l'entrée dans la vacuole d'anions par transport actif secondaire et qui permettrait la régulation du pH cytosolique. La différence de potentiel transmembranaire est la principale force permettant le transport de Cl⁻, du malate et du NO₃⁻. Le gradient électrochimique des protons est aussi utilisé pour l'import via des anti-porteurs des ions Zn²⁺, Ca²⁺, Mg⁺, Na⁺ et Cd²⁺(Maeshima 2000, Schumacher 2006). Dans le Chapitre III, nous discuterons plus en détail du rôle des différentes pompes à protons vacuolaires (V-ATPases ou H⁺-PPases) chez les diatomées tout en essayant de les replacer dans un contexte évolutif.

Grâce à ces mécanismes complexes, les ions minéraux et les différents composés peuvent être stockés massivement dans la vacuole. Durant les périodes moins favorables ou de carence, ces nutriments pourront être utilisés pour maintenir une activité métabolique relativement importante. Les cellules sont également capables de modifier la taille de leur vacuole pour augmenter la surface d'échange avec l'extérieur.

- **Réserve hydrique : rôle des aquaporines vacuolaires**

La vacuole est essentiellement constituée d'eau qui est facilement et rapidement utilisable par la cellule. L'eau ne pouvant pas facilement diffuser à travers les phases lipidiques des biomembranes (flux quasiment négligeable) son transport est assuré par des transporteurs spécialisés : les aquaporines. Ce sont de véritables "canaux à eau" pour le passage des molécules H₂O au travers des membranes plasmiques et intracellulaires (Preston et al 1992). Les aquaporines, organisées en tétramère, permettent ainsi un flux efficace d'eau dans le sens des potentiels hydriques décroissants (Verkman and Mitra 2000). Chez la levure, l'efficacité de ce transport a été estimée à 10⁹ molécules d'eau par seconde qui pourraient passer à travers une seule sous-unité d'aquaporine pour un gradient de pression de

1 MPa (Fujiyoshi et al 2002). Contrairement aux premiers résultats, qui suggéraient qu'elles soient spécifiques aux molécules d'eau, des études récentes menées notamment chez les plantes ont montré que certaines aquaporines étaient aussi capables de transporter des petites molécules comme le CO₂, l'H₂O₂, le bore ou l'acide silicique (Maurel 2007). En effet, une aquaporine rencontrée notamment chez le riz permet le transport de l'acide silicique (Ma et al 2006).

Chez les diatomées séquencées, 10 gènes d'aquaporine ont été retrouvés : 2 chez *T. pseudonana* (TpMIP1, TpMIP2), 2 chez *T. oceanica* (ToMIP1, ToMIP2), 5 chez *P. tricornutum* (PtMIP1, PtMIP2, PtMIP3, PtMIP4, PtMIP5) et 1 chez *Synedra acus*. De manière assez intéressante, les aquaporines des algues chromophytes possèdent une structure qui diverge quelque peu de la structure classique avec la présence d'un motif particulier suggérant une histoire évolutive spécifique à cette lignée (Khabudaev et al 2014, Petrova et al 2013). Le manque d'informations relatives aux aquaporines des diatomées ne permet pas pour le moment de comprendre leurs rôles et leurs implications réelles dans la physiologie cellulaire. Cependant, des expériences non publiées du laboratoire ont permis de mettre en évidence que certaines des aquaporines de *P. tricornutum* étaient localisées à la membrane plasmique, à la membrane vacuolaire mais aussi vraisemblablement dans des compartiments ou des régions non déterminées de la cellule. L'étude de ces gènes reste selon moi l'un des aspects importants pour mieux comprendre leurs régulations et leurs implications éventuelles dans les mécanismes de réponses aux stress environnementaux. Nous verrons également un peu plus tard que les variations de taille de la vacuole par des mouvements d'eau constituent un réel avantage à la migration des diatomées planctoniques.

b) Le cycle de l'urée

En 2006, la découverte d'un cycle fonctionnel de l'urée chez les diatomées a été une réelle surprise. Identifié comme faisant intervenir des gènes d'origine bactérienne, ce cycle est un exemple intéressant de gènes transférés horizontalement (HGT). Ce cycle de l'urée est une voie métabolique commune aux mammifères permettant d'incorporer l'excès d'azote dans l'urée et de l'éliminer. Il semblerait qu'il puisse jouer plusieurs rôles chez les diatomées (Allen et al 2011). Ce cycle débute dans la mitochondrie par l'enzyme mitochondriale carbomoyl phosphate synthase (CPS). Cette enzyme permet l'hydrolyse active d'ions ammonium (NH₄⁺) et bicarbonate (HCO₃⁻) en carbomoyl phosphate (CH₂NO₅P²⁻). Ce dernier va ensuite être métabolisé par le cycle de l'urée pour former différents composés organiques tels que le fumarate, l'arginine ou la citrulline (Figure 13).

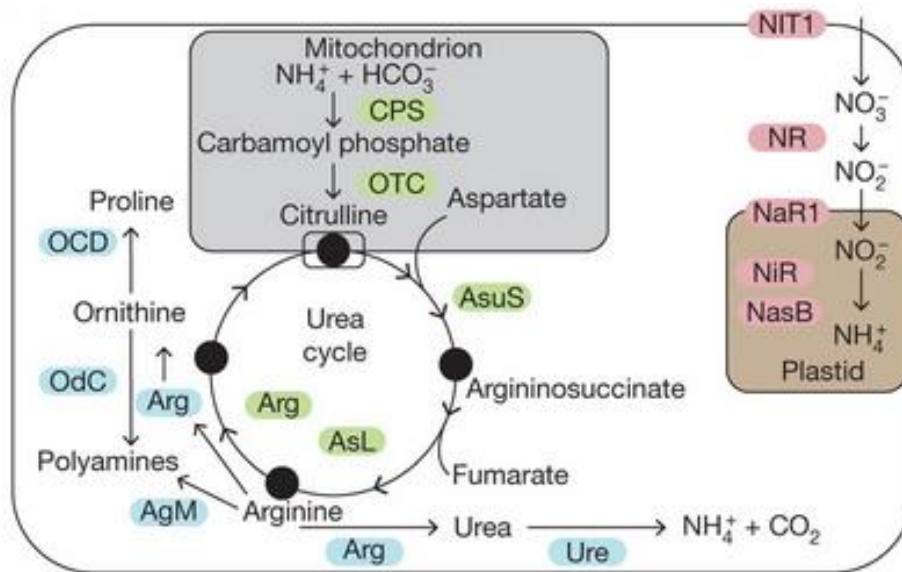


Figure 13 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans le cycle de l'urée et l'assimilation des nitrates chez les diatomées. Ce schéma provient de l'article de Allen *et coll.* (Allen et al 2011). Les différentes abréviations sont : *Agm*, agmatinase; *Arg*, arginase; *AsL*, argininosuccinate lyase; *AsuS*, argininosuccinate synthase; *CPS*, carbamoyl phosphate synthase; *Nar1*, plastid nitrite transporter; *NasB*, NADPH nitrite reductase; *NiR*, ferredoxin nitrite reductase; *NiT1*, nitrate transporter; *NR*, nitrate reductase; *OCD*, ornithine cyclodeaminase; *OdC*, ornithine decarboxylase; *OTC*, ornithine transcarboxylase; *Ure*, urease.

De manière assez intéressante, les ions NH_4^+ et de HCO_3^- provenant du catabolisme des acide-aminés et de la photorespiration (Allen et al 2006) sont donc rapidement et efficacement redistribués dans la matière organique. L'arginine synthétisée est utilisée comme précurseur dans la synthèse de la proline, un acide-aminé ayant un rôle osmoprotection important, mais également dans celle des longues chaînes de polyamines. Ces dernières sont impliquées dans la biosynthèse du frustule.

5. Variétés des modes de vie

Certains auteurs ont proposé que la croissance et la distribution des algues marines seraient principalement contrôlées par la température, la lumière, la concentration en nutriments, les mouvements des masses d'eau ou encore la salinité (Kirst 1990). Cette distribution peut cependant être modifiée en fonction de la capacité d'acclimatation et de tolérance à différents facteurs biotiques et abiotiques conduisant ainsi à l'existence de différents assemblages. Les diatomées sont retrouvées dans la quasi-totalité des assemblages aquatiques allant des eaux glaciaires arctiques aux rivières d'altitude en passant par les eaux saumâtres acides des mangroves. Même si la majorité des diatomées sont

planctoniques, benthiques ou épibiontiques, on retrouve des modes de vie plus originaux comme tychoplanctonique qui alterne une vie benthique/planctonique en fonction de l'environnement (Maulood and Hinton 1979) ou encore subaérienne (Camburn 1982). Dans les parties suivantes, nous approfondirons les connaissances actuelles sur les modes de vies les plus largement distribués et sur les facteurs biotiques pouvant modifier les assemblages.

a) Les diatomées planctoniques

La surface océanique représente environ 70 % de la surface totale du globe. En prenant en compte que la zone euphotique peut s'étaler de quelques mètres jusqu'à environ 200 mètres de profondeur (Doron et al 2007), le volume de niches écologiques habitables est donc considérable.

Contrairement aux algues chromophytes qui présentent de nombreuses lignées planctoniques (cryptophytes, dinoflagellés, haptophytes et diatomées), les microalgues vertes et rouges planctoniques sont beaucoup moins nombreuses et diversifiées. Hormis les algues rouges du genre *Rhodosorus*, *Rhodella* et *Porphyridium* et les algues vertes prasinophytes, aucun autre représentant n'est planctonique (Graham and Wilcox 2000). Malgré que les cyanobactéries du genre *Prochlorococcus* soient parmi les organismes phytoplanctoniques les plus abondants (Armbrust 2009), les diatomées sont la lignée eucaryotique dominante de ce mode de vie en terme de diversité et d'impact sur la structuration de l'écosystème.

Le mode de vie pélagique requiert des adaptations spécifiques pour prévenir la prédation et surtout se maintenir et se déplacer dans la colonne d'eau. En fonction des écosystèmes, les eaux peuvent être plus ou moins stratifiées c'est-à-dire que la zone euphotique optimale est spatialement séparée de celle contenant les nutriments (Ganf and Oliver 1982). Cette structuration spatiale suggère l'importance d'une migration verticale pour le phytoplancton. Dans la suite de cette partie, nous discuterons essentiellement des différents mécanismes mis en place par les diatomées pour assurer une flottaison et migration à travers différents exemples.

Une étude menée par Cullen en 1985 sur la migration journalière des dinoflagellés a amené des arguments en faveur des avantages écologiques que confère une telle migration. En effet, grâce à leur double flagelle, les dinoflagellés peuvent atteindre des vitesses de nage de l'ordre de $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ et parcourir verticalement environ 10 m par jour. Ce comportement migrateur suit un rythme journalier pour répondre à différents besoins métaboliques. Au cours de la journée, les dinoflagellés migrent vers le haut de la colonne d'eau où la disponibilité en lumière est importante pour permettre la synthèse et le stockage des carbohydrates. Durant la nuit, ces mêmes cellules migrent vers le bas de la colonne d'eau où la concentration en nutriments est importante permettant l'incorporation et le stockage des

nutriments essentiels. Cullen insiste sur le fait que cette migration confère des avantages physiologiques permettant d'optimiser la fitness de ces organismes (Cullen 1985).

On peut alors se demander quels sont les mécanismes à la base de la migration chez les diatomées ?

Malgré la perte de leur flagelle dans leur forme végétative, les diatomées planctoniques sont également capables d'adopter un comportement migratoire. Pour illustrer ce phénomène, nous avons choisi les diatomées du genre *Rhizosolenia* qui vivent dans les grands gyres océaniques. Les diatomées de ce genre peuvent s'agrèger entre elles pour former des "*Rhizosolenia mats*" allant de 1 à 30 cm de largeur. Ces structures macroscopiques possèdent une vitesse migratoire impressionnante de l'ordre de $6,4 \text{ m.h}^{-1}$ et peuvent atteindre des profondeurs allant de 80 à 150 m tout en maintenant une croissance homogène. Ce comportement migratoire est déclenché en réponse à un stress azoté qui va initier la migration sous la nitricline et ainsi l'incorporation et le stockage de nitrites (Villareal et al 1993, Villareal et al 1999). La diatomée *Ethmodiscus*, aussi connue sous le nom *Coscinodiscus regius*, est l'une des diatomées la plus large connue à ce jour avec un diamètre de 1,9 mm et un volume de $10^9 \mu\text{m}^3$. Ainsi malgré une migration négative qui peut atteindre $\sim 100 \text{ m.j}^{-1}$, cette diatomée est couramment retrouvée dans les premiers mètres de la colonne d'eau. L'hypothèse avancée pour justifier cette présence en surface serait que des variations de composition ionique intracellulaire permettraient une migration positive des cellules (Villareal 1992). Avec une densité cytoplasmique légèrement supérieure à celle de l'eau ($d_{\text{cytoplasme}} = 1,03 \text{ à } 1,10$; $d_{\text{eau de mer}} = 1,02$), la vacuole des diatomées semble être l'un des moyens permettant une migration positive. En effet cette organelle possède une concentration ionique plus faible que celle de l'eau de mer et donc une densité plus basse. La modification de la taille de la vacuole pourrait permettre de modifier la densité totale des cellules et ainsi réguler leurs positionnements dans la colonne d'eau.

Cependant, aussi bien pour les petites diatomées marines que pour les diatomées planctoniques d'eau douce, ce mécanisme ionique ne peut pas s'appliquer. En effet les petites diatomées possèdent une vacuole trop petite pour assurer une flottabilité positive. Du fait de la très faible concentration en ions des écosystèmes d'eau douce, la vacuole des diatomées de ces environnements est plus dense et ne peut plus être utilisée dans la migration positive. Pour pallier ce problème, ces diatomées s'entourent d'une couche plus ou moins épaisse de polysaccharides sécrétés possédant une densité faible et ainsi assurer une flottabilité positive. Cette gangue mucilagineuse est également retrouvée chez les autres diatomées étant donné qu'elle est un moyen relativement efficace d'isoler partiellement la cellule de son environnement (Hoagland et al 1993, Myklesstad 1995, Passow 2002). Cependant, ce mécanisme de flottaison, également utilisé chez d'autres algues unicellulaires

planctoniques ne possédant pas de vacuole, serait plus coûteux en terme énergétique car il fait intervenir les stocks de carbone organique (Whitton 1999).

Alors que la grande majorité des diatomées planctoniques sont centriques, il existe quelques exemples de diatomées pennées planctoniques. Les plus connus sont sûrement les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* (Amato et al 2005). De manière assez intéressante, il existe des diatomées pennées araphides, généralement benthiques, qui possèdent des adaptations à la vie planctonique. Chez ces diatomées, une potentielle réduction de la densité de leur frustule leur permettrait une vie pélagique. Cette acquisition aurait été contrainte par le mode de reproduction sexuée (isogamie) et aurait permis de surpasser le problème de non mobilité des gamètes mâles et femelles. Dans les océans modernes, les diatomées pennées araphides constituent désormais un membre important du phytoplancton malgré une origine benthique (Kooistra et al 2009).

b) Les diatomées benthiques

Les diatomées benthiques dominent souvent le microphytobenthos (Smith and Underwood 2000) et forment ce que l'on appelle un biofilm en association avec des cyanobactéries, d'autres microalgues et des organismes hétérotrophes tels que les bactéries, les champignons et les protozoaires. Les biofilms regroupent des micro-organismes aux métabolismes divers et complémentaires et correspondent à une sorte de "micro-écosystèmes" extrêmement dynamique répondant aux fluctuations environnementales. Ces structures possèdent une organisation en strates dont la strate la plus externe est composée des micro-organismes photosynthétiques. Ces micro-organismes génèrent de l'énergie par fixation du carbone inorganique fournissant ainsi un substrat organique utilisable par les organismes hétérotrophes placés en dessous d'eux. Les bactéries et les diatomées sont souvent à l'origine de l'initiation et de la formation du biofilm et représentent les producteurs primaires les plus importants. Dans certains biofilms, jusqu'à 50 % du carbone les composant peuvent être produit par les diatomées. Les biofilms ont plusieurs intérêts dont la stabilisation des substrats meubles, la structuration de la chaîne alimentaire et la fixation des nutriments essentiels tels que l'azote et le phosphore. Dans les assemblages des biofilms, les diatomées benthiques sont majoritairement des diatomées pennées raphides (Figure 7). Comme nous l'avons vu précédemment, ces diatomées sont douées de mobilité et peuvent "glisser" sur le biofilm pour optimiser ou préserver leur physiologie.

De la même manière que pour les diatomées planctoniques, l'assemblage des diatomées benthiques peut être modifié par les pressions de prédatons. Certains brouteurs sélectionnent leurs proies alors que d'autres non. Cette sélection semble conditionnée par la taille de l'organisme brouteur

et surtout la largeur de sa bouche. Les brouteurs possédant une bouche relativement large n'effectuent aucune sélection des organismes broutés (Peterson 1987). Les autres brouteurs de plus petite taille effectuent une sélection des algues broutées au moment de l'ingestion (Tall et al 2006). Cette sélection dépend de la taille de la cellule (taille optimale pour une largeur de bouche donnée), de la facilité de broutage (densité du frustule, présence d'épines siliceuses, synthèse de composés aldéhydes tératogènes) et également de la qualité nutritionnelle (Cox 2011). Une étude plus qu'originale a montré que les diatomées broutées pouvaient résister à la fois à l'ingestion et la digestion pour ressortir vivante de l'organisme brouteur. Cette capacité de résistance à des milieux hostiles tel que l'estomac traduit une grande robustesse des systèmes de protection et de préservation de l'intégrité cellulaire (Peterson et al 1998).

c) Les diatomées épibiontiques

A la différence des diatomées benthiques ou planctoniques, certaines diatomées peuvent vivre de manière épibiontique. Ce mode de vie correspond à des organismes qui se servent d'autres organismes comme support pour leur croissance et leur développement. Étudié pour la première fois au XX^e siècle, ce mode de vie peut être divisé en deux sous-catégories : l'épiphytisme et l'épizooïsme lorsque l'hôte est respectivement un organisme autotrophe (macro et microalgues) ou hétérotrophe. À l'inverse du parasitisme, les diatomées épibiontiques ne "prélèvent" aucun élément au détriment de l'hôte mais s'en servent uniquement comme support (Tiffany 2011). On peut alors se demander l'intérêt de ce mode de vie comparé à la vie planctonique et benthique ?

La diatomée polaire du genre *Arachnoidiscus* possède un frustule très dense du fait de sa taille importante (0,4 mm de diamètre). Bien que son frustule possède des propriétés optiques intéressantes (Ferrara et al 2014), il constitue une structure très lourde ne lui permettant pas de vivre de manière planctonique. Pour ne pas sédimenter et être enfouie dans le sédiment, cette diatomée sécrète une gangue mucilagineuse pour pouvoir adhérer aux autres organismes. D'autres diatomées, comme par exemple *Hyalodiscus stelliger* et *Toxarium undulatum*, sécrètent par l'une des extrémités des valves un mucilage qui va s'accumuler largement au niveau de la zone de contact cellule/hôte pour former une sorte de rembourrage mucilagineux permettant aux diatomées de se tenir droites. Ce système, retrouvé également pour certaines diatomées benthiques, semble assez efficace pour maximiser l'adhérence tout en laissant la majorité de la surface cellulaire au contact avec l'environnement. Une étude a montré que ce système d'adhérence est très efficace car, malgré un support enduit de peinture anti-fouling non toxique *INTERSLEEK 425*, la diatomée *Toxarium undulatum* peut quand même s'y fixer. Une des raisons avancées pour expliquer cette capacité d'adhérence viendrait du fait que le mucilage sécrété est une

sorte de bio-polymère composé de polysaccharides incluant différents composants protéiques (Dugdale et al 2006). D'autres diatomées sécrètent une sorte de "tige" qui leur permet de maintenir le contact avec l'hôte dont la composition et la formation restent, à tort, peu étudiées.

Parmi la multitude d'organismes hôtes existants, les diatomées épibiontiques semblent avoir des préférences de support. Dans une étude s'intéressant à l'abondance des diatomées épiphytiques de la péninsule antarctique, 50 espèces de diatomées ont été identifiées et chaque espèce semble posséder une préférence de substrat. Les rhodophycées sont les macroalgues les plus colonisées loin devant les phéophycées et les chlorophycées (Al-Handal and Wulff 2008). Cette préférence de support peut également être observée au sein d'une même famille de macroalgues en fonction des différentes architectures. Plus la complexité architecturale de la macroalgue est importante et plus la densité des diatomées épiphytes sera forte. Par exemple dans la famille des phéophycées, le *Fucus vesiculosus*, espèce très ramifiée, possède une abondance de diatomées 1 000 fois supérieure différente de celles de la *Laminaria sacchalina* qui possèdent un thalle assez lisse sans ramification (Totti et al 2009). Cette préférence de substrat peut aussi être conditionnée par la sécrétion de composés inhibant la croissance des diatomées par certaines macroalgues (Maples 1984). Des études récentes ont également recensé des cas d'épiphytisme de diatomées sur d'autres diatomées (Tiffany and Lange 2002). Même si l'épiphytisme semble être un mode de vie largement utilisé par les diatomées, l'épizoïsme semble être beaucoup plus rare et moins étudié.

Les diatomées épizoïques peuvent être retrouvées sur une grande variété d'organismes hétérotrophes allant du zooplancton comme les copépodes jusqu'aux baleines en passant par les krills ou encore les oiseaux plongeurs. Contrairement aux diatomées épiphytiques, le système d'adhérence serait très spécifique à l'hôte. En vue des nombreuses incertitudes entourant ces diatomées, nous ne détaillerons pas plus ce mode de vie.

D'une manière générale les diatomées épibiontiques ont un cycle de vie beaucoup plus long que les autres diatomées ce qui pourrait expliquer leur relatif faible nombre (Chaffey 2011). Un des avantages de ce mode de vie résiderait peut-être dans la possibilité de dispersion permettant à ces diatomées de coloniser de nouvelles niches potentiellement difficiles d'accès pour des espèces planctoniques.

d) Modification des assemblages par des facteurs biotiques

Nous avons vu précédemment que certaines diatomées étaient adaptées à un mode de vie particulier et que les assemblages pouvaient être modifiés par des facteurs physico-chimiques.

Cependant, d'autres facteurs comme les virus ou les diatomées elles même peuvent modifier la composition de ces assemblages.

Les virus représentent un facteur important dans la régulation des dynamiques écologiques des microalgues (Tomaru and Nagasaki 2011). En effet, les infections virales lors des blooms contribuent à la modification temporelle des assemblages phytoplanctoniques. Ce n'est qu'en 2004 que les premiers virus spécifiques aux diatomées ont été identifiés comme le virus à ARN nommé *RsetRNAV* de *Rhizosolenia setigera*. Parmi la dizaine de virus caractérisés à ce jour, nous pouvons également citer le virus à ARN nommé *CtenRNAV* de *Chaetoceros tenuissinus* qui s'accumule dans le cytoplasme et provoque la lyse cellulaire lors des blooms (Nagasaki et al 2004). Dans l'évolution des diatomées, comme dans celle de nombreux autres organismes, il paraît probable que les échanges de matériel génétique aient eu lieu avec des virus (Nagasaki 2008).

De par leur métabolisme ou même la structure de leur frustule, les diatomées peuvent modifier et influencer leur environnement. En effet, certaines diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* sont capables de synthétiser, lors de blooms estuariens, une neurotoxine puissante appelée acide domoïque. Cette toxine peut ainsi diminuer la compétitivité des autres espèces partageant la même niche écologique et entraîner des problèmes sanitaires importants (Prince et al 2013). D'autres diatomées non toxiques peuvent également relâcher dans l'environnement des substances lipidiques ou polysaccharidiques pouvant entraîner des problèmes sanitaires et économiques importants. L'architecture du frustule peut également poser des problèmes. La diatomée *Chaetoceros concavicornis* possède de grandes épines siliceuses appelées *setae* qui peuvent gravement endommager les branchies des poissons dès une concentration de 5 cellules/mL et ainsi diminuer certains rendements aquacoles (Yang and Albright 1992).

Caractéristiques des diatomées

Les algues chromophytes représentent le type d'algues contenant le plus d'espèces comparé aux algues vertes et rouges. Cette diversification pourrait être attribuée à l'acquisition de caractères relativement spécifiques comme : une composition pigmentaire permettant de capter un plus large spectre de longueurs d'onde (Chl_c et fucoxanthine), une capacité d'incorporation et de recyclage des nutriments (N, P, ...) qui semblent plus efficaces, un stade de dormance aussi retrouvé chez des algues vertes ainsi qu'une reproduction sexuée. Au sein des algues chromophytes, les diatomées représentent le taxon le plus diversifié avec 100 000 espèces estimées. Cette diversification et leurs adaptations à différents modes de vie (planctonique, benthique, épibiontique, ...) pourraient s'expliquer par certaines caractéristiques acquises au cours de l'évolution comme : un métabolisme d'acquisition du carbone de type C4 commun aux plantes, un cycle de l'urée, une vacuole et un frustule. De par leurs importances et leurs diversités, les diatomées représentent un maillon essentiel dans la structuration des écosystèmes.

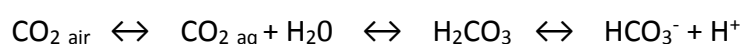
C. Acclimatation des diatomées aux fluctuations environnementales

Dans la première partie de cette analyse bibliographique, nous avons présenté un certain nombre de caractéristiques des diatomées acquises au cours de l'évolution. Ces différentes adaptations pourraient être l'une des explications possibles au fait que les diatomées peuvent dominer un grand nombre d'assemblages aussi bien planctoniques que benthiques. Dans cette partie nous nous proposons de discuter de la capacité et des stratégies d'acclimatation des diatomées qui leurs permettent de répondre aux contraintes environnementales et aux changements globaux. L'acclimatation correspond à une réponse transitoire et réversible entre le début du stress et le processus de sélection naturelle qui fixe définitivement ces caractéristiques au niveau génomique (adaptation). Pour essayer d'illustrer ces mécanismes d'acclimatation, qui seront analysés dans les Chapitres II et IV de ce manuscrit de thèse, nous avons choisi de focaliser notre étude sur deux facteurs clés à savoir l'impact de l'acidification des océans et les variations de salinité estuariennes et côtières.

1. Impact des variations de pH sur les diatomées

a) Acidification des océans : causes et conséquences

Depuis 250 ans, le CO_2 air a augmenté de près de 40 % passant de 280 ppm lors de l'ère préindustrielle à 384 ppm en 2007. Cette augmentation sans précédent au niveau de sa rapidité est pilotée par la combustion des ressources de carbone fossile, la déforestation et aussi la production de ciment (Harley et al 2006). Il est estimé que chaque jour nous relâchons 79 millions de tonnes de CO_2 dans l'atmosphère (Feely et al 2008). L'océan permet de capter pour un peu plus d'un tiers cette émission d'origine anthropique sans lequel le CO_2 air atteindrait 450 ppm aujourd'hui (Sabine et al 2004). En absorbant de manière passive davantage de CO_2 air, les océans tendent à s'acidifier :



De l'ère préindustrielle à nos jours, le pH océanique est passé de 8,21 à 8,1 et pourrait diminuer d'encore 0,3 à 0,4 unités si le CO₂ air atteint 800 ppm (Schnoor 2014). Le schéma ci-dessous, résume l'ensemble des conséquences de l'émission anthropique de CO₂ (Figure 14).

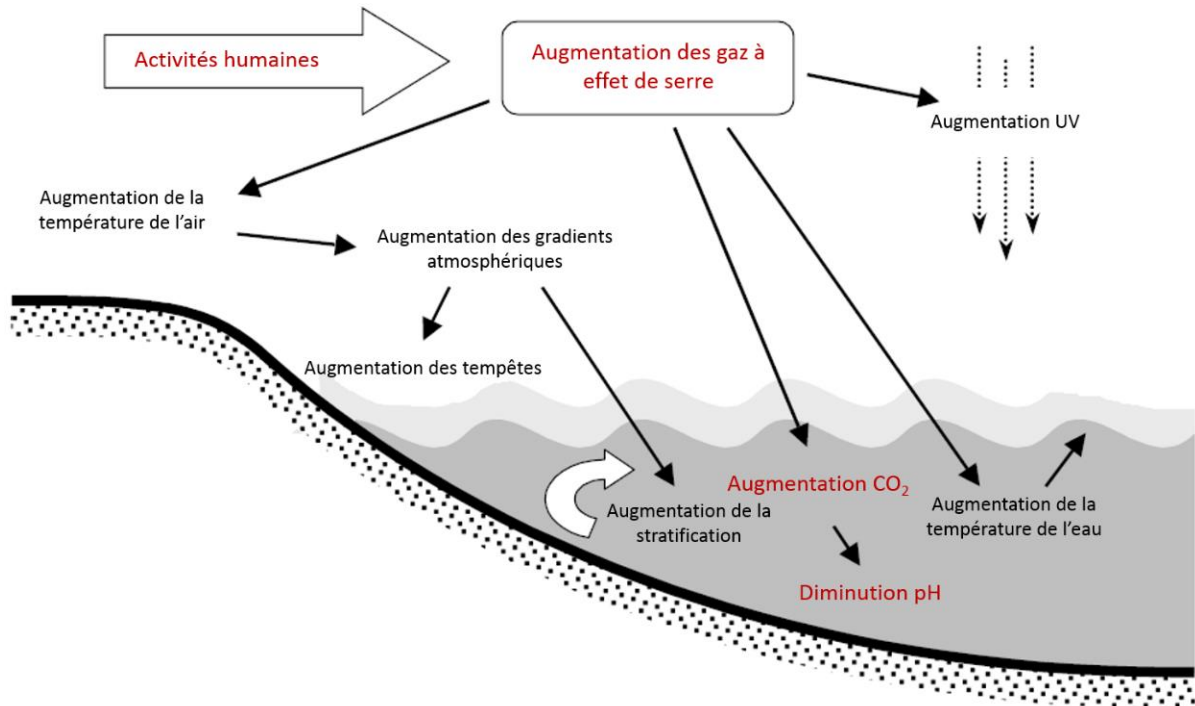
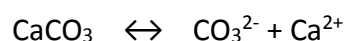


Figure 14 : Importance des changements abiotiques associés à l'émission anthropique de CO₂ atmosphérique. L'accumulation de gaz à effet de serre entraîne le réchauffement climatique, l'altération de la couche d'ozone laissant davantage passer les UV mais aussi l'acidification des océans. Ce schéma est inspiré de l'article de Harley *et coll.* (Harley et al 2006).

De manière assez surprenante, l'acidification des océans tend à être moins discutée que le réchauffement climatique alors qu'ils proviennent tous deux de la même cause : l'augmentation du CO₂ air. Cette augmentation engendre une multitude d'effets sur les écosystèmes marins comme une augmentation progressive de la stratification verticale des eaux, de la température, de la dissolution de certains métaux lourds toxiques (Gensemer 1991), de la concentration en carbone inorganique dissous (DIC) mais aussi une diminution dangereuse du pH. L'une des conséquences est la modification des équilibres de saturation des carbonates de calcium (CaCO₃) (Harley et al 2006).



Ainsi les calcites et aragonites, qui constituent les coquilles ou les squelettes des organismes marins incluant le plancton, les coraux, les algues corallines et de nombreux invertébrés marins, tendent sous

l'effet de l'acidification à se dissoudre en CO_3^{2-} et Ca^{2+} (Doney et al 2009). Les processus biologiques à la base de la formation des biomatériaux calcifiés impliquent généralement des mouvements actifs et passifs d'ions vers un compartiment spécialisé et isolé du milieu ambiant (Weiner and Dove 2003). Aujourd'hui, même si la réduction du taux de calcification ne fait plus beaucoup de doute, son intensité dépend des espèces considérées. Des données géochimiques datant du Paléocène-Eocène démontrent qu'une rapide acidification des océans (< 10 000 ans) se serait produite à cette époque à cause du relâchement $2,0 \cdot 10^{12}$ tonnes de carbone sous forme de méthane. Cette acidification aurait engendré la disparition massive de nombreux organismes calcifiants (Zachos et al 2005). Mieux comprendre la diversité des effets d'une diminution du pH est une question majeure aujourd'hui qui permettrait d'anticiper leurs effets biologiques et écologiques.

Cependant, les études se focalisant sur une augmentation de la pCO_2 / acidification du pH et son impact sur la biominéralisation et la physiologie ont été très majoritairement réalisées sur des temps courts de l'ordre de l'heure à quelques semaines. Les réponses des organismes calcifiants sont souvent complexes et se manifestent dans la plupart des cas par une diminution de la croissance et de leurs succès reproductifs (Weiner and Dove 2003).

Cependant que se passe-t-il à court et à long-terme chez les organismes minéralisant le silicium ?

b) Acidification et métabolisme cellulaire

Contrairement aux coccolithophoridés, les diatomées ont reçu beaucoup moins d'attention car l'une des suppositions est que la disponibilité en silicium et les stocks de silicates ne sont pas directement affectés par l'acidification des océans. Cependant, les quelques études existantes montrent que cette acidification a un impact direct chez les diatomées (Herve et al 2012 , Milligan et al 2004 , Sobrino et al 2008 , Tortell et al 2008 , Trimborn et al 2009, Wu et al 2014). De manière assez optimiste, plusieurs études s'accordent sur le fait que l'exposition à une diminution du pH permettrait une croissance plus rapide des diatomées (Wu et al 2014) et plus globalement une amélioration de la biomasse de la communauté phytoplanctonique (Feng et al 2009, Tortell et al 2008).

Sachant que la taille de la cellule détermine le taux de diffusion du CO_2 à travers la membrane plasmique, les diatomées de tailles importantes seraient celles à qui profiterait le plus de l'acidification. Une diatomée de grande taille, comme *Coscinodiscus wailesii* (diamètre $\sim 180 \mu\text{m}$) verrait son taux de croissance augmenter de $\sim 30 \%$ pour une augmentation de pCO_2 de 190 à 750 ppm alors que pour *T. weissflogii* (diamètre $\sim 10 \mu\text{m}$) l'accroissement ne serait que de $\sim 5 \%$ (Wu et al 2014). Une des explications avancées est que l'augmentation de pCO_2 s'accompagnerait d'une diminution de l'expression des gènes impliqués dans les CCM. Cette hypothèse a été confirmée lors d'une étude de

Burkhardt *et coll.* montrant qu'une augmentation de la $p\text{CO}_2$ s'accompagne d'une diminution forte de l'activité des AC extérieures et intérieures chez *T. weissflogii* et *P. tricornutum* (Burkhardt et al 2001). En plus des AC, d'autres enzymes et transporteurs impliqués dans les CCM verraient eux aussi leurs expressions diminuer en réponse à une acidification (Rost et al 2003). Une de nos hypothèses avancées dans le Chapitre II propose qu'une diminution relative de l'effort de transcription permettrait potentiellement à la cellule d'allouer davantage d'énergie pour sa croissance et ainsi optimiser sa fitness. Obata avance l'hypothèse que la régulation des CCM serait potentiellement impliquée dans l'homéostasie du pH cytosolique et dans la dissipation de l'énergie lumineuse en excès. Cette dissipation est nécessaire pour maintenir une efficacité photosynthétique optimale (Obata et al 2013). Chez *P. tricornutum*, la diminution des CCM en réponse à une acidification s'accompagne également d'une augmentation de la fixation de carbone ainsi que de la respiration lors des phases obscures (Wu et al 2014). Cette augmentation de la respiration est un paramètre important à prendre en compte dans un contexte de changements globaux. La balance existante entre la production primaire et la respiration va donc déterminer la capacité des producteurs primaires à capter plus ou moins de CO_2 . Ainsi, dans un contexte de réchauffement climatique et d'acidification des océans, cette balance production primaire et respiration est importante pour estimer le taux de CO_2 incorporé dans la matière organique (Beardall and Raven 2004).

Alors que la quasi-totalité des études portent sur l'acclimatation à très court-terme des diatomées (quelques générations), de rares études tendent néanmoins à comparer la réponse à court-terme et à long-terme. Chez *T. pseudonana*, une augmentation de la concentration en CO_2 à court-terme (< 16 générations) tend à diminuer la concentration en Chl_a , la photosynthèse, l'absorption d'azote inorganique (Hennon et al 2014) tout en augmentant le taux de carbone fixé et l'absorption fonctionnel du PSII (Sobrino et al 2008). Ce dernier paramètre traduirait une réorganisation des LHA qui reste compatible avec la diminution de Chl_a observée (Bricaud et al 1995). La quantité de Rubisco semble également augmentée et est en accord avec l'augmentation de la fixation du carbone (McCarthy et al 2012, Sobrino et al 2008). Après plus d'une trentaine de générations dans un milieu artificiel où la $p\text{CO}_2$ est de 476 ppm ou 816 ppm, la physiologie de *T. pseudonana* semble retrouver un équilibre avec peu de différences observées par rapport à la condition contrôle ($p\text{CO}_2 = 333 \mu\text{atm}$) (Hennon et al 2014). Après plus de 100 générations passées dans un milieu acide (pH 7,8), la même tendance est associée. L'état physiologique, calculé par le F_v/F_m , la quantité de chlorophylle et l'absorption fonctionnelle du PSII ne présentent aucune modification. Au niveau génétique, une AC de type δ sur les 4 présentes chez *T. pseudonana* est moins exprimée alors que l'expression de la Rubisco reste stable (Crawford et al 2011). L'une des possibilités pouvant expliquer les régulations génétiques impliquées dans les processus d'acclimatation serait l'implication de changements épigénétiques (Maumus et al 2011) et des voies de

signalisation spécifiques (Hennon et al 2014). Parmi ces voies de signalisation, l'étude de Hennon *et coll.*, a montré qu'une acclimatation de *T. pseudonana* à une pCO₂ importante passerait par une voie de signalisation AMPc qui modifierait l'expression des gènes de la photorespiration et des CCM (Hennon et al 2015). Pour mieux comprendre les acclimations génétiques à long-terme, il serait notamment intéressant d'étudier le transcriptome dans son intégralité comme nous l'avons fait au cours de cette thèse.

Même si les études sur l'impact d'une acidification sur les métabolismes autres que l'acquisition du carbone et la photosynthèse sont très rares, quelques études montrent une altération de divers autres processus métaboliques. Ainsi, la diatomée *Skeletonema costatum* a fait l'objet d'une étude intéressante de l'effet du pH sur sa composition biochimique et sa production d'EPS. De manière assez intéressante, la concentration en chrysolaminarane augmente alors que la concentration en acide-aminé diminue avec le pH. L'excrétion des polysaccharides (EPS) ne semble pas être modifier pour des pH compris entre 6,5 et 8,0 (Taraldsvik and Mykkestad 2000). Ces résultats doivent être nuancés dans la mesure où *S. costatum* est connu pour excréter très peu d'EPS. A titre de comparaison la diatomée *Cymbella afinis* excrète 23 fois plus d'EPS que *S. costatum* (Myklestad 1974). Une étude écotoxicologique réalisée sur la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia fraudulenta* tend à montrer qu'une augmentation de la pCO₂ (de 360 ppm à 765 ppm) augmenterait de manière importante la production d'acide domoïque et donc la toxicité de cette algue (Tatters et al 2012).

Même si la littérature reste parcellaire pour comprendre réellement les effets d'une acidification sur la biologie et physiologie des diatomées, un facteur pourrait expliquer une grande partie des variations physiologiques observées : le pH cytosolique (pHi). En effet, les enzymes et transporteurs impliqués dans les différentes voies métaboliques ont différents optima de pH. Dès 1980, Raven proposait qu'une acidification pouvait engendrer des modifications du pHi qui seraient accompagnées de modifications métaboliques profondes (Raven 1980). A ce jour, seul Hervé *et coll.* ont montré qu'une diminution du pH extérieur (pHe) entraîne une acidification du pHi chez la diatomée *T. weissflogii* (Herve et al 2012). Pour un pHe de 8,1, correspondant au pH actuel de l'eau de mer, le pHi de *T. weissflogii* est de 7,4. Ce résultat est en accord avec les pHi mesurés chez d'autres organismes phytoplanctoniques (Swanson et al 2011). Une variation de 2,1 unités pHe entraîne une variation beaucoup plus restreinte de 0,94 unité de pHi suggérant que *T. weissflogii* régule en partie son pHi. L'homéostasie de pH intracellulaire est dépendant de nombreux systèmes tels que le tamponnage chimique (tampon carbonate), la production ou la consommation métabolique de proton (photosynthèse, respiration,...), le transport transmembranaires (ATPases, pyrophosphatase, transporteurs,...) et la compartimentation (vacuole, cytoplasme,...) des protons. Un intérêt tout particulier a été porté sur un canal proton de la membrane plasmique voltage dépendant (H_v) qui aurait

un rôle important dans la régulation du pHi chez les algues chromophytes (Taylor et al 2012). Ce transporteur H_v serait également impliqué dans l'homéostasie du pH durant la calcification des coccolithophoridés (Taylor et al 2011). Ainsi, même si les études sont rares, il semble qu'une modification du pHi pourrait entraîner une modification des processus de biominéralisation impliquant tant les silicates que les carbonates.

c) Acidification océanique, pH cytosolique et biominéralisation

Aujourd'hui, la biominéralisation est largement distribuée chez les organismes photosynthétiques aquatiques. Dans les océans modernes, ces organismes biominéralisateurs sont dominés par les diatomées et les radiolaires déposant de la silice et les coccolithophoridés déposant des carbonates de calcium (Raven and Giordano 2009). Des modifications du pHe peuvent entraîner des modifications de la calcification mais aussi du métabolisme du silicium et la silicification (Herve et al 2012, Milligan et al 2004, Raven and Giordano 2009, Stanley 2008). De manière assez inattendue, seulement deux études se focalisent sur le métabolisme du silicium/silicification en réponse à une variation de pHe chez la diatomée *T. weissflogii* (Herve et al 2012, Milligan et al 2004). Herve *et coll.* présentent une première étude intéressante de l'effet du pHe sur le métabolisme du silicium, le processus de biominéralisation ainsi que la morphologie des valves. En partant d'un pHe de 7,8 vers des pH plus acides (jusqu'à 6,4) et des pH plus basiques (jusqu'à 8,5), les concentrations en Sii et en BSi tendent à augmenter significativement proposant ainsi que le transport et le processus même de biominéralisation seraient affectés (Herve et al 2012). Sans rentrer dans plus de détails sur la cinétique de formation du frustule (détaillé dans le Chapitre IV), la vitesse du processus de minéralisation diminue avec une diminution du pHe (de 8,2 à 6,2). Cette diminution de la rapidité du processus de biominéralisation semble corrélée avec la diminution du pHi observé. Cette étude démontre que ce processus serait dépendant du pHi et de sa régulation. En réponse à une variation du pHe, la morphologie de la valve de *T. weissflogii* est altérée au niveau nanoscopique avec une variation de taille des structures siliceuses (D) contenant les pores, appelées *semi continuous cribum*, mais également la taille des pores (R) (Figure 15).

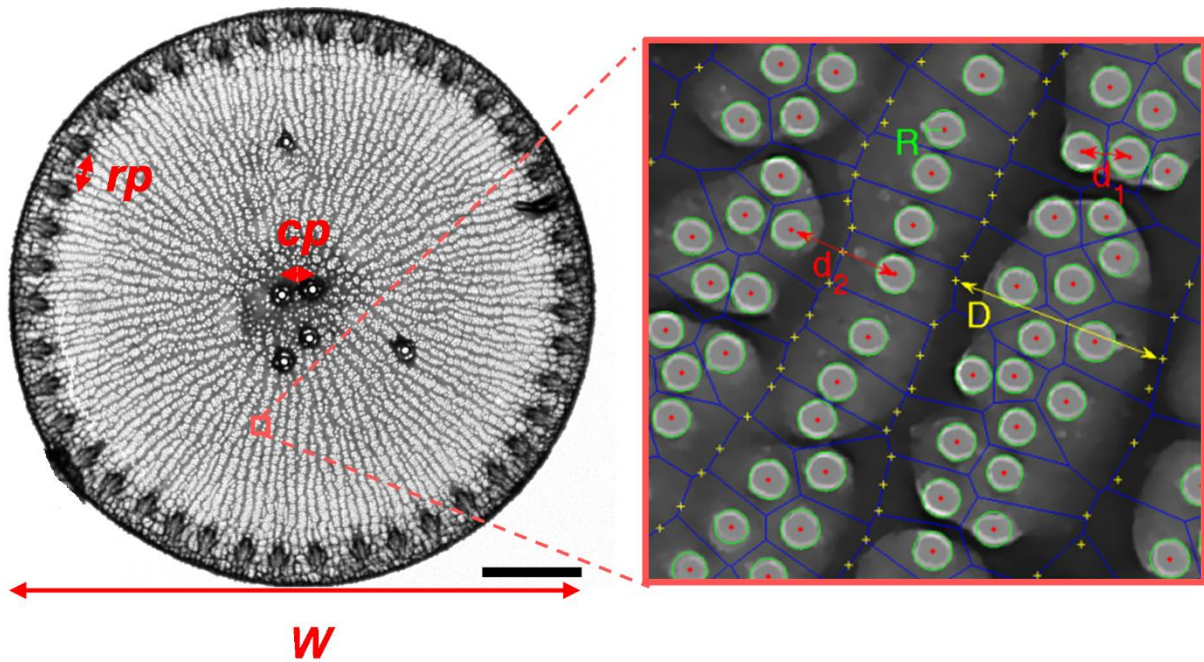


Figure 15 : Description morphologique de la valve de *T. weissflogii* observée au MET à deux différents grossissements. A gauche, la valve entière vue du dessus avec les différents caractères morphologiques étudiés comme le diamètre (W), la distance entre les fultoportulae axiaux (cp) et marginaux (rp). A droite, un agrandissement révélant certains détails de la valve comme le rayon des nanopores (R), la distance des *semi-continuous cribrum* (D), la distance entre 2 nanopores voisins appartenant au même *semi-continuous cribrum* (d_1) ou pas (d_2). Cette image provient de l'article de Herve *et coll.* (Herve et al 2012).

La diminution du diamètre de ces pores diminue donc la porosité totale de la valve. Cette porosité tend à diminuer de près de moitié d'un pHe 8,2 à 6,8. Cette variation de porosité modifiera les flux au travers des valves et aurait potentiellement un impact sur la physiologie de *T. weissflogii* et notamment sur le transfert des nutriments. Une précédente étude, là encore du laboratoire, réalisée chez *P. tricornutum* allait elle aussi dans le sens où la régulation de l'homéostasie de pH était impliquée dans le processus de biominéralisation. En effet, il avait été montré qu'une inhibition d'ATPases vacuolaires (V-ATPase ; inhibiteur : concanamycine A) affectait bien les processus de biominéralisation chez cette diatomée modèle (Vartanian et al 2009). Le métabolisme du silicium et la silicification semblent donc tous les deux contrôlés par le pHi chez les diatomées.

2. Impact des variations de salinité sur les diatomées

a) Ecosystèmes côtiers, salinité et tolérance des algues

Les écosystèmes côtiers sont des entités géomorphologiques dynamiques assurant la transition entre le continent et l'océan. Souvent opposés aux écosystèmes océaniques, ils sont caractérisés par

des faibles profondeurs, des faibles volumes, des apports d'eau douce importants ainsi qu'une variabilité à haute fréquence. Cette variabilité est directement corrélable à celle des facteurs physiques comme les marées, les vents et les débits fluviaux. Les conditions environnementales auxquelles sont soumis les écosystèmes côtiers ne sont pas constants, bien au contraire. Enclavés entre les écosystèmes océaniques et continentaux, ils varient de façon périodique, saisonnière, annuelle, ou apériodique, suivant les oscillations caractéristiques des grands cycles du climat. Cette dynamique engendre des modifications permanentes de la production et de l'abondance des organismes et aussi de la structure des communautés.

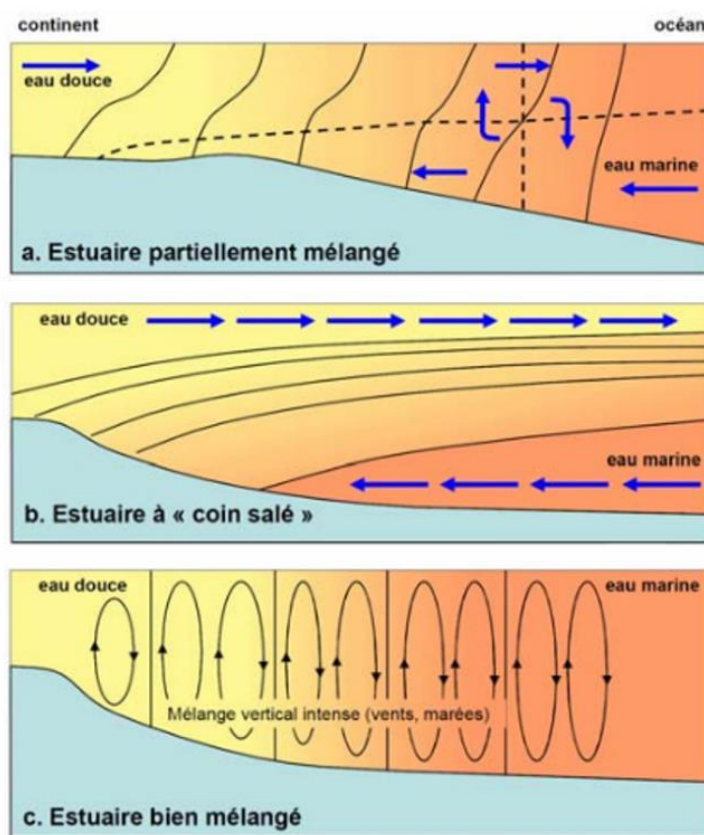


Figure 16 : Représentation schématique de la circulation des masses d'eau et des gradients salins observés. (a.) Stratification verticale du gradient salin en réponse à un mélange relativement homogène des masses d'eau ; (b.) Stratification plutôt horizontale due à un apport important d'eau douce ; (c.) Stratification vertical par l'action des vents et marées. Ces schémas proviennent du cours de Quequiner B. 2009. Biogéochimie Côtière.

Sur le plan géographique, les écosystèmes côtiers se distinguent entre eux par leur taille allant des grands fjords norvégiens jusqu'aux plus petits des estuaires. D'une façon générale, les écosystèmes côtiers englobent les estuaires et d'autres systèmes plus ou moins ouverts mais présentant tous une différence notable de salinité avec l'océan voisin. Les apports d'eau douce sont d'ailleurs le principal facteur de forçage de la zone côtière. L'intensité de ces apports dépend des précipitations atmosphériques, de la surface du bassin versant, de son relief et des phénomènes d'évaporation. Suivant l'intensité de ces apports et l'hydrodynamisme de la zone côtière, la stratification saline verticale et

horizontale est différente et plus ou moins homogène (Figure 16). Pour illustrer la stratification des estuaires, prenons l'exemple de l'Amazone. Ce fleuve décharge $180\,000\text{ m}^3\text{s}^{-1}$ d'eau douce au niveau des estuaires ce qui est colossal. En été, à 90 km au large de l'embouchure, la salinité de surface est toujours de 0,05 psu et de 19 psu à 14 m de fond (Figueiredo et al 1996). Cette stratification engendre des modifications des assemblages phytoplanctoniques (Du and Peterson 2014) comme ceux des

dinoflagellés (Alkawri and Ramaiah 2010) ou encore des diatomées benthiques (Sauer et al 2002) et planctoniques (Nubel et al 2000).

Les effets généraux du stress salin sur le métabolisme et sa régulation ont été largement étudiés chez les microalgues (Brown 1976 , Kirst 1990) et les macroalgues (Ding et al 2013 , Dittami et al 2009, Martins et al 1999). Un changement de salinité, hyposalin ou hypersalin, affecte les organismes à trois niveaux : **(a)** le stress osmotique à un impact direct sur le potentiel hydrique de la cellule, **(b)** il se crée un flux d'ions à travers la membrane à cause de la différence de concentration et **(c)** les ratios ioniques sont modifiés du fait de la sélectivité de la membrane plasmique via les transporteurs.

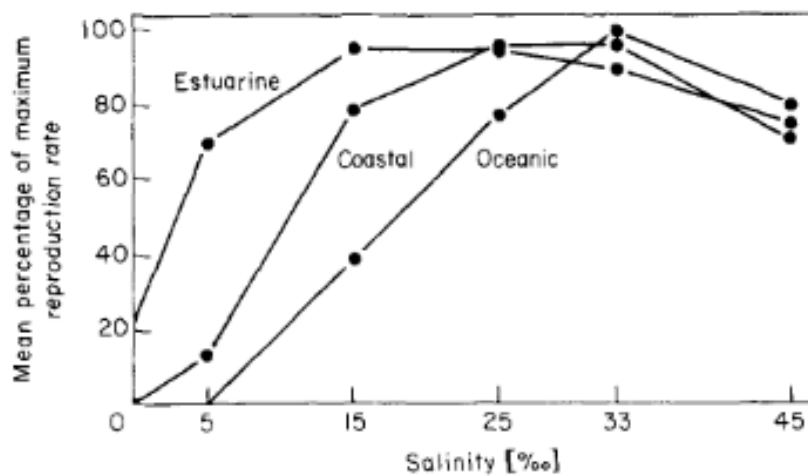


Figure 17 : Taux de reproduction des groupes phytoplanctoniques appartenant à différents écosystèmes comme les estuaires, les côtes ou les océans. Ce graphique provient de l'article de Brand *et coll.* (Brand 1984).

Plus un organisme est tolérant à des variations de salinité et plus il peut répondre à une large gamme de salinité qui lui est imposée. Les organismes sont dits euryhalins par opposition aux organismes sténohalins qui ne tolèrent que de très légères variations de la salinité. Pour donner un exemple, les organismes phytoplanctoniques estuariens sont euryhalins alors que ceux vivant dans l'océan ouvert sont plus souvent sténohalins. Pour illustrer cette notion de tolérance à la salinité, Brand en 1984 a mesuré chez 46 espèces phytoplanctoniques estuariennes, côtières ou océaniques, le taux de croissance dans une très large gamme de salinité allant de 0 à 45 psu. De manière assez attendue, le taux de reproduction des organismes phytoplanctoniques océaniques décroît plus rapidement à faible salinité que celui des côtiers et estuariens (Figure 17). Ces résultats illustrent bien le concept de tolérance (Brand 1984). Malgré la tolérance relativement homogène pour ces organismes appartenant à un même biotope, la réponse des organismes au stress semble être espèce-spécifique et dépend de la salinité imposée, de l'intensité du changement et de sa durée. La réponse spécifique semble d'autant

plus marquée pour des stress hyposalins. Par exemple, pour un stress hyosalin, des espèces peuvent présenter soit une augmentation soit une diminution soit aucune modification de la croissance et de la fixation de carbone (Admiraal 1977 , Radchenko and Il'yash 2006).

b) Réponses des diatomées au stress salin

Malgré l'importance des diatomées dans l'écosystème côtier, l'étude de la réponse à un gradient hyosalin a été très peu étudiée. Paradoxalement, il existe davantage d'études portant sur l'acclimatation à des stress hypersalins.

Brièvement, les stress hypersalins peuvent se retrouver dans les zones intertidales ou encore dans les écosystèmes polaires où les phénomènes d'évaporation et de congélation tendent à augmenter la concentration en sel. Chez les diatomées polaires, la salinité serait le stress abiotique dominant (Lyon et al 2011). Ce type de stress peut conduire à des inhibitions de la photosynthèse, une augmentation de la respiration, la mise en place des processus de stress oxydatif ainsi qu'un arrêt de la croissance (Rijstenbil 2005, Sudhir and Murthy 2004). La diatomée polaire *Fragiliaropsis cylindrus* transférée d'un milieu de culture de 35 psu à 70 psu voit sa croissance et son efficacité photosynthétique diminuées. Cependant après 5 à 7 jours passés dans ce milieu hypersalin, ces deux paramètres physiologiques retournent à des valeurs proches de celles du contrôle. Des analyses protéomiques ont révélé un changement de plusieurs classes de protéines (KOG) relatives aux acide-aminés (pyrroline-5-carboxylase reductase, Orn aminotransferase, ...), aux carbohydrates (fructose-1,6 biphosphate aldolase, transaldolase, phosphofruktokinase,...), au transport (transporteurs $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$), au stress (glutathione S-transferase, superoxide dismutase), à la production d'énergie (LHP, protéines du PSII, ...) et à beaucoup d'autres classes montrant l'effet pleiotropique de la salinité. Parmi toutes ces protéines dont la concentration varie, près de 30 % correspondent aux voies de synthèse des acide-aminés (Lyon et al 2011). Chez les diatomées, comme chez beaucoup d'autres organismes, une augmentation de la synthèse en acides-aminés pourrait aussi correspondre à leur rôle dans le maintien de la balance osmotique interne, comme c'est le cas avec la proline (Krell et al 2007). Le cycle de l'urée est une autre voie qui favoriserait la synthèse de proline (Allen et al 2011). Une étude transcriptomique réalisée chez cette même espèce mise dans des conditions similaires montre que des gènes codants pour différents transporteurs membranaires, des protéines de shock thermiques (HSP), des prolines et pour des composants du stress oxydatif sont dérégulés. Ces gènes seraient impliqués et nécessaires au rétablissement de l'homéostasie ionique (Krell et al 2008).

Même si la diatomée *T. weissflogii* est une diatomée euryhaline retrouvée majoritairement dans les écosystèmes côtiers avec des salinités allant de 35 psu à 20 psu (Garcia et al 2012, Vrieling et al

1999, Vrieling et al 2007), certains écotypes pourraient croître dans des eaux allant jusqu'à des salinités inférieures à 1 psu (Brand 1984). Cependant, même si la croissance de *T. weissflogii* semble peu affectée en réponse à un stress hyposalin (Garcia et al 2012, Radchenko and Il'yash 2006, Vrieling et al 1999, Vrieling et al 2007), elle diminue fortement lors des stress hypersalins (Garcia et al 2012). Il semblerait donc que *T. weissflogii* est probablement "préadaptée" à vivre dans des environnements hyposalins. Cette espèce posséderait des voies de régulation et du matériel génétique lui conférant une grande tolérance à ce stress. Cette tolérance est notamment révélée par des mesures du Fv/Fm qui lors d'un passage de 33 à 15 psu est presque identique seulement 1 h après le stress (Radchenko and Il'yash 2006). D'autres expériences montrent que quelques heures après un choc hyposalin, le taux de fixation de carbone tend à augmenter suggérant un ajustement physiologique dynamique (Radchenko and Il'yash 2006). Ces tendances ont également été observées chez d'autres diatomées comme *Odontella sinensis*, *Chaetoceros lorenzianus*, *Planktoniella sol*, *Rhizosolenia styliformis* après 3 à 4 h d'un choc hyposalin (Admiraal 1977). De manière assez cohérente avec l'augmentation de la fixation du carbone, les quantités de protéines, de carbohydrates et de lipides sont plus importantes dans des environnements hyposalins allant jusqu'à 25 psu que la condition contrôle (Garcia et al 2012). Chez *Chaetoceros gracilis*, une augmentation de la production de lipides a été observée après un stress hyposalin et s'accompagne aussi d'un changement de la composition en acides-gras (C18 vers C16) (Adams and Bugbee 2014). Chez les algues unicellulaires, le processus consistant à relâcher dans l'environnement des composés organiques (acide-aminés, polysaccharides, ...) (Rijstenbil et al 1989) est connu comme étant un mécanisme efficace en réponse à des stress hypotoniques. Cette sécrétion massive permettrait à la cellule de s'isoler davantage de l'environnement et ainsi préserver de manière efficace sa physiologie (Brand 1984, Kirst 1990). La concentration environnementale en exopolysaccharides transparents (TEP) est d'ailleurs souvent corrélée à l'état physiologique des cellules. Plus une cellule est stressée par son environnement et plus la concentration en TEP augmente (Passow 2002).

Pour résumer les informations analysées sur l'effet du stress hyposalin chez les diatomées, ce stress semble pouvoir entraîner une augmentation de la demande en carbone organique qui favoriserait la respiration mitochondriale et la mise en place de différentes voies métaboliques impliquées dans le maintien de l'homéostasie ionique. De ce fait le taux de carbone inorganique fixé serait plus important. La rapidité de réponse à laquelle l'espèce *T. weissflogii* est capable de répondre à un stress salin est bien en accord avec son caractère euryhalin et donc l'existence de voies de régulation facilement mobilisables en réponse à des variations de salinité. Cependant des informations transcriptomiques/protéomiques manquent encore pour mieux comprendre les ajustements impliqués dans le processus d'acclimatation. Hormis quelques gènes spécifiques (Rubisco, AC,...), il existe à notre

connaissance une seule étude transcriptomique sur l'effet d'un stress salin (0, 5, 10, 15 et 30 psu) sur la diatomée pennée marine *Nitzschia sp.* En réponse au stress salin, les gènes impliqués dans la synthèse des lipides sont surexprimés et la production de lipide augmentée (Cheng et al 2014).

Si la réponse hyposaline passe par une altération de différentes voies métabolismes chez les diatomées, quelles sont les conséquences sur les processus de minéralisation du silicium et la morphogenèse des valves ?

c) Hyposalinité, métabolisme du silicium et morphologie du frustule

Comme nous l'avons précédemment mentionné, des stress hyposalins peuvent modifier le métabolisme du silicium et la silicification. En effet, pour une salinité de 20 psu, la concentration totale en silicium (Sii et BSi cumulée) serait plus importante chez *T. weissflogii* et *Cyclotella meneghiniana* qui serait principalement due à une augmentation de BSi (Tuchman et al 1984, Vrieling et al 1999). Il est important de rappeler que des transporteurs de l'acide silicique (SIT) ont été décrits comme étant des cotransporteurs $\text{Si(OH)}_4 / \text{Na}^+$ (Curnow et al 2012 , Hildebrand 2005). Ce cotransport permet de relier directement le métabolisme du silicium et la salinité et de comprendre comment des modifications de la salinité peuvent potentiellement affecter la biosynthèse des valves (Bhattacharyya and Volcani 1980). En tenant compte de la chimie du processus de polycondensation du silicium, le pH mais également la concentration ionique pourraient influencer la taille et la forme des particules et donc les propriétés du matériel (Iler 1979). Malgré les incertitudes liées au manque de connaissance sur l'ensemble des molécules organiques et des conditions dans lesquelles ont lieux les processus de synthèse du frustule, il a été montré la salinité affectait sa formation tant à des échelles macroscopiques que nanoscopiques. Par exemple, des changements nanoscopiques (< 100 nm) ont été observés chez *T. weissflogii* et *T. punctigera* lors d'un passage de 33 psu à 20 psu (Figure 18) (Vrieling et al 2007). A 20 psu, la densité des valves de ces deux espèces de Thalassiosira est plus importante due à la formation de particules élémentaires de silice de tailles plus petites. Ceci engendre la formation d'un réseau plus dense (Figure 18d et h). La taille des pores est également modifiée avec la formation de pores plus petits (comparer Figure 18c et g). Le même type de résultat a été montré chez l'espèce de diatomée pennée côtière *Cocconeis placentula* (Leterme et al 2010).

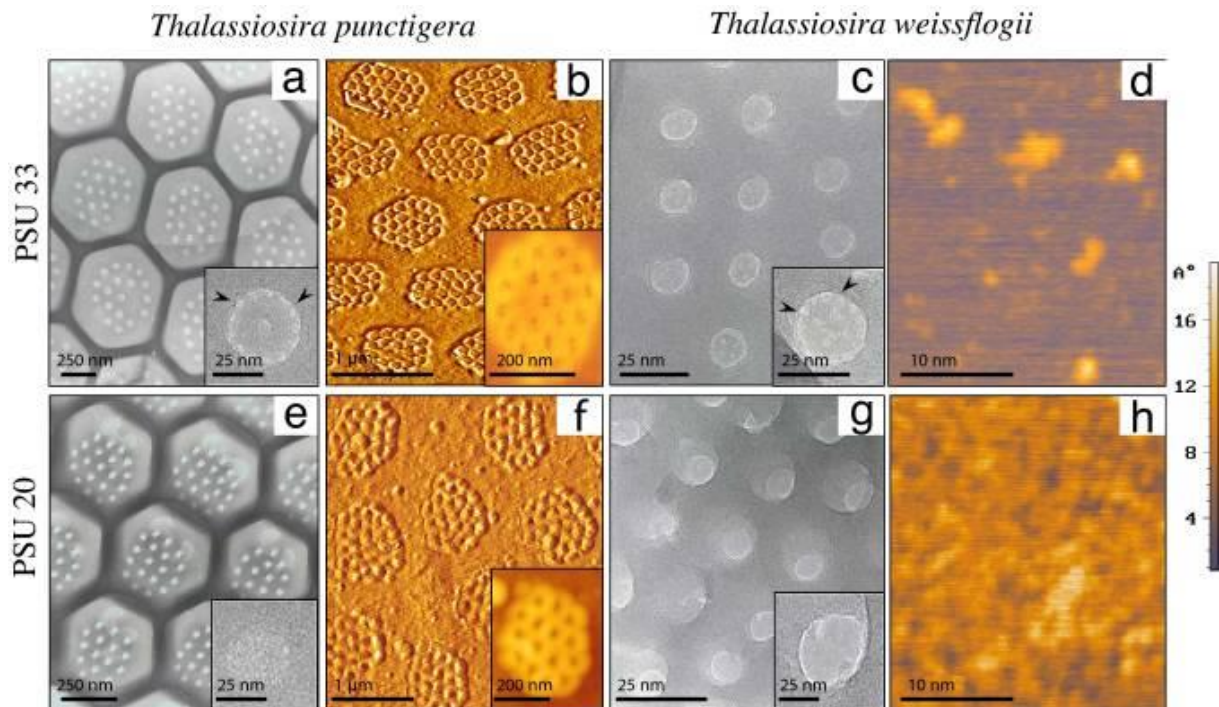


Figure 18 : Observations des nanostructures réalisées au Microscopie Electronique à Transmission à Haute Résolution (HR TEM) et au Microscopie à Force Atomique (AFM) de *T. punctigera* (a, b, e et f) et *T. weissflogii* (c, d, g, h). La partie haute correspond à des cellules cultivées à 33 psu et celle du bas à des cellules cultivées à 20 psu. Cette figure provient de l'article de Vrieling *et coll.* (Vrieling et al 2007).

Comme nous l'avons proposé pour des modifications du pH environnemental, une réduction de la porosité des valves pourrait modifier le taux d'échanges entre la cellule et le milieu environnant. Chez d'autres diatomées pennées benthiques estuariennes comme *Nitzschia pusilla*, *N. frustulum*, *N. palea*, *N. filiformis var. conferta* and *Eolimna subminuscula*, l'effet d'un stress salin de 35 psu à 9,5 psu peut altérer la morphologie des valves mais de manière plus drastique. Même si aucune de ces diatomées ne présentent une variation similaire, un changement de salinité peut affecter la taille du frustule ainsi qu'une grande variété de traits morphométriques comme la densité de fibula et de stria (Trobajo et al 2011). Un autre exemple est celui de la diatomée planctonique *Thalassiosira decipiens*, où une diminution de la salinité entraîne une diminution du diamètre, du nombre de fuloportulae marginaux mais aussi un décentrage des flutoportulae centraux vers les bords de la cellule (Mcmillan and Johansen 1988). Il est important de rappeler que mieux comprendre les modifications des traits morphométriques des frustules reste important dans la mesure où ils servent d'indicateurs pour retracer les variations de salinité dans les paléo-environnements (Trobajo et al 2004).

Acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales

Les diatomées sont capables de s'acclimater efficacement à des variations de facteurs environnementaux. Avec les changements globaux, ces microalgues pourraient présenter une meilleure fitness en réponse à une diminution progressive du pH des océans. Les premières études tendent à montrer qu'une acidification augmenterait la croissance et le taux de carbone fixé ce qui pourrait suggérer des processus d'acclimatation efficaces. Dans des environnements dynamiques comme les estuaires, les diatomées sont aussi capables de répondre rapidement à une variation de salinité en ajustant de nombreuses voies métaboliques comme la synthèse des acide-aminés, l'incorporation de carbone, le taux de protéines et la production de carbohydrates et de lipides. Après seulement quelques générations, certaines diatomées sont capables de retrouver une fitness optimale traduisant une grande plasticité phénotypique. Cependant, la morphologie du frustule et le métabolisme du silicium sembleraient être deux paramètres potentiellement moins bien contrôlés par les diatomées. Des variations de salinité peuvent entraîner, chez certaines espèces, des modifications morphologiques des valves. Hormis des études morphologiques et physiologiques, il existe un réel manque d'analyses génétiques pour comprendre les stratégies d'acclimatation mises en place par les diatomées.

D. Le genre *Thalassiosira* dans l'étude des diatomées

1. L'ordre Thalassiosirales : évolution et intérêt

Comme précédemment expliqué, les diatomées sont l'une des lignées eucaryotiques les plus diverses malgré leur origine plutôt récente (Alverson et al 2011). Cette lignée appartient au groupe des heterokontophytes également connu sous le terme des algues straménopiles (Cavalier-Smith and Chao 1996). Les avantages acquis au cours de l'évolution ont certainement contribué à leur remarquable capacité d'adaptation et d'acclimatation à l'ensemble des écosystèmes aquatiques.

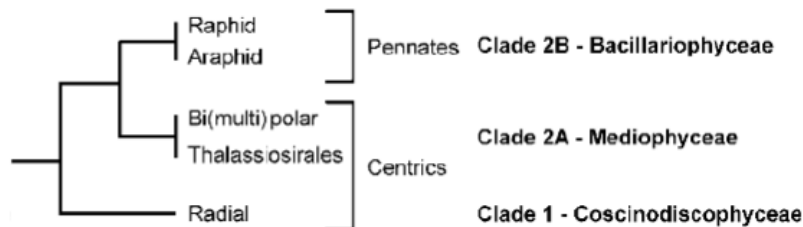


Figure 19 : Représentation très schématisée de la phylogénie moléculaire des diatomées. Cet arbre présente 2 grands clades (Clade 1 et 2) dont le Clade 2 est subdivisé en 2 sous-clades correspondant aux diatomées pennées (Clade 2B) et certaines diatomées centriques (Clade 2A) dont l'ordre des Thalassiosirales. Cette phylogénie provient de l'article de Medlin et Kaczmarska (Medlin and Kaczmarska 2004).

Comme illustré par l'arbre simplifié de la Figure 19, les diatomées centriques radiales forment le Clade 1 des *Coccinodiscophyceae* alors que le Clade 2 est constitué de l'ensemble des diatomées pennées (Clade 2B nommé *Bacillariophyceae*) ainsi que des diatomées centriques bipolaires et également radiales appartenant à l'ordre des Thalassiosirales (Clade 2A nommé *Mediophyceae*). Cette phylogénie moléculaire basée sur des analyses du 18S pourrait paraître surprenante au regard des phylogénies basées uniquement sur la morphologie. Cette phylogénie moléculaire a été confirmée par des analyses moléculaires basées sur l'utilisation d'autres marqueurs comme la grande sous-unité nucléaire de l'ARN ribosomal (LSU *rRNA*), le cytochrome c oxidase I mitochondriale (COX1) (Trobajo et al 2010), la sous-unité large de la Rubisco chloroplastique (*rbcl*) et les gènes chloroplastiques comme *rpoA* et *tufA* (Medlin et al 1997). Ces deux derniers gènes sont respectivement impliqués dans la transcription et la traduction des gènes plastidiales. Bien que probablement plus difficiles à établir, certains arguments morphologiques (présence/absence de fultoportulae) et cytologiques (structure de l'appareil de Golgi, des auxospores, des spermatozoïdes et du pyrénioïde) sont eux aussi en faveur de cette subdivision des diatomées (Medlin et al 2000).

Les Thalassiosirales occupent une position phylogénétique intéressante au sein des diatomées. D'ailleurs, une partie importante des recherches sur les diatomées est dédiée à la biologie des différentes espèces appartenant à cet ordre (Kaczmarska et al 2006).

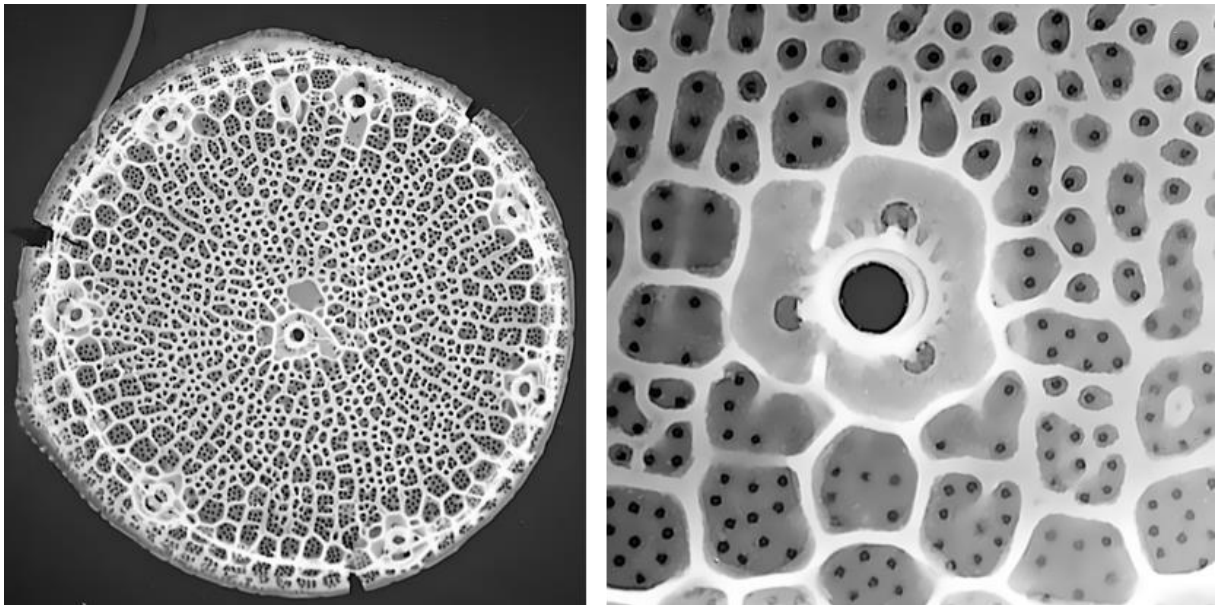


Figure 20 : Image MET d'une valve de *Thalassiosira oceanica* et d'un fultoportulae. A gauche est représenté une valve entière de *T. oceanica* sur laquelle est observable le fultoportulae central et les 7 fultoportulae marginaux. A droite, un agrandissement sur un fultoportulae central permet d'apprécier sa complexité architecturale. Photos d'Adrien Bussard.

Cet ordre est systématiquement retrouvé au sein du clade présentant une morphologie non radiale et ne présentant aucun fultoportulae (Figure 19). A ce jour on compte environ 500 espèces de Thalassiosirales principalement planctoniques retrouvées dans les eaux douces, saumâtres et les océans (Alverson 2014). La phylogénie de cet ordre est plutôt bien résolue et a été utilisée depuis environ une dizaine d'années pour comprendre l'évolution des traits écologiques, morphologique et génétiques (Sabir et al 2014). Cet ordre constitue aujourd'hui la lignée monophylétique la plus étudiée chez les diatomées. Il a été estimé que cet ordre serait apparu entre 108 et 79 Ma mais des évidences fossiles placeraient son origine autour de 215 Ma (Medlin et al 1996a). Sur la base d'analyses stratigraphiques et la présence de nombreux fossiles de Thalassiosirales dans des sédiments d'eau douce datant du milieu du Miocène, il a été proposé que ce clade soit initialement apparu dans les eaux douces. Les diatomées de cet ordre auraient secondairement colonisées les mers (Alverson 2007). Les genres *Cyclotella* et *Stephanodiscus* semblent être majoritairement d'eau douce avec vraisemblablement aux moins deux évènements indépendants de colonisation. De manière intéressante l'espèce considérée par beaucoup comme modèle, *Thalassiosira pseudonana*, aurait comme ancêtre une diatomée d'eau douce appartenant au genre *Cyclotella* (Alverson et al 2011 , Alverson 2014).

Grâce à la morphologie de leur frustule, il est assez facile d'identifier une diatomée appartenant à l'ordre des Thalassiosirales. La présence de fultoportulae, centraux et/ou marginaux (Figure 20 et 21), est la caractéristique morphologique qui permet, facilement et sans exception, d'assigner une espèce à cet ordre (Medlin et al 1993). Cette structure siliceuse complexe constitue une perforation complète de la valve : elle comprend une ouverture distale et proximale qui sont associées à une chambre basale. Des pores accessoires au niveau de l'ouverture proximale sont également retrouvés. Les fultoportulae peuvent présenter deux grands types d'architectures (Figure 21) (Kaczmarek et al 2006).

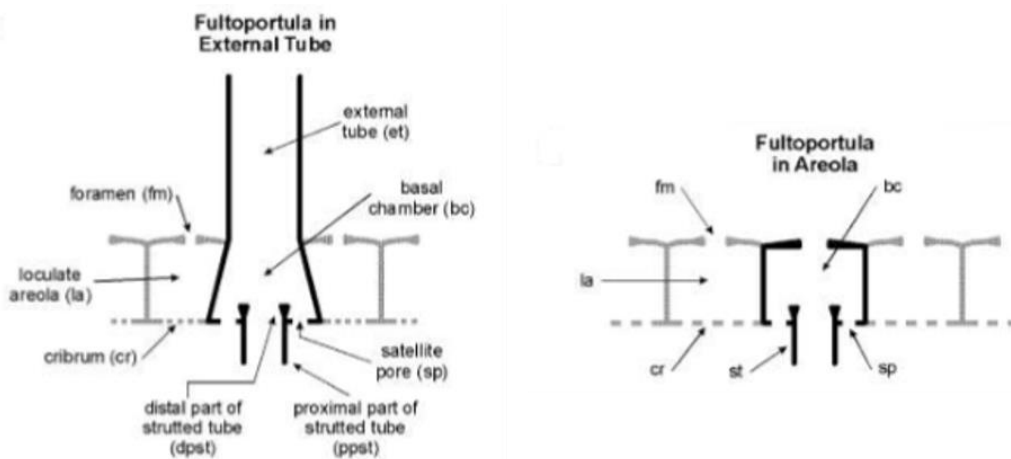


Figure 21 : Schéma des deux grandes architectures de fultoportulae rencontrés chez les Thalassiosirales. Certains fultoportulae peuvent présenter un tube extérieur alors que d'autres n'en présentent pas. Ces schémas proviennent de l'article de Kaczmarek *et coll.* (Kaczmarek et al 2006).

Même si le rôle des fultoportulae n'est pas encore bien connu, ces tubes seraient vraisemblablement impliqués dans l'extrusion de longues fibres chitineuses qui pourraient avoir un rôle dans la formation des chaînes de diatomées, dans la flottaison et dans la lutte contre la prédation (Durkin et al 2009, Medlin et al 1996a).

Avec 15 génomes chloroplastiques de diatomées disponibles à ce jour, des analyses de leur organisation et de leur contenu ont permis d'affiner la phylogénie des diatomées et de mieux définir les caractères génétiques permettant d'identifier les membres des Thalassiosirales. Cet ordre présente une organisation du génome chloroplastique plus conservée que celle des autres ordres de diatomées (Ruck et al 2014). En effet, les diatomées *T. pseudonana*, *T. weissflogii*, *Cyclotella nana*, *Cyclotella sp.* et *Roundia cardiophora*, toutes membre de l'ordre des Thalassiosirales, présentent un enchaînement similaires de leurs gènes chloroplastiques suggérant que l'ancêtre commun des Thalassiosirales devait

posséder cette même organisation. A noter toutefois, l'exception pour *T. oceanica* qui présente une organisation plus spécifique avec une dizaine d'inversions (Figure 22).

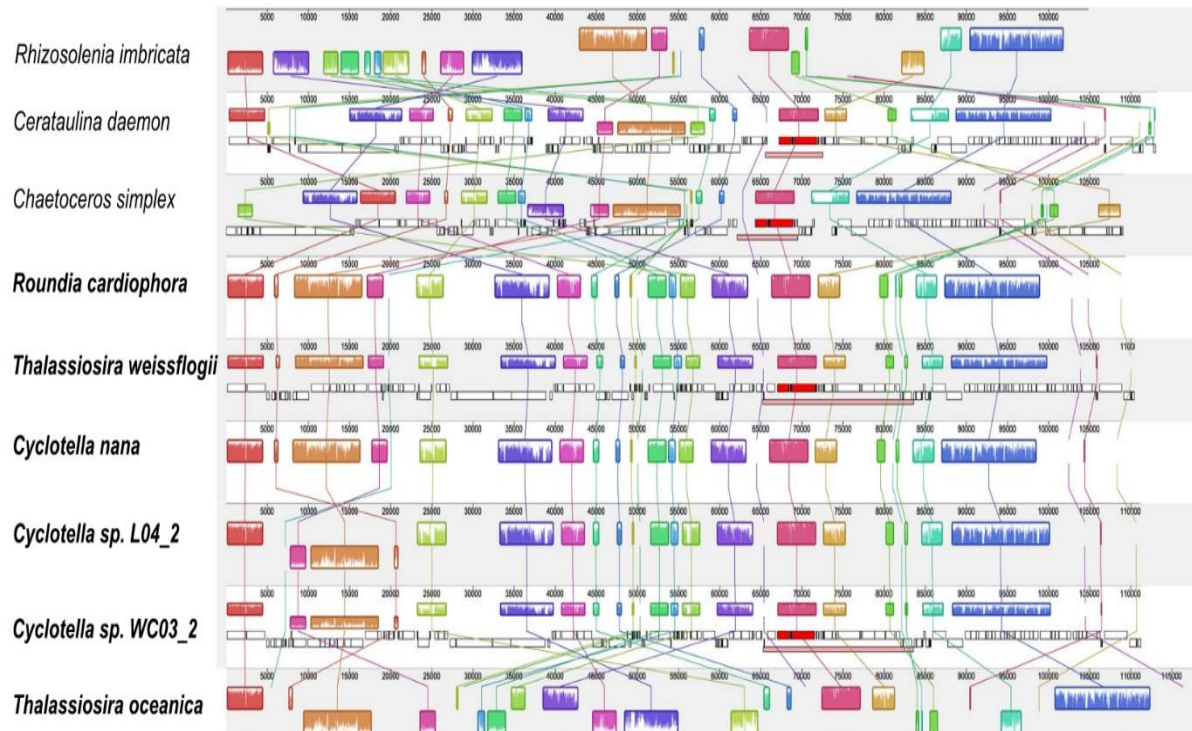


Figure 22 : Comparaison de la position des gènes sur le génome chloroplastique des 7 diatomées. Les diatomées ayant leurs noms de genre et d'espèces en gras appartiennent à l'ordre des Thalassiosirales. La figure provient de l'article de Sabir *et coll.* (Sabir et al 2014).

Au niveau du contenu en gène, les génomes chloroplastiques présentent des spécificités si l'on considère les Thalassiosirales par rapport aux autres diatomées. Pour toutes les Thalassiosirales, une perte des gènes *acpP1* et *syfB* est constatée. *T. oceanica* a aussi perdu le gène *petF* (Sabir et al 2014).

Parmi les genres de l'ordre des Thalassiosirales, le genre *Thalassiosira* représente un des taxons de diatomées le plus résolu phylogénétiquement lui permettant d'être étudié préférentiellement en termes d'évolution écologique, de phylogénie et des traits aussi bien génétiques que morphologiques (Alverson 2007, Nakov et al 2014).

2. Le genre *Thalassiosira* : diversité et écologie

Le genre des *Thalassiosira* est le genre le plus diversifié de l'ordre des Thalassiosirales avec environ 180 espèces marines et 12 espèces d'eau douce décrites (Kaczmarska et al 2006). Ce genre est très représenté dans les écosystèmes aquatiques tropicaux, subtropicaux, tempérés, polaires,

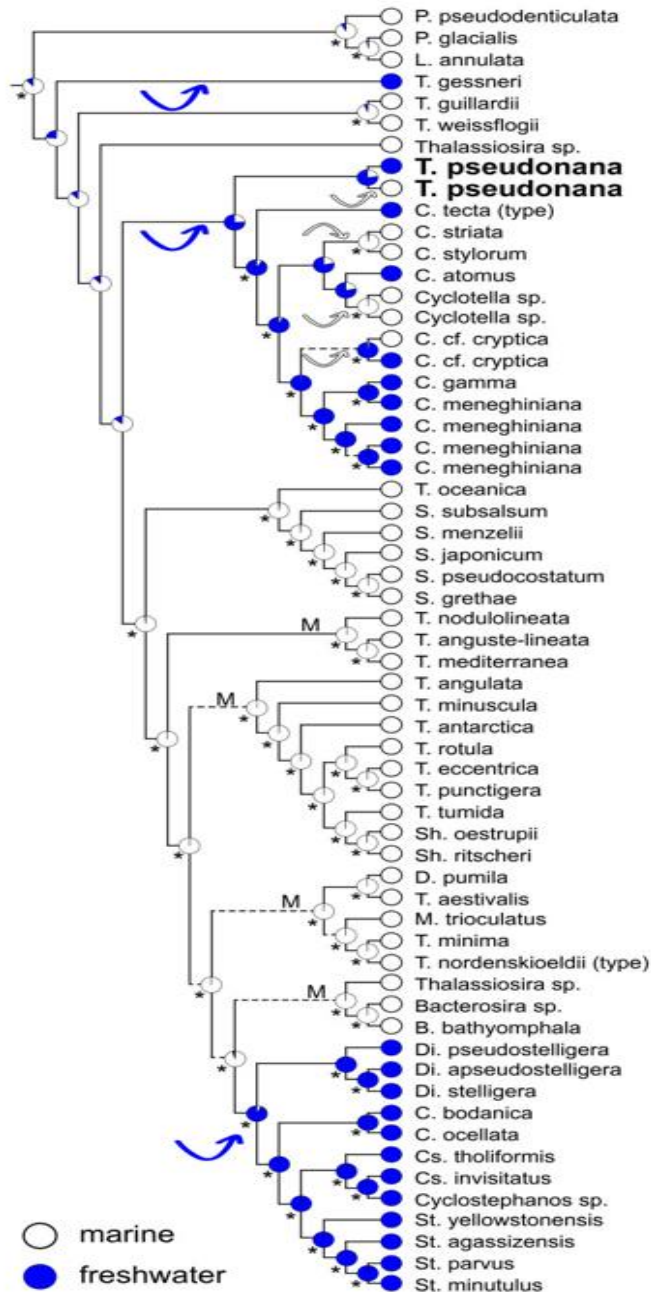


Figure 23 : Arbre phylogénétique de l'ordre des Thalassiosirales basé sur une analyse Bayésienne des gènes de psbC, rbcL, SSU rDNA et LSU rDNA. L'abréviation des genres correspond à : *Bacterosira* (B), *Cyclotella* (C), *Cyclostephanos* (Cs), *Detonula* (D), *Discostella* (Di), *Lauderia* (L), *Minidiscus* (M), *Porosira* (P), *Shionodiscus* (Sh), *Skeletonema* (S), *Stephanodiscus* (St), and *Thalassiosira* (T). Les asterics suggèrent que l'habitat ancestral est nettement plus probable que l'habitat alternatif proposé. Cet arbre provient de l'article d'Alverson *et coll.* (Alverson et al 2011).

océaniques, côtiers ou d'eau douce (Figure 23) (Brand 1984 , Prasad et al 1993 , Sorhannus et al 2010).

Cependant, pour un écosystème donné, les assemblages de *Thalassiosira* sont différents et dépendent des adaptations spécifiques de chaque espèce et des fluctuations des paramètres environnementaux. Prenons comme exemple l'espèce *T. oceanica* qui vit majoritairement dans les océans ouverts. Cet écosystème est relativement oligotrophe et est caractérisé par une très faible concentration en fer. Il a été montré que cette diatomée dite océanique, possède des adaptations spécifiques à cet écosystème contrairement aux diatomées côtières telles que *T. weissflogii* ou encore *T. pseudonana* (Brand 1984). Il a ainsi été montré que la concentration en PSI et en cytochrome b6f est 5 et 7 fois inférieure chez *T. oceanica* que chez *T. weissflogii*. Cette diminution permettrait de réduire de manière importante la demande en fer nécessaire pour la cellule conférant des "facilités" à vivre dans des environnements carencés en fer. De plus, même avec une concentration inférieure en protéines impliquées dans la

photosynthèse, l'efficacité photosynthétique resterait comparable entre *T. oceanica* et *T. weissflogii* (Strzepek and Harrison 2004). L'adaptation aux faibles concentrations en fer aurait également pu conditionner le transfert de *petF* du génome plastidique vers le génome nucléaire (Lommer et al 2012) et pourrait expliquer la forte divergence du génome chloroplastique observée (Alverson et al 2011). De plus, il semblerait qu'un remplacement des protéines utilisant le fer pour le transport des électrons, comme les plastocyanines, a été effectué par leur équivalent utilisant du cuivre chez *T. oceanica* (Peers and Price 2006). Par contre, cette diatomée semble beaucoup moins tolérante aux variations de salinité (15 psu à 45 psu) que *T. weissflogii* (0 psu à 40 psu) (Brand 1984). *T. oceanica* possède donc des adaptations spécifiques lui permettant de vivre et être compétitive dans l'océan ouvert mais beaucoup moins dans les écosystèmes côtiers. Nous reviendrons dans le Chapitre IV sur ce dernier point qui me semble discutable.

Pour citer un autre exemple, la diatomée *T. antarctica* vit dans les eaux polaires arctique à des températures de l'ordre de -5 °C et des salinités très élevées comprise entre 73 et 100 psu. Cette haute salinité s'explique par le fait qu'au niveau des calottes glaciaires, l'eau tend à geler engendrant une concentration des sels faisant localement augmenter la salinité. Pour s'acclimater à cet environnement, il a été montré que *T. antarctica* augmentait l'incorporation de carbone dans des petites métabolites et des composés azotés permettant la synthèse massive de proline (Aletsee and Jahnke 1992). Pour terminer cette partie sur l'évolution des Thalassiosira, citons le cas de la diatomée *T. faurii* retrouvée dans les grands Lac Africains. Suivant les écotypes, cette espèce présente une sensibilité différente à une augmentation de salinité selon le lieu de son prélèvement. L'écotype de *T. faurii*, prélevé en Ethiopie dans le lac Langano, est très peu tolérant à des variations de salinité alors que celui, prélevé au Niger, l'est beaucoup plus (Roubeix et al 2014). Ces 2 écotypes, éloignés géographiquement, forment deux populations allopatriques qui auraient évolué indépendamment l'une de l'autre, repoussant le concept d'espèce à ses limites (Mann 1999).

3. Les Thalassiosira : modèle d'étude pour la biominéralisation

L'étude de la biominéralisation chez les diatomées a connu une réelle avancée avec l'apport des informations génomiques et des compétences dans l'ingénierie des génomes. La diatomée *T. pseudonana* semble être devenue le modèle incontournable pour ces études. Avant d'essayer de comprendre pourquoi les diatomées du genre Thalassiosira suscitent un tel engouement, il est

important de rappeler les connaissances actuelles sur la biominéralisation des diatomées. Je décrirai ci-dessous les principales étapes qui conduisent à la formation du frustule.

a) Silicium et son incorporation

Le silicium est un élément de symbole Si et de numéro atomique 14 qui appartient à la famille des métalloïdes tout comme le germanium ou le bore. Le Si est le deuxième élément le plus abondant de la croûte terrestre après l'oxygène. Il n'existe jamais à l'état libre mais apparaît sous la forme de composés, à savoir : du dioxyde de silicium polymérisé ou non (SiO_2 ; silice vitreuse, quartz, cristoballite,...), d'acide silicique Si(OH)_4 ou de silicates (Iler 1979). La forme chimique du silicium présente dans les eaux salées est à 97 % le monomère Si(OH)_4 , mais ceci dépend bien sûr du pH. Le Si(OH)_4 constitue la forme préférentiellement assimilable par les diatomées. Des expériences de mesures à différents pH suggèrent que *P. tricornutum* pourrait aussi transporter la forme SiO(OH)_3^- (Amo and Brzezinski 1999 , Riedel and Nelson 1985). Ce résultat, qu'il serait important de confirmer pour d'autres espèces, pourrait être le fruit d'une adaptation à des environnements spécifiques comme celui de lacs salés, puisque la forme anionique y est majoritaire. Chez les diatomées, il a été proposé qu'à de fortes concentrations ($> 30 \mu\text{M}$) le silicium pourrait diffuser passivement à travers la membrane plasmique et être absorbé activement lorsque les concentrations sont plus faibles ($< 30 \mu\text{M}$) (Hildebrand et al 1997 , Shrestha and Hildebrand 2015). Le transport actif de silicium est réalisé par des transporteurs spécifiques appelés SIT (*Silicic Acid Transporter*). Ces SIT comporteraient dix domaines transmembranaires avec leurs extrémités N- et C-terminals qui seraient cytoplasmiques (Hildebrand et al 1998, Hildebrand and Wetherbee 2003). Le domaine C-terminal pourrait correspondre à une région d'interaction de type protéine-protéine. Une signature pouvant correspondre à un symport avec le sodium a été proposée (Hildebrand 2000) et permettrait un cotransport avec l'ion sodium (Bhattacharyya and Volcani 1980). Des transporteurs transmembranaires arsénite ou citrate auraient également un rôle inverse au SIT, à savoir un transport du cytoplasme vers le milieu environnant (Shrestha et al 2012). Parmi les 3 SIT identifiés dans le génome de *T. pseudonana* (Armbrust et al 2004), il a été mis en évidence que la régulation du transport de l'acide silicique au cours du cycle cellulaire avait lieu au niveau transcriptionnel (avec un pic d'expression en phase S) mais aussi à un niveau traductionnel et post-traductionnel (avec une présence accrue de protéines lors de la biosynthèse de la frustule) (Thamatrakoln and Hildebrand 2008). Une régulation post-transcriptionnelle, en réponse à des variations de la concentration en silicium dans le milieu extérieur, avait aussi été proposée pour *P. tricornutum* (Sapriel et al 2009).

b) Stockage intracellulaire du Sii

Une fois dans le cytoplasme, le Sii pourrait être stocké par des mécanismes encore peu connus. Il a été montré que la concentration Sii est très importante et qu'elle est souvent supérieure à la constante de solubilité de la silice (Groger et al 2008, Iler 1979, Martin-Jézéquel and Lopez 2003). En moyenne et suivant les espèces de diatomées, la Sii peut représenter plus de 50 % du poids de la silice biogénique (BSi) ce qui est considérable (Sumper and Brunner 2008). On peut alors se demander, si elle existe vraiment, comment une telle quantité de silicium ne polymérise pas directement ? L'état actuel des connaissances ne permet pas de répondre avec certitude mais il existe trois grandes hypothèses :

(1) Liaison acide silicique/composés organiques comme les protéines, les lipides ou les polysaccharidiques. Des approches d'imagerie ont révélé la présence de pools de Sii liés aux ribosomes et aux gouttelettes lipidiques cytoplasmiques chez *T. pseudonana*, mais ces localisations peuvent varier au cours du cycle cellulaire (Rogerson et al 1987).

(2) Protéines "encapsulant" l'acide silicique par analogie à ce qui est connu pour le stockage du fer (comme les *ferritine-like*) comme par exemple chez les bactéries magnétotactiques (Baumgartner et al 2013). Des ionophores de silicates ont par le passé été isolés ce qui renforce cette hypothèse (Bhattacharyya and Volcani 1980).

(3) Stockage dans des organelles comme le lysosome ou encore la vacuole. Cette dernière organelle semble être un candidat de choix (Medlin 2002) puisque, outre le fait que c'est un compartiment important, facilement mobilisable, dont le pH est régulé, la vacuole est un des lieux privilégiés de l'accumulation du silicium chez les plantes (Neumann and De Figueiredo 2002, Neumann 2003).

Le stockage du Sii est un phénomène primordial pour assurer la demande de la cellule lors de la formation du frustule ainsi que le bon déroulement du cycle cellulaire. La disponibilité en Sii constitue un "check-point" indispensable. Si l'on prend l'exemple de la diatomée *T. weissflogii*, en l'absence d'acide silicique extérieur, le cycle cellulaire est bloqué en phase G1 ou G2 (Brzezinski et al 1990).

c) Polycondensation du silicium

Chez toutes les diatomées connues, la morphogénèse des structures siliceuses s'effectue dans un compartiment spécialisé appelé SDV pour *Silica Deposition Vesicle* (Drum and Pankratz 1964). La SDV n'est pas spécifique aux diatomées car on la retrouve aussi chez d'autres protistes capables ainsi de polycondenser le silicium comme les chrysophytes (microalgue dite "dorée" d'eau douce) ou les choanoflagellés (eucaryotes opisthokontes) (Patterson and Durrschmidt 1988). Il s'agit d'un

compartiment intracellulaire qui se présente sous des formes diverses selon les espèces, le plus souvent comme un tube étroit chez les diatomées pennées et un disque chez les centriques et qui est délimité par une membrane appelée le *silicalemm*e, bicouche lipidique de 5-7 nm d'épaisseur (Hildebrand et al 2007, Kroger et al 2000). On ne sait pas à quel stade du cycle cellulaire la SDV apparaît : certains pensent qu'elle apparaîtrait juste après la cytodierèse, d'autres suggèrent qu'elle serait mise en place dans chacune des cellules filles avant leur séparation. Du fait du processus de synthèse de nouvelles hypovalves, la SDV est située à proximité de la membrane plasmique (Mayama and Kuriyama 2002). Des marqueurs fluorescents ont permis d'estimer que cette vésicule est acide, avec un pH de l'ordre de 5, qui favoriserait, comme *in vitro*, la polycondensation du silicium (Vrieling et al 2003, Vrieling et al 1999, Vrieling et al 2005). Du fait de cette acidité, différents marqueurs fluorescents ont pu être utilisés pour la marquer spécifiquement. De nos jours, il existe de nombreuses sondes fluorescentes disponibles comme le HCK-123, le DND-160 ou le NBD-N2 (Figure 24) (Annenkov et al 2010, Descles et al 2008).

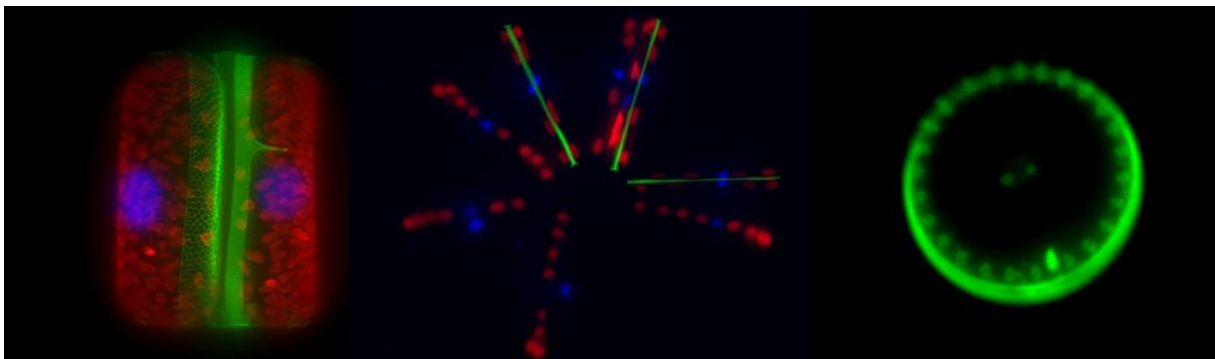


Figure 24 : Images de diatomées observées au microscope à épifluorescence. De gauche à droite, *Coccinodiscus sp.*, *Asterionella formosa* et *T. weissflogii*. Les différentes couleurs correspondent: aux valves néosynthétisées en vert (fluorescence du NBD-N2), aux chloroplastes en rouge (autofluorescence chloroplastique) et aux noyaux en bleu (fluorescence du Hoechst 33342). Sur l'image la plus à droite, seule l'image de la valve est présentée. Nous pouvons y distinguer le rimoportulæ (structure marginale la plus intense) et les fuloportulæ centraux et marginaux. Photos d'Adrien Bussard.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, différentes molécules telles que les silafines, les silacidines et les longues chaînes de polyamines ont été retrouvées et purifiées à partir de frustule et joueraient un rôle clé dans la polycondensation. Même si les fonctions chimiques sont nombreuses et variées et que ces protéines présentent toutes des modifications post-transcriptionnelles (glycosylations, phosphorylations, ...), elles accéléreraient la polycondensation et participeraient à la morphogénèse de la valve néosynthétisée (Poulsen et al 2003). Le cytosquelette aurait également un rôle clé notamment dans le positionnement de la SDV grâce aux microtubules mais aussi dans le contrôle de la morphogénèse de la SDV par l'action des filaments d'actine (Tesson and Hildebrand 2010). Une fois mature, la nouvelle valve est excrétée dans le milieu extérieur probablement par fusion

du *silicalemma* à la membrane plasmique. En se basant sur certains travaux existants (Herve et al 2012), il a été proposé que la cinétique de polycondensation du silicium semble suivre chez *T. weissflogii* une dynamique particulière avec la possibilité d'une variation du pH intra-SDV au cours du processus de synthèse des valves. Nous discuterons de ce point dans le Chapitre IV.

d) *T. pseudonana*, un modèle d'étude privilégié

La biominéralisation du silicium chez les diatomées continue à être une voie de recherche encore remplie d'énigmes. Depuis plusieurs années, la plupart des informations nous viennent d'études réalisées sur le modèle *T. pseudonana* (Hildebrand 2008, Kroger and Poulsen 2008, Sumper and Brunner 2008). Ainsi de nombreux composés organiques ont été montrés comme impliqués dans le processus de minéralisation comme : les silaffines, les silacidines, les cingulines et les polyamines. Toujours chez *T. pseudonana*, des études génomiques ont aussi contribué à accroître nos connaissances sur les gènes et les régulations géniques ayant lieu au cours du processus de minéralisation (Mock et al 2008, Scheffel et al 2011, Shrestha et al 2012, Tesson and Hildebrand 2013). Le développement de systèmes de transformation génique stable chez cette espèce et d'autres diatomées comme *P. tricornutum* ont participé à cet engouement (Armbrust et al 2004, Poulsen et al 2006, Zaslavskaja et al 2000, Zhang and Hu 2014).

4. Apport de la génomique chez les Thalassiosira

En 2004, le premier génome de diatomée est publié, celui de la centrique *T. pseudonana* (Armbrust et al 2004). Une étape majeure dans l'étude des diatomées aussi bien d'un point de vue génétique, biologique, écologique qu'évolutif. Quatre années plus tard, le génome de la diatomée pennée *Phaedactylum tricornutum* est lui aussi disponible (Bowler et al 2008). Ces deux diatomées restent en partie considérées comme modèles de diatomée centrique ou pennée alors qu'elles avaient été choisies en grande partie du fait de la petite taille de leurs génomes (32,4 Mb pour 11 776 gènes nucléaires et 27,4 Mb pour 11 402 gènes nucléaires pour respectivement *T. pseudonana* et *P. tricornutum*).

Des efforts considérables ont été réalisés pour développer des outils génétiques permettant d'étudier fonctionnellement ces diatomées modèles. Chez *P. tricornutum*, qui est la diatomée où le plus d'outils génétiques existent (Saade and Bowler 2009), nous recensons des transformations nucléaires

stables par bombardement (Apt et al 1996 , Falciaiore et al 1999 , Miyagawa et al 2009, Zaslavskaja et al 2000) et par électroporation (Miyahara et al 2013 , Zhang and Hu 2014) ou encore des techniques d'extinction de gènes plus communément appelé *RNAi* (De Riso et al 2009). Les transformations nucléaires stables ne sont cependant pas limitées à *P. tricornutum* étant donné qu'il en existe pour *Cylindrotheca fusiformis* (Fischer et al 1999 , Poulsen and Kroger 2005), *Navicula saprophila*, *Cyclotella cryptica* (Dunahay et al 1995), *T. pseudonana* (Poulsen et al 2006) et, très récemment, *Chaetoceros gracilis* (Ifuku et al 2015).

Avec la démocratisation des technologies de séquençage de seconde génération (NGS), la génomique des diatomées connaît elle aussi une réelle avancée avec 5 autres génomes de diatomées qui sont aujourd'hui accessibles : *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102 (2008), *Pseudo-nitzschia multiseriis* CLN-47 (2011), *Thalassiosira oceanica* CCMP 1005 (2013), *Synedra acus* subsp. *radians* (2014) et très récemment *Fistulifera solaris* JPCP DA0580 (2015) (Tableau III).

Tableau III : Caractéristiques des génomes des 7 diatomées séquencées.

	<i>T. pseudonana</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>F. cylindrus</i>	<i>Pn. multiseriis</i>	<i>T. oceanica</i>	<i>S. acus</i>	<i>F. solaris</i>
Année séquençage	2004	2008	2008	2011	2013	2015	2015
Référence	Armbrust et al., 2004	Bowler et al., 2008	JGI Fracy	JGI Pnm	Lommer et al., 2013	Galachyants et al., 2015	Tanaka et al., 2015
Type diatomée	centrique	pennée eau douce / eau de mer	pennée	pennée	centrique	pennée	pennée eau douce / eau de mer
Milieu de vie	Côte / eau douce		eau polaire	estuaire	océan ouvert	eau douce	
Génome nucléaire							
Taille estimée (Mb)	32,4	27,4	80,5	218,73	81,6	98	24,9
Chromosome	24	33	NA	NA	NA	NA	42
Nombre de gènes	11 776	10 402	27 137	19 703	29 306	27 337	11 448
Contenut GC (%)	47	49	41*	51*	48*	NA	46
Génome chloroplastique							
Taille estimée (kb)	129	117	NA	NA	142	128	135
Nombre de gènes	159	162	NA	NA	160	160	164
Contenut GC (%)	31	33	NA	NA	30	NA	32
Génome mitochondrial							
Taille estimée (kb)	43,8	77,4	NA	NA	35,3	47	38,6
Nombre de gènes	35	32	NA	NA	31	33	31
Contenut GC (%)	30	35	NA	NA	NA	NA	28

En plus des génomes nucléaires, plusieurs génomes chloroplastiques et mitochondriaux sont disponibles (Figure 25) (Armbrust et al 2004 , Bowler et al 2008, Lommer et al 2010 , Lommer et al 2012 , Ravin et al 2010 , Ruck et al 2014 , Sabir et al 2014 , Tanaka et al 2015).

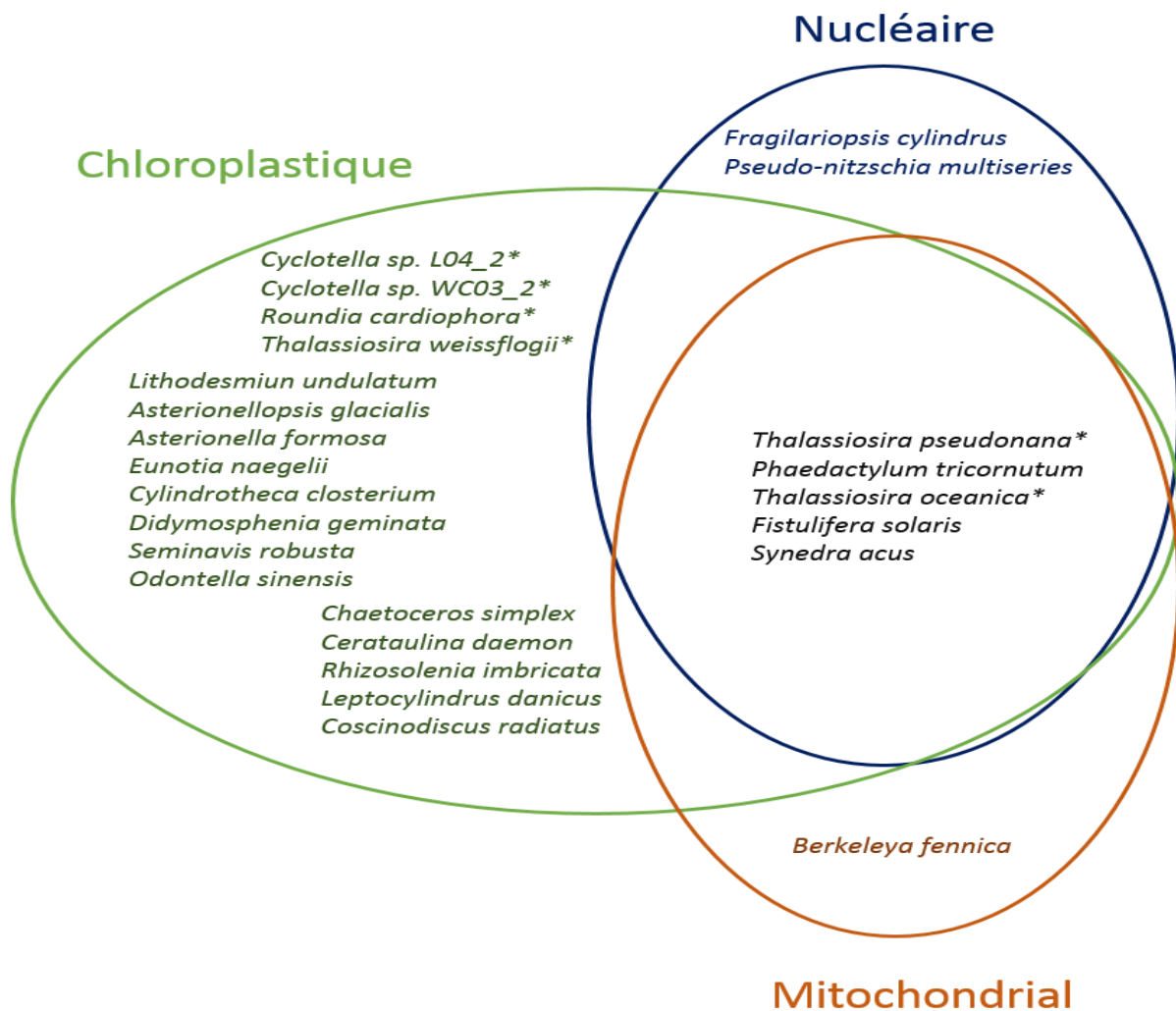


Figure 25 : Diagramme de Venn représentant les différents génomes séquencés. Seul 5 diatomées, dont 2 du genre *Thalassiosira* représentées par un *, présentent les 3 génomes séquencés. Il est intéressant de noter que les génomes chloroplastiques sont les plus nombreux avec 22 disponibles alors que seulement 6 génomes mitochondriaux sont disponibles.

De manière assez intéressante, les seules diatomées centriques séquencées à ce jour appartiennent au genre *Thalassiosira* confirmant l'importance de ce genre dans l'étude des diatomées centriques. Cependant est-ce que ces 2 diatomées sont les meilleurs modèles ? Leur milieu de vie ainsi que leur origine ne constitueraient-ils pas leur propre limite ?

5. Intérêt du modèle *Thalassiosira weissflogii*

Lorsque nous analysons les données bibliographiques portant sur l'espèce *T. weissflogii*, nous remarquons que la grande majorité des publications datent des années 1990 et du début des années 2000. Même si les chiffres exacts sont difficiles à estimer, *T. weissflogii* était l'une des diatomées du genre *Thalassiosira* les plus étudiées avant le séquençage de *T. pseudonana*. On peut alors se demander quels sont les intérêts de *T. weissflogii* ? A-t-elle été choisie par hasard ou possède-t-elle des caractéristiques particulières ?

T. weissflogii est retrouvée dans de nombreux écosystèmes côtiers et estuariens (Brand 1984). De nombreux écotypes de cette souche existent et sont disponibles dans les différentes algothèques (Sorhannus et al 2010). En plus d'être représentative du genre des *Thalassiosira*, cette diatomée possède un cycle de vie relativement court (~24 h) pour un diamètre dans la moyenne de bien des espèces (~12 µm). Cette espèce a aussi été largement étudiée au niveau de sa photosynthèse (Lippemeier et al 1999), de sa composition pigmentaire (Katayama et al 2011), de ses CCM (Morel et al 2002), de son cycle cellulaire (Vaulot et al 1987) ou de sa reproduction sexuée (Armbrust 1999). La mise en évidence CDCA semble être l'une des découvertes majeures faites chez cette espèce (Lane et al 2005). Cependant, les informations génétiques sont rares et seuls quelques gènes clés comme les CDCA et le génome chloroplastique étaient disponibles au début de mes trois années de recherche. Étant donné que la taille du génome de *T. weissflogii* avait été estimée à plus de 17 fois supérieure à celle de *T. pseudonana*, cette diatomée n'a pas été retenue pour le premier séquençage de diatomée (Connolly et al 2008).

Comme nous le verrons par la suite, nous avons choisi de séquencer et d'assembler le transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* pour étudier ses caractéristiques tout en profitant des connaissances physiologiques et morphologiques importantes de cette souche. Ce transcriptome permet également d'enrichir les informations génétiques sur les diatomées centriques du genre *Thalassiosira* et placer *T. weissflogii* comme modèle pour les environnements perturbés.

Le genre *Thalassiosira* et intérêt du modèle alternatif *T. weissflogii*

Les diatomées de l'ordre Thalassiosirales sont les diatomées centriques les plus étudiées. Ces 500 espèces de diatomées planctoniques possèdent une histoire évolutive particulière, une haute résolution phylogénétique et une distribution large dans tous les écosystèmes aquatiques plaçant cet ordre comme modèle particulièrement intéressant. Parmi les trois genres composant cet ordre, les *Thalassiosira* sont les plus étudiées. Avec le séquençage en 2004 du premier génome de diatomée de *T. pseudonana* suivi de celui de *T. oceanica* en 2012 et les 6 génomes chloroplastiques, dont celui de *T. weissflogii*, ce genre possède plusieurs milliers de gènes disponibles. Couplé à cela, ce genre est aussi le modèle privilégié pour étudier la biominéralisation (caractérisations des protéines du frustule, analyse du processus de biominéralisation *in vivo*,...). Même si *T. pseudonana* et *T. oceanica* sont les *Thalassiosira* les plus étudiées, *T. weissflogii* semble être une diatomée intéressante pour étudier les variations transitoires des environnements côtiers, pour essayer de dégager les stratégies d'acclimatation mises en place et pour l'étude du processus de biominéralisation.

E. Objectifs du projet de recherche

Analyser les capacités d'acclimatation des microalgues permet de comprendre leur évolution et d'anticiper leurs réponses aux contraintes environnementales. Dans cette thèse, nous nous proposons d'analyser les stratégies d'acclimatation aux contraintes environnementales mises en place chez les diatomées à différentes échelles temporelles et chez différentes espèces. Au travers de ces études, nous souhaitons aussi apporter des informations nouvelles sur le rôle central de l'homéostasie ionique dans la physiologie cellulaire, la plasticité phénotypique et la dynamique du processus de biominéralisation.

Depuis la démocratisation et l'accessibilité aux études transcriptomiques, il est possible d'étudier la réponse de l'ensemble des gènes exprimés chez un organisme lors de perturbations biotiques ou abiotiques. Les études des transcriptomes, qui sont clairement une alternative aux études génomiques, apportent aussi des informations sur la composition des gènes d'une espèce, la présence de variants d'épissage, d'éléments transposables exprimés, ... La connaissance du transcriptome, et donc du protéome potentiel, permet donc de faire des études comparatives sur l'évolution des gènes. Nous avons dans un premier temps étudié en détail le transcriptome *de novo* de l'espèce *Thalassiosira weissflogii* qui a été le modèle privilégié dans le cadre de ce projet de recherche. Ce transcriptome a permis de faire quelques études comparatives sur l'évolution des génomes des diatomées et d'étudier au niveau génomique les stratégies d'acclimatation. Dans la mesure du possible, nous avons essayé de mettre en parallèle cette réponse transcriptomique à des mesures physiologiques (croissance, métabolisme du carbone et du silicium, activité photosynthétique, mesure du pH cytosolique, ...) et morphologiques des valves pour en dégager les stratégies d'acclimatation en fonction du temps.

Afin d'avoir une vision plus large sur la capacité des diatomées à faire face aux contraintes environnementales, nous avons réalisé des études comparatives à différents niveaux (physiologiques, morphologiques et transcriptomiques) entre deux espèces du genre *Thalassiosira* écologiquement éloignées : *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Cette étude a pour but de comprendre si deux diatomées utilisent des réseaux de gènes similaires ou non pour s'acclimater à un même stress.

Cette étude vise à répondre aux questions suivantes :

- (1) Quelles sont les caractéristiques du transcriptome de *T. weissflogii* ?
- (2) Quelles informations nouvelles apportent ce transcriptome par rapport aux autres diatomées ?
- (3) La diatomée *T. weissflogii* est-elle capable de s'acclimater efficacement à un gradient hyposalin aussi bien au niveau physiologique, morphologique que transcriptomique ?
- (4) Quelle est l'histoire évolutive des transporteurs à protons vacuolaires chez les diatomées et quels peuvent être leurs rôles dans la régulation du pH cytosolique ?
- (5) Deux diatomées du même genre mais écologiquement éloignées répondent-elles de manière identique à un gradient couplé de pH et de salinité ?
- (6) La régulation du pH cytosolique est-elle identique quelle que soit la diatomée considérée ?

Avant d'essayer de répondre à ces questions, une partie **Méthodes d'analyses** présente l'ensemble des protocoles utilisés dans le cadre de ce projet de recherche.

Le **Chapitre I** détaille les méthodes et outils qui ont été utilisés dans la réalisation du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* ainsi que ses caractéristiques.

Le **Chapitre II** présente les réponses physiologiques, morphologiques et transcriptomiques de la diatomée côtière *T. weissflogii* à un gradient salin à court et à long-terme.

Le **Chapitre III** propose une étude sur l'évolution et les rôles potentiels des transporteurs à protons vacuolaires chez les diatomées.

Le **Chapitre IV** compare la réponse physiologique, morphologique et transcriptomique de *T. weissflogii* à *T. oceanica* en réponse à un gradient couplé de pH et de salinité. Un focus tout particulier sera proposé autour de la régulation du pH cytosolique. Ce dernier chapitre comprend certaines analyses encore préliminaires qui seront complétées ultérieurement.

Enfin, l'ensemble de ces résultats est discuté dans une dernière partie **Discussion et perspectives** où les connaissances théoriques, les résultats de ce projet de recherche et les perspectives sont entrecroisés.

Méthodes d'analyses

Afin de ne pas alourdir la lecture du manuscrit, l'ensemble des méthodes d'analyses seront détaillées dans cette partie. Le dispositif expérimental et les analyses statistiques de chaque étude seront repris dans les parties correspondantes.

A. Conditions de culture

Les diatomées étudiées proviennent du *Provasoli-Guillard National Center of Marine Algae and microbiota* (CCMP) et correspondent à *T. weissflogii* (CCMP 1051) et *T. oceanica* (CCMP 1005). Les différentes cultures axéniques sont cultivées dans un milieu d'eau de mer artificiel (ASW) identique à celui décrit par Vartanian *et coll.* (Vartanian et al 2009). Après stérilisation à l'aide d'un autoclave (125 °C, 25 min), le milieu est complété par l'ajout d'acide orthosilicique (175 µM finale ; quantité non limitante), d'hydrogénophosphate de dipotassium (0,3 mM finale) ainsi que d'un mixte de vitamines (biotine à 50 µg.L⁻¹, vitamine B12 à 50 µg.L⁻¹ et thiamine à 0,1 µg.L⁻¹). Selon les protocoles expérimentaux, la concentration en NaCl et le pH sont modifiés. Le pH est contrôlé régulièrement à l'aide d'un pH/conductimètre (4Star+, Fisher) pour s'assurer de sa stabilité. Les cultures sont maintenues à 19 °C dans des flasques en polycarbonate (Corning) avec un cycle jour/nuit de 12 h : 12 h et une intensité lumineuse proche de 100 µEinstein m⁻² s⁻¹. Chaque culture est repiquée hebdomadairement.

Pour avoir une "sauvegarde" des cultures et s'assurer du maintien de leurs axénies, des repiquages en boîte de pétri sur gel d'agar stérile à 0,8 % sont effectués tous les trois mois.

B. Analyses physiologiques

1. Mesure du temps de génération des cellules

Le comptage de la densité cellulaire est réalisé grâce un cytomètre de flux. Toutes les 24 h pendant 5 jours, 200 µL culture sont prélevées et la densité cellulaire est déterminée avec un *FACSVerse* (Becton et Dickinson) et le logiciel *FACSuite* associé. Le *FACSVerse* est programmé de façon à compter

pendant 1 minute ou alors jusqu'à 1 000 000 d'évènements. Pour chaque culture, tous les évènements de comptage sont analysés sur un graphe présentant le *Forward light scatter* (FSC-A), corrélé à la taille cellulaire, en fonction de la fluorescence de la chlorophylle (Figure 26). Pour nos analyses, nous sélectionnons uniquement les évènements ayant une fluorescence chlorophyllienne et un FSC-A supérieur à 10^3 qui correspondent à des diatomées vivantes.

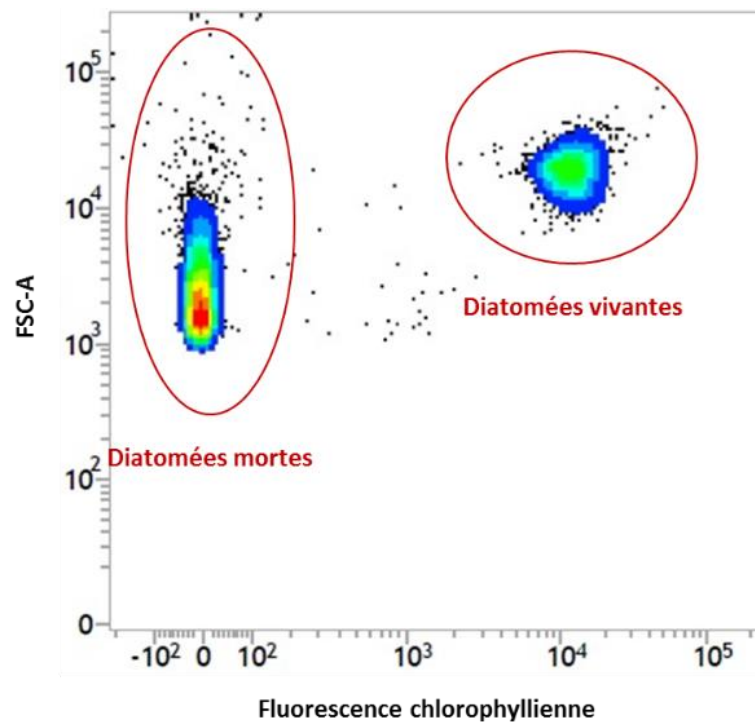


Figure 26 : Exemple de graphique provenant d'une analyse en cytométrie de flux présentant le FSC-A en fonction de la fluorescence chlorophyllienne. Les mesures du FSC-A (*Forward Scatter*) sont relatives à la taille des cellules.

2. Extraction et caractérisation pigmentaire

L'extraction des pigments est un processus délicat car leur ajustement est rapide en fonction de l'état lumineux et du stress cellulaire (Goericke and Welschmeyer 1992). Pour éviter le plus possible cette variabilité, les cellules prélevées sont filtrées délicatement au travers de filtres $0,2 \mu\text{m}$ (GF/F, Whatman) puis rapidement fixées dans de l'azote liquide. Cette fixation permet de figer les cellules sans altération de la composition pigmentaire. Chaque filtre est ensuite placé dans un tube en verre et conservé à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à l'étape d'extraction.

Pour celle-ci, 3 mL de méthanol 95 % tamponné avec une solution d'acétate d'ammonium 2 % sont ajoutés sur les filtres. Après broyage des filtres à l'aide d'un bâton en verre propre, les tubes sont placés à 4 °C. Après une heure d'extraction, les tubes sont centrifugés puis le surnageant est filtré à l'aide de filtre 0,2 µm et placé dans des vials. Cette étape de filtration permet d'éliminer les particules solides qui pourraient endommager et boucher le système microfluidique de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

En termes d'équipement, nous disposons d'une HPLC Agilent 1260 Infinity composée d'une pompe (VL 400 bar), d'un détecteur de photodiode UV-VIS (DAD 1260 VL, 190 à 950 nm) et d'une boucle d'injection des échantillons de 100 µL. La séparation chromatographique en phase inverse des différents pigments est réalisée sur une colonne de type C18 (Superlcosil, 25 cm de long, 4,6 mm de diamètre interne). Différents solvants sont utilisés en accord avec la méthode d'analyse réalisée: une solution d'acétate d'ammonium 0,5 M dilué dans du méthanol et de l'eau distillée (85 : 15, v : v ; *Solvant 1*), un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée (90 : 10, v : v ; *Solvant 2*) et une solution d'acétate d'éthyle 100 % (*Solvant 3*). La méthode d'analyse suivie est celle décrite dans par Brotas et Plante-Cuny (Brotas and Plante-Cuny 2003) qui permet de régler le gradient de solvant et le flux (Tableau IV).

Tableau IV : Protocole d'analyse des pigments par HPLC

Temps (min)	Solvant (%)			Flux (mL.min ⁻¹)	Type de gradient
	1	2	3		
0	60	40	0	0,6	Injection
2	0	100	0	0,6	Linéaire
7	0	80	20	0,6	Linéaire
17	0	50	50	0,6	Linéaire
21	0	30	70	0,6	Linéaire
28,5	0	30	70	0,6	Linéaire
29,5	0	100	0	0,6	Linéaire
30,5	0	40	0	0,6	Linéaire

Une fois la HPLC configurée, une étape de calibration est réalisée à partir de différents pigments standards disponibles comme la chlorophylle a (Chl_a), la chlorophylle c (Chl_c), l'astaxanthine (Ast), le β-carotène (Caro) et la fucoxanthine (Fuco). Ces pigments ont été injectés successivement avec différents facteurs de dilution pour connaître la relation existante entre l'aire du pic observé et la concentration effective des pigments.

3. Mesure fluorimétrique des paramètres photosynthétiques

Les différentes mesures des paramètres photosynthétiques ont été réalisées à l'aide d'une technique fluorimétrie *in vivo* non-invasive appelée le *Multicolor-PAM fluorimeter* (Walz, Effeltrich, Germany). Ce PAM permet de mesurer à 5 longueurs d'onde différentes (440, 480, 540, 590 et 625 nm) certains paramètres photosynthétiques du photosystème II (PSII). Un nouvel échantillon est utilisé pour chaque longueur d'ondes utilisée en le laissant préalablement à l'obscurité pendant 10 minutes. Cette mise à l'obscurité permet d'éliminer l'ensemble des électrons présents entre les différents complexes photosynthétiques. Pour se faire, 3 mL de culture sont prélevés et placés dans une cuve en quartz puis analysés avec le PAM. L'une des premières mesures est celle de la fluorescence minimale ($F_{0(\lambda)}$) obtenue après une excitation par une lumière de faible intensité. Cette fluorescence $F_{0(\lambda)}$ correspond à la fluorescence émise par le PSII sans déclenchement de la photosynthèse. La seconde mesure consiste, après un flash lumineux puissant ($\sim 2500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pour chaque λ), de réduire l'ensemble des pools de quinone (A, B et plastoquinones) ne permettant plus le transport d'électrons. Cette mesure permet de déterminer la fluorescence maximale ($F_{m(\lambda)}$). En utilisant l'équation décrite par Schreiber *et coll.* (Schreiber et al 2012), nous pouvons calculer le rendement quantique du PSII ($F_v/F_{m(\lambda)}$), qui est également un indicateur de l'état physiologique des cellules selon cette équation :

$$F_v/F_{m(\lambda)} = (F_m \lambda - F_0 \lambda) / F_m \lambda$$

Pour chaque λ testées, les échantillons sont exposés pendant 55 secondes à chaque intensité (PAR). L'état de fluorescence minimal (F_s) et maximal (F_m) sont mesurés et nous permettent de déterminer l'efficacité photosynthétique du PSII pour chaque longueur d'onde en utilisant l'équation suivante :

$$F_m' \lambda / F_{m'} = (F_m' \lambda - F_s \lambda) / F_m' \lambda$$

Pour quantifier les autres paramètres photosynthétiques, il est essentiel de mesurer l'absorption fonctionnelle du PSII ($\sigma_{\text{PSII}\lambda}$). Ce paramètre décrit l'efficacité d'utilisation de la lumière au niveau du PSII qui conditionne le transport des électrons. La composition pigmentaire conditionne également ce paramètre. Une fois le $\sigma_{\text{PSII}\lambda}$ calculé, il est possible d'estimer le taux de transport d'électrons du PSII ($\text{ETR}(\lambda)$) qui se calcule selon l'équation suivante :

$$\text{ETR}(\lambda) = \sigma_{\text{PSII}\lambda} \times L \times \text{PAR}\lambda \times \frac{F_v/F_{m'}\lambda}{F_v/F_{m}\lambda}$$

où $\sigma_{PSII\lambda}$ est exprimé en nm^2 , L est la constante d'Avogadro exprimée en mol^{-1} et le PAR est le flux de densité de la lumière exprimé en $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Pour estimer les autres paramètres photosynthétiques dépendant de ces deux paramètres, nous appliquons le modèle *Eilers et Peeters* (Eilers and Peeters 1988) qui correspond à l'équation suivante :

$$\text{ETR}(\lambda) (\text{PAR}) = \text{PAR}(\lambda) / (a\text{PAR}(\lambda)^2 + b\text{PAR}(\lambda) + c)$$

En utilisant la valeur des paramètres a, b et c donné par le modèle nous calculons :

(1) La capacité maximale de photosynthèse $\text{ETR}(\lambda)_{\text{max}}$ (électron.(PSII.s)⁻¹) :

$$\text{ETR}(\lambda)_{\text{max}} = 1 / (b + 2\sqrt{ac})$$

(2) L'efficacité maximale de la photosynthèse $\alpha(\lambda)$ ((électrons.(PSII.s)⁻¹) ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)⁻¹) :

$$\alpha(\lambda) = 1 / c$$

(3) Le paramètre correspondant à la saturation lumineuse $E_k(\lambda)$ ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) :

$$E_k(\lambda) = \text{ETR}(\lambda)_{\text{max}} / \alpha(\lambda)$$

(4) L'intensité lumineuse optimale du PSII $E_{\text{opt}}(\lambda)$ ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) :

$$E_{\text{opt}}(\lambda) = \sqrt{c/a}$$

4. Mesure de l'incorporation du carbone

L'incorporation du carbone 13 (¹³C), était la technique privilégiée pour mesurer la productivité primaire avant l'arrivée des techniques de fluorimétrie tel que le PAM ou encore, même si moins utilisé, le *Fast Repetition Rate Fluorimeter* (FrrF) (Raateoja 2004). Malgré une mesure directe de l'incorporation du carbone, cette technique reste relativement lourde, invasive et ne permet pas des analyses à hautes fréquences. De nos jours cette technique est davantage utilisée pour confirmer les résultats obtenus par fluorimétrie qui ne donne pas directement la mesure de l'incorporation du carbone. Il est admis qu'il existe une corrélation directe entre la mesure de la fixation du carbone et le taux de transport des

électrons (ETR) (Napoleon et al 2014). Dans nos études, la mesure de l'incorporation du carbone a été réalisée pour vérifier et compléter les résultats obtenus au Multicolor-PAM.

Les cultures en phase exponentielle sont inoculées avec du bicarbonate marqué au ^{13}C ($\text{NaH}_2^{13}\text{CO}_3$, 98 atom %, Sigma-Aldrich) correspondant à un enrichissement de 15 % du carbone inorganique dissous présent dans des flasque de 25 mL. Les cultures marquées sont placées dans les conditions de culture décrite précédemment. Un contrôle de l'incorporation non photosynthétique du carbone inorganique est réalisé en laissant la culture à l'obscurité. Après 3 heures d'incubation, 10 mL culture sont filtrés à l'aide d'un filtre GF/F (Whatman) de 25 mm de diamètre. Ces filtres sont ensuite exposés pendant 4 heures à du HCl fumant pour éliminer toutes traces de carbonate non incorporées puis séchés à 50 °C pendant 12 h (Napoleon et al 2013). La concentration en particules organiques de carbone (POC) et le ratio isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sont déterminés par un analyseur élémentaire EA 3000 (Eurovector, Milan, Italy) combiné avec un spectromètre de masse (IsoPrime, Elementar). Le taux de fixation de carbone (PChl) qui correspond à l'activité photosynthétique, après déduction de la valeur en C non-photosynthétique, est calculé suivant les recommandations de Hama *et coll.* (Hama et al 1983) et est exprimé en $\text{mmol C mgChla}^{-1} \text{h}^{-1}$.

5. Dosage des différentes fractions du métabolisme du carbone

Les carbohydrates peuvent se diviser en quatre grandes fractions : les carbohydrates internes (CI), les exopolysaccharides qui peuvent être sous formes solubles (sEPS), liées au frustule (bEPS) ou transparentes (TEP). Cette dernière fraction, qui est formée à partir de la chélation de cations divalents par les sEPS et bEPS, est dosée de manière spécifique.

Les fractions de CI, sEPS et bEPS sont extraites en suivant le protocole décrit par Pierre *et coll.* (Pierre et al 2010). Ce fractionnement est réalisé en trois étapes distinctes dont la première consiste à extraire les sEPS par centrifugation de 20 mL de culture (4 000 rpm, 10 min, 4 °C). Le surnageant, qui est conservé à 4 °C, correspond aux sEPS.

La seconde étape de fractionnement permet d'extraire les bEPS accrochés au frustule. Pour ce faire 0,5 g de résine cationique (Dowex Marathon C, forme sodique, activée dans du PBS pendant 1 h à 4 °C) et 5 mL de milieu de culture dépourvu de vitamines sont rajoutés au culot cellulaire. Ces échantillons sont alors placés à 4 °C sous constante agitation pendant 1 h. Après centrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C), le surnageant récupéré correspond aux bEPS.

La dernière étape de fractionnement repose sur une lyse cellulaire afin de récupérer les CI. Pour cela, les culots cellulaires, repris dans 5 mL de milieu de culture, sont placés dans un bain d'ultrasons pendant 10 min. Après centrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C), le surnageant correspondant aux CI est récupéré et conservé à 4°C en attendant d'être dosé.

La quantification des carbohydrates est réalisée en suivant la méthode phénol-acide-sulfurique décrite par Dubois *et coll.* avec le D(+) Anhydrous glucose (Sigma Aldrich) comme standard pour la gamme étalon (Dubois et al 1956). Au final, la concentration de chacune de ces fractions est exprimée en $\text{fg C.L}^{-1}.\text{cell}^{-1}$ grâce à la mesure au préalable de la densité cellulaire.

L'extraction et la quantification des TEP sont réalisées en suivant un protocole décrit par Claquin *et coll.* (Claquin et al 2008). Ainsi 10mL de culture sont centrifugés (4 000 rpm, 20 min, 4 °C). Après avoir enlevé l'intégralité du surnageant, 2 mL d'une solution de bleu alcian (0,02 % Alcian blue (Sigma) dilués dans une solution acide acétique à 0,06 % acidifiée à pH 2,5 sont ajoutés. Le bleu alcian permet une coloration spécifique des TEP. De nombreuses étapes de centrifugation et de lavage avec de l'eau distillée sont ensuite nécessaires pour enlever les traces de bleu alcian n'ayant pas coloré les TEP. La quantification par colorimétrie (787 nm) est réalisée après une incubation des culots pendant 2 h en présence de 6mL d'acide sulfurique à 80 %. Le standard correspond à de la gomme de Xanthane (Sigma-Aldrich) solubilisée dans de l'éthanol absolu et permet, grâce à une équation de conversion décrite par Engel *et coll.* (Engel and Passow 2001), d'exprimer la concentration de TEP en $\text{pgC équivalent xanthane.L}^{-1}.\text{cell}^{-1}$.

6. Mesure *in vivo* du pH cytosolique

La mesure du pHi des diatomées a déjà été réalisée par Herve *et coll.* (Herve et al 2012) en utilisant la sonde fluorescente 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein plus couramment appelée le BCECF.

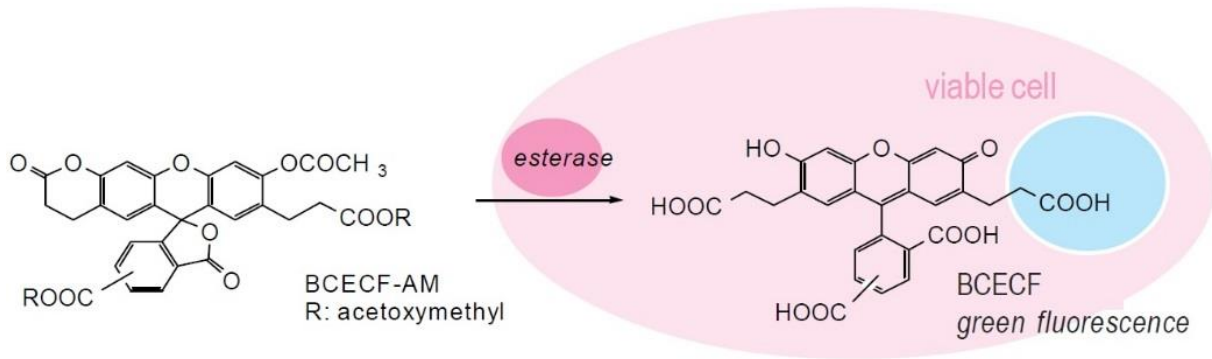


Figure 27 : Processus de clivage de la liaison ester du BCECF-AM. Une fois la liaison clivée, le fluorophore ne peut plus diffuser librement au travers des membranes et s'accumule donc à l'intérieur des cellules.

La modification de cette carboxyfluoresceine (BCECF) avec une liaison ester AM permet d'obtenir une molécule non chargée (BCECF-AM) de pK_a 7,0. Le BCECF-AM peut alors diffuser passivement au travers de la membrane mais une fois à l'intérieur de la cellule, des estérases non spécifiques vont couper cette liaison ester. Le BCECF devient alors chargé et ne peut plus passer les membranes lipidiques (Figure 27).

Cette sonde fluorescente a déjà été utilisée comme indicateur ratiométrique de la concentration en protons chez un grand nombre d'espèces différentes. Le pH_i est mesuré en déterminant le ratio de l'intensité d'émission à 535 nm avec une excitation à $\lambda_{ex1} = 485 \pm 25$ nm et à $\lambda_{ex2} = 436 \pm 10$ nm (Figure 28).

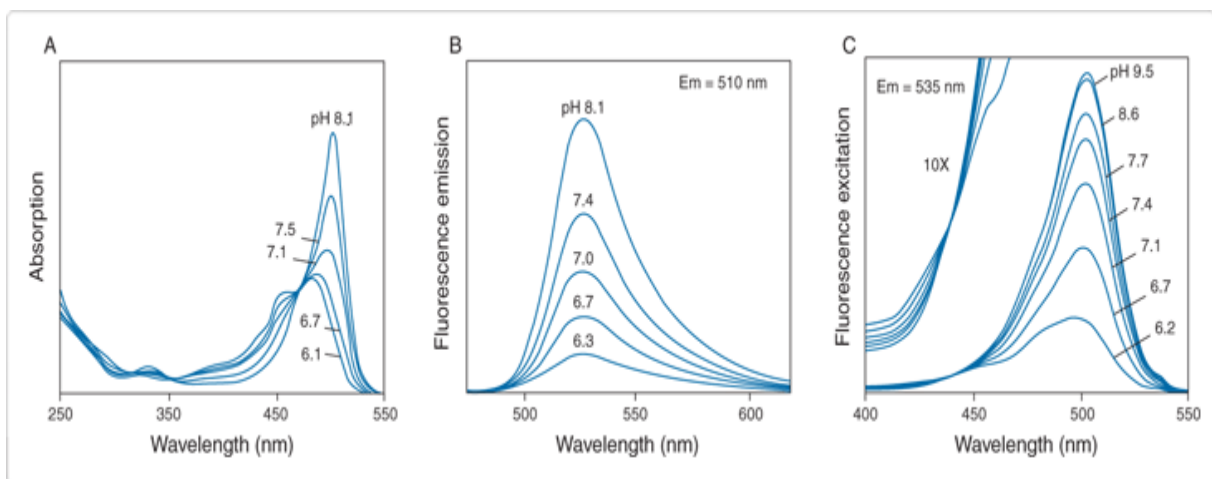


Figure 28 : Spectre d'absorption et d'émission du BCECF-AM montrant l'évolution de sa fluorescence en fonction du pH. Ces spectres sont extraits des fiches techniques du BCECF-AM fournis par le fournisseur.

Pour quantifier ces variations de fluorescence en termes de pH cytosolique, il est important de réaliser des gammes *in vitro* et *in situ*.

La gamme *in vitro* permet de confirmer que les variations de fluorescence du BCECF sont bien dues à un changement de pH connu. A partir d'un milieu tampon (conductance = 11 mS.cm⁻¹) supposé contenir les ions majeurs retrouvés dans le cytoplasme de la cellule (100 mM KCl, 30 mM de NaCl, 500 mM mannitol) ainsi que des tampons chimiques (25 mM MES, 25 mM de HEPES), nous faisons varier le pH. Une gamme de pH est réalisée d'un pH 6,2 à 8,5 avec un pas de 0,3 unité de pH. Dans cette solution tampon mimant le cytoplasme, le BCECF-acid est ajouté. Ensuite 13 µL de milieu tampon contenant 5 µM de BCECF, sont déposés entre lame et lamelle et observés avec un microscope épifluorescent (DM IRB microscope – Leica) couplé à une caméra CCD (Hamamatsu Orca R2) et un objectif 100X (APO 100x/1.40-0.70 Oil CS). A l'aide des billes fluorescentes GFP (PS-Speck TM Microscope Point Source, Life Technology), le plan focal est déterminé puis l'acquisition aux deux longueurs d'ondes d'excitations est réalisée à différentes positions suivant l'axe des z ($\pm 6 \mu\text{M}$ avec un pas de 1 μm). A l'aide du logiciel Metamorph, des zones d'intérêts (ROI) sont définies et l'intensité de fluorescence est mesurée pour tous les plans focaux. Le calcul du rapport $\lambda_{485} / \lambda_{436}$ de l'intensité de fluorescence relie les variations de fluorescence observées à des variations de pH :

$$\Delta \text{fluo BCECF} = \frac{(\text{Intensité de fluorescence ROI à } \lambda_{485} - \text{Intensité de fluorescence background à } \lambda_{485})}{(\text{Intensité de fluorescence ROI à } \lambda_{436} - \text{Intensité de fluorescence background à } \lambda_{436})}$$

La gamme *in situ* permet de tester la variation de la fluorescence du BCECF mais en fonction d'un pHi imposé. Pour réaliser cette gamme, 5 µM de BCECF-AM sont ajoutés à la culture. Après 20 minutes d'incubation à l'obscurité, les cellules sont centrifugées délicatement (1300 rpm, 5 min, 19 °C) puis les culots sont repris avec 1 mL de milieu tampon ajusté au pH désiré. Cette étape de lavage est répétée 3 fois successivement pour enlever les traces de milieu de culture. Pour que le pHi soit identique au pHe, les cellules sont mises en présence de deux inhibiteurs (10 µM de nigéricine et 10 µM de monensine). La monensine et la nigéricine sont des ionophores bactériens capables de transporter des ions à travers la membrane plasmique, jouant ainsi un rôle important comme antiport Na⁺/H⁺ et K⁺/H⁺ respectivement. Ces drogues permettent un équilibre du pH intracellulaire en fonction du pH extracellulaire. La gamme *in situ* s'étale de pH 6,2 à pH 8,5 et les paramètres d'acquisitions sont les mêmes que pour la gamme *in vitro*. Là encore, des mesures de l'intensité de fluorescence des ROI sont réalisées à différentes positions le long de l'axe des z.

Une fois les gammes *in vitro* et *in situ* obtenues, il est alors possible de relier les variations de fluorescence du BCECF à des valeurs de pH intracellulaire. Pour les acquisitions du pH_i, les cellules prélevées sont incubées pendant 20 min à l'obscurité avec 5 μM de BCECF-AM. Sans aucune étape de rinçage, l'acquisition de la fluorescence cytosolique est quantifiée en respectant les paramètres d'acquisition établis lors de la gamme *in situ*.

7. Tentative de mesure *in vivo* du pH vacuolaire

La valeur du pH vacuolaire (pH_v) n'a jamais été quantifiée *in vivo* chez les diatomées malgré quelques estimations. Cependant, il existe chez les levures une sonde fluorescente, la carboxyfluoresceine 6-CFDA (6-Carboxyfluorescein Diacetate), permettant de mesurer le pH_v. En se basant sur l'article de Preston *et coll.* (Preston et al 1989), nous avons essayé d'adapter cette technique à la mesure du pH_v chez les diatomées.

A partir des cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae* BY 4742 cultivées dans du milieu *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YPD) à 30 °C, nous avons réalisé des tests de marquage en suivant le protocole décrit par Preston *et coll.* (Preston et al 1989). Une fois le protocole validé, nous avons tenté de l'appliquer aux diatomées (*T. weissflogii*, *T. oceanica* et *P. tricornutum*).

8. Dosage du silicium intracellulaire et biogénique

La quantification du silicium intracellulaire (Sii) et de la silice biogénique (BSi) par cellule est faite en suivant en partie le protocole décrit par Hervé *et coll.* (Herve et al 2012) avec quelques différences.

A partir de 10 mL de culture en phase exponentielle, une étape de centrifugation permet d'obtenir un culot cellulaire. Ce dernier est dans un premier temps lavé avec 5 mL de milieu de culture correspondant mais dépourvu d'acide orthosilicique. Après une nouvelle centrifugation (4 000 rpm, 5 min, 19 °C), le culot cellulaire est repris dans 1 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, la lyse cellulaire est réalisée à chaud (90 °C) dans un bain-marie pendant 10 min puis refroidit à température ambiante. Ces cellules lysées sont ensuite centrifugées (4 000 rpm, 5 min, 19 °C) et le surnageant,

correspondant à la fraction Sii, est récupéré et conservé à 4 °C. Les culots cellulaires restants sont ensuite lavés 4 fois avec de l'eau distillée avant l'étape d'hydrolyse alcaline de la silice biogénique par ajout de NaOH (0,2 M). Après 45 min d'hydrolyse à 90 °C, l'hydrolysate est neutralisé par l'ajout de HCl (1,0 M) puis de Tris-HCl (10 mM, pH = 7,0) pour obtenir un pH neutre.

Le dosage colorimétrique des deux différentes fractions est réalisé suivant la méthode au *molybdenum-blue* décrite par Strickland *et coll.* (Strickland et al 1972) en utilisant du tetramethylorthosilicate (TMOS) pour la gamme de référence. Après détermination de la densité cellulaire par cytométrie, cette méthode de dosage du silicium permet d'obtenir la concentration de chaque fraction par cellule exprimée en $pmol Si.cell^{-1}$. Le taux d'incorporation de silicium (InCR) par cellule est calculé en divisant la concentration en BSi par cellule par la fréquence de division journalière et correspond au taux de silicium biominéralisé au cours d'une génération. L'InCR est exprimé en $pmol Si.cell^{-1} \mu max^{-d}$.

C. Analyses morphologiques

1. Purification et observation au microscope électronique des valves

Les frustules des diatomées sont généralement entourés de composés organiques comme les bEPS qui peuvent poser des difficultés lors de l'observation des valves au Microscope Electronique à Transmission (MET). Pour cette raison, les frustules sont généralement purifiés.

Après avoir prélevé 10 mL de culture, les cellules sont lavées à trois reprises avec de l'eau distillée. Les culots cellulaires sont alors resuspendu en présence d'un mélange de 5 mL d'acide sulfurique 96 % et 1 mL d'acide nitrique 80 %. Après 30 minutes de ce traitement acide, les culots correspondants à la matière siliceuse sont lavés 4 fois à l'eau distillée filtrée. Le dernier culot cellulaire est repris dans 1 mL d'eau distillée filtrée et stocké à -20 °C dans l'attente des observations.

Pour les observations au MET, 50 µL de solution contenant les valves purifiées sont déposés sur une grille en cuivre de 200 *Mesh* puis séché dans un endroit sec à l'abri de la poussière. Les observations sont réalisées grâce à un MET Hitashi H-700 équipé d'une caméra Hamamatsu.

2. Morphométrie des frustules des différentes diatomées

a) Analyse microscopique

Les espèces du genre *Thalassiosira* partagent des caractères morphologiques communs comme par exemple un rimoportulae (structure siliceuse en forme de lèvre) et des fultoportulae centraux et marginaux (Kaczmarska et al 2006). A partir des images MET et en utilisant le logiciel *ImageJ*, différents traits morphologiques sont déterminés dont : le diamètre (D), le nombre de fultoportulae centraux (NFc) ou marginaux (NFm) et leurs distances moyennes entre eux (DFm et DFc) (Figure 29).

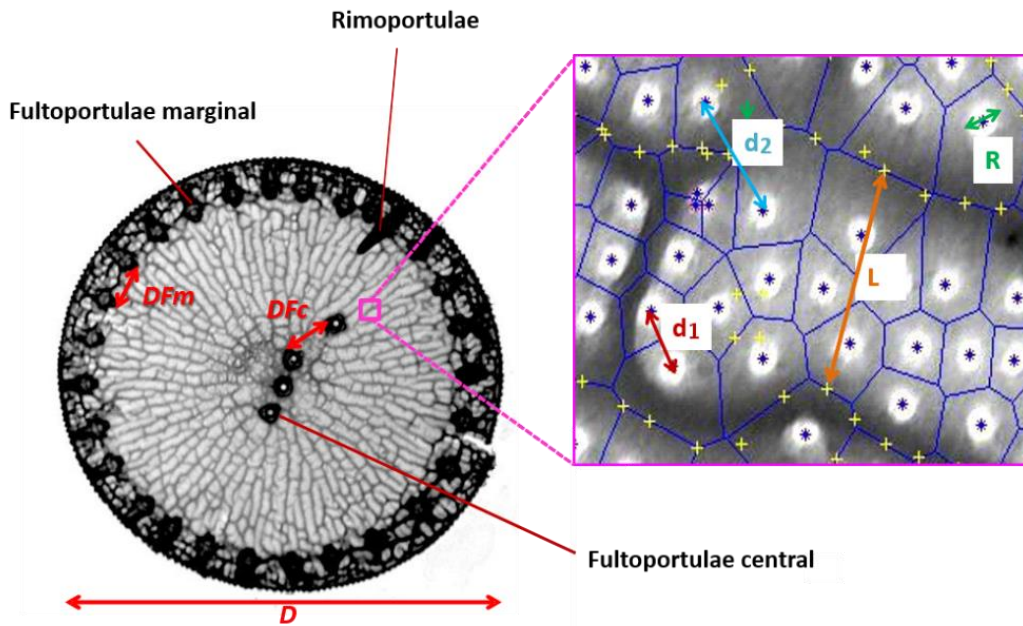


Figure 29 : Image MET d'une valve de *T. weissflogii* et d'un agrandissement montrant certaines nanostructures. Les différentes caractéristiques du frustules ainsi que certains paramètres mesurés sont représentés. Grossissement 8 000X et 60 000X.

Pour *T. weissflogii* il est possible de mesurer deux paramètres originaux que nous avons introduits : "accuracy" et "precision". Pour *T. oceanica* nous avons calculé la distance existante entre la position de l'unique fultoportulae et le barycentre de la valve (DBB).

L'accuracy est un indicateur qui varie de 0 à 1 et qui vise à déterminer la proximité du centre de gravité des fultoportulae centraux par rapport au centre de gravité de la valve. Plus les deux centres de gravités sont proches et plus l'accuracy est proche de 1. Ce paramètre est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$Accuracy = \left(\frac{\left(\frac{\sum \vec{FcBcell}_{xi}}{Nb Fc} \right)^2 + \left(\frac{\sum \vec{FcBcell}_{yi}}{Nb Fc} \right)^2}{Rayon\ de\ la\ cellule} \right)^{-1}$$

La precision est un indicateur permettant de mesurer la dispersion des fultoportulae centraux entre eux. Plus ces fultoportulae sont proches les uns des autres et plus la precision est proche de 1. Ce paramètre est calculé selon l'équation suivante :

$$Precision = \left(\frac{\left(\left(\frac{\left(\sum \left(\frac{\vec{FcBcell}_{xi}}{Nb\ Fc} \right)^2 \right)}{Nb\ Fc} + \frac{\left(\sum \left(\frac{\vec{FcBcell}_{yi}}{Nb\ Fc} \right)^2 \right)}{Nb\ Fc} \right) - \left(\left(\frac{\sum \vec{FcBcell}_{xi}}{Nb\ Fc} \right)^2 + \left(\frac{\sum \vec{FcBcell}_{yi}}{Nb\ Fc} \right)^2 \right)^2}{Rayon\ de\ la\ cellule} \right)^{-1}$$

b) Analyse des nanostructures des valves de *T. weissflogii*

Pour approfondir les analyses morphologiques des valves de *T. weissflogii*, nous avons analysé certaines des nanostructures présentes sur les valves uniquement dans le Chapitre IV.

Pour ce faire, nous utilisons un script d'analyse d'images développé pour notre étude sous Matlab en collaboration avec Julien Derr (Université Paris 7 Denis Diderot). Ce script permet de mesurer de manière semi-automatique la taille et la densité des nanopores, la taille des plaques siliceuses contenant les pores appelés *semi-continuous cribrum* et leurs distances entre elles. Ce script est découpé en 5 grandes étapes qui sont résumées en images dans la Figure 30 pour plus de clarté :

(1) La première étape consiste, à partir d'images prises avec un grossissement de 60 000X (Figure 30A), de réduire le bruit des images par un algorithme de réduction de bruit développé par Lionel Moisan (Université Paris Descartes). Ceci permet d'obtenir des images plus homogènes où la granulosité de l'image est "lissée" (Figure 30B).

(2) La seconde étape consiste à "binariser" l'image en prenant en compte l'échelle des gris de l'image initiale. Les nanopores étant des structures les plus intenses, ils apparaîtront en blanc et tout le reste en noir (Figure 30C).

(3) La troisième étape permet d'identifier les régions circulaires correspondant aux nanopores, d'en déterminer leur rayon (R), leur densité qui correspond à la surface occupée par les nanopores par rapport à la surface totale de l'image, ainsi que leurs coordonnées (Figure 30D).

(4) La quatrième étape utilise les coordonnées des nanopores pour effectuer un diagramme de Voronoï. Chaque cellule de Voronoï enferme un seul nanopore et la limite de la cellule se situe à équidistance de 2 nanopores voisins (Figure 30D). A partir de ce diagramme nous calculons la distance moyenne entre deux nanopores voisins. La distribution de cette distance d permet d'observer 2 courbes gaussiennes correspondant à deux types de population de distance (Figure 30E):

$d1$: La plus faible distance correspond à la distance entre les nanopores appartenant au même cribum ;

$d2$: La plus grande distance correspond à la distance entre nanopores n'appartenant pas au même cribum.

Ces criba sont en fait des sortes de plaques siliceuses bombées et perforées de nanopores. Ces criba sont séparés par des bandes siliceuses denses appelées *ribs* plus opaques aux électrons. Pour $d1$ et $d2$, la moyenne de chaque Gaussienne est utilisée.

(5) Pour la dernière étape, le script détermine si deux pores voisins font partie d'un même cribum ou pas. Après avoir identifiés les pores voisins non présents sur le même cribum, un nouveau point est dessiné et se situe à équidistance entre les deux pores voisins (Figure 30F). En utilisant uniquement ces nouveaux points, un second diagramme de Voronoï est calculé (Figure 30G). Ce diagramme nous permis de calculer la distance séparant deux criba voisins (Figure 30H). De la même manière que précédemment, nous observons une distribution montrant deux gaussiennes successives. La première correspond aux distances mesurées entre les points appartenant à un même rib qui n'ont aucun intérêt morphologique et la seconde qui symbolise la distance entre les points n'appartenant pas à la même rib. Pour enlever la première gaussienne, nous avons mis en place un seuil permettant d'éliminer la première population (Figure 30I).

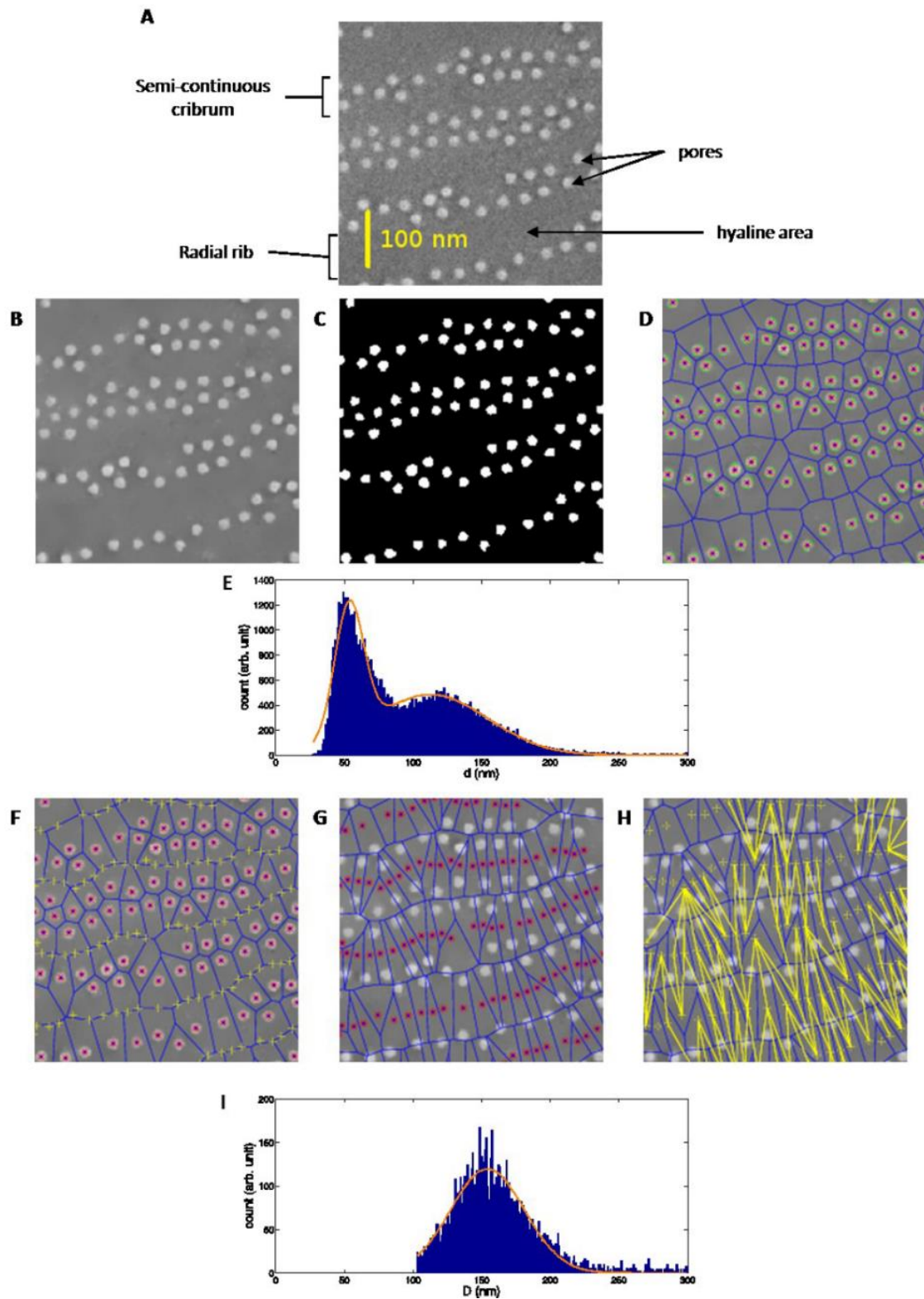


Figure 30 : Analyse des détails nanoscopiques des valves de *T. weissflogii*. L'image issue du MET (A) est débruitée (B) puis binarisée (C). Les nanopores sont ensuite localisés (en vert), analysés et le diagramme de Voronoi tracé (en bleu) (D). La distance entre les nanopores permet d'identifier deux populations (E) qui correspondent aux nanopores présent sur un même *semi-continuous cribrum* ou 2 *semi-continuous cribrum* voisins (F). La distance séparant 2 *semi-continuous cribrum* voisins (G) et leurs largeurs respectives (H). Ces figures proviennent de l'article d'Herve *et coll* (Herve et al 2012).

c) Analyse du pattern de *T. oceanica*

En observant les images acquises des valves de *T. oceanica*, nous nous sommes aperçus qu'il existait une modification du pattern des valves : certaines valves présentent des criba larges et nombreux et d'autres des plus petits et apparemment moins denses.

Pour quantifier la densité de cribum à la surface de la valve, nous utilisons des images acquises à un grossissement 10 000X et les analysons avec ImageJ. Dans un premier temps, une région de la valve comprise entre les fultoportulae axiaux et le central est découpée (Figure 31a) puis l'image est binarisée (Figure 31b). Les criba étant plus clairs que le reste, ils apparaissent en noir et le reste en blanc. Une fois les formes détectées (Figure 31c), les contours des différentes formes sont déterminés (Figure 31d). Ces contours sont ensuite quantifiés et leurs surfaces sont mesurées. En faisant le rapport entre la surface totale des criba et la surface totale de la zone étudiée, nous déterminons la densité en criba par valve analysée.

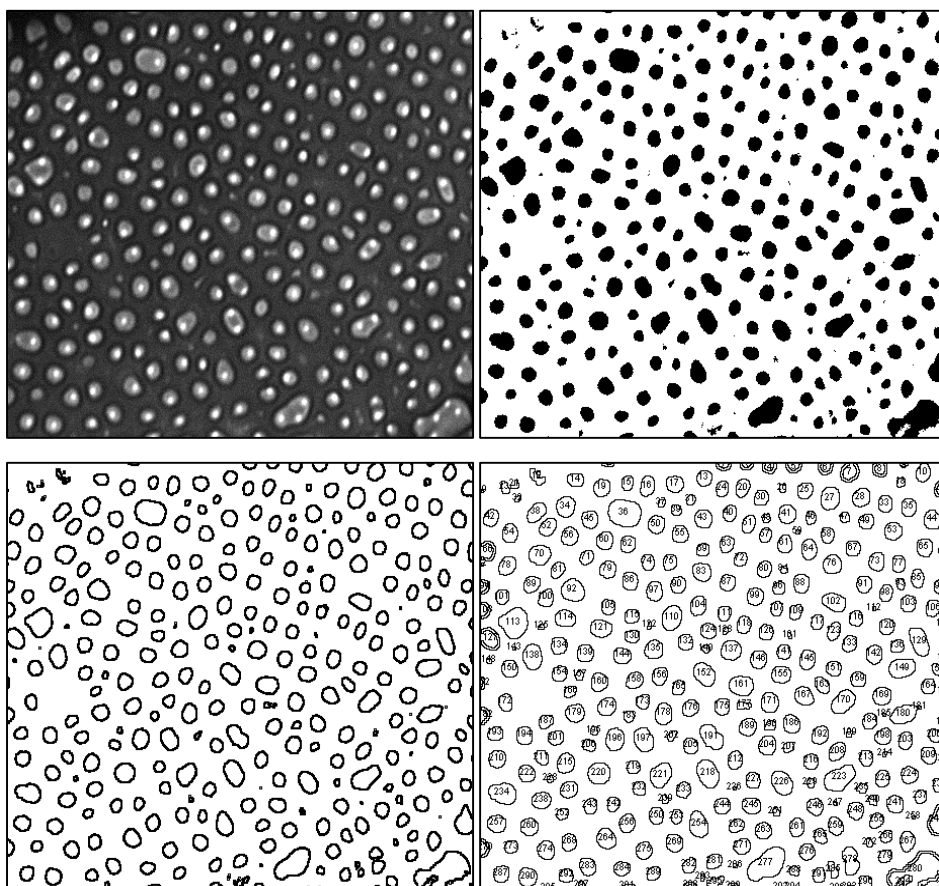


Figure 31 : Analyse de la densité des semi-continuous cribum de *T. oceanica*. L'image brute (a) est binarisée (b) puis le contour de chaque forme est déterminé (c) et la densité est déterminée en utilisant l'option "Analyze particules" d'ImageJ.

3. Analyse *in vivo* du processus de biominéralisation

Pour analyser le processus de biominéralisation, c'est-à-dire la synthèse des nouvelles valves, nous avons utilisé un système de mesure *in vivo* qui a nécessité plusieurs mois d'optimisation.

La première étape du protocole consiste à synchroniser les cellules en les plaçant 24 h à l'obscurité ce qui va entraîner un arrêt au même stade du cycle cellulaire des cellules. Par exemple Huysman *et coll.* décrivent qu'après 24 h à l'obscurité, la diatomée *T. pseudonana* est bloquée en G1 (Huysman et al 2010). Cette synchronisation a été vérifiée par fluorescence au laboratoire. Après la remise à la lumière, nous avons constaté qu'aucunes cellules de *T. weissflogii* ne se sont divisées après 2 h alors qu'après 8h se sont près de 75 % des cellules qui sont divisées. De manière concomitante avec la remise à la lumière, 1 μ L de fluorophore NBD-N2 (0,3 μ M final) est rajouté aux cultures, puis 1 mL de ces cellules marquées est prélevé à l'aide d'une seringue 1 mL (1001TLL, Hamilton) et injecté (20 μ L.min⁻¹) à l'aide d'un pousse-seringue (PHD 2000, Harvard apparatus) dans un système microfluidique permettant l'acheminement des cellules dans un capillaire transparent stérile (μ -Slide VI^{0.4}, Ibidi). Ce dernier est placé sur la platine d'un microscope inversé à épifluorescence (DM IRB microscope – Leica). Les images sont réalisées avec un objectif 10X (APO 0.70 CS, LEICA) et 20X (APO 0.40 CS, LEICA) pour respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica* et acquise par une caméra (Hamamatsu Orca R2). L'ensemble du système microfluidique et d'acquisition d'images sont placés dans une enceinte thermostatée et éclairée (19 °C, 100 μ Einstein.m⁻².s⁻¹). A l'aide du logiciel Metamorph-7.4, l'acquisition est réalisée toutes les 5 min pendant 16 h sur une dizaine de champs préalablement sélectionnés. Chaque acquisition est réalisée en contraste de phase (lumière blanche), à la fluorescence du NBD-N2 ($\lambda_{Ex} = 465 \pm 5$ nm et $\lambda_{Em} = 535 \pm 50$ nm) et à la fluorescence des chloroplastes ($\lambda_{Ex} = 485 \pm 25$ nm et $\lambda_{Em} = 675 \pm 50$ nm).

Les cellules pouvant présenter sur des périodes longues des déplacements, il est nécessaire de collecter une par une et à chaque temps leurs positions x et y en utilisant le plug-in *MTrackJ* d'ImageJ. Ensuite, à l'aide d'une macro ImageJ que nous avons développé spécifiquement pour ces analyses en collaboration avec Patricia Wills (MNHN), l'intensité de la fluorescence du NBD-N2 ainsi que la taille des cellules (image en contraste de phase) sont mesurées. Le script de la macro est disponible en Annexe A-1 page 242-243.

Au final, 25 cellules par conditions et par espèce ont été analysées manuellement ce qui représente un jeu de données de 450 cellules. La mise en place de ce protocole ainsi que l'analyse des résultats correspondent à un travail non négligeable de doctorat.

D. Analyses transcriptomiques

1. Extraction et purification des ARN totaux et contrôle qualité

Les ARN totaux sont extraits à partir de 50 mL de culture en phase exponentielle prélevé le même jour à la même heure et centrifugée délicatement (1 500 rpm, 5 min, 19 °C) en utilisant la technique du trizol (TRIZOL reagent – Invitrogen). Cette extraction est suivie d'un traitement à la DNase (Fermentas) pendant 15 minutes à 37 °C. Les ARN totaux extraits sont ensuite purifiés à l'aide du kit RNeasy (Qiagen, Allemagne). L'utilisation d'un Nanodrop (2000/2000C Thermo Scientific) et d'un bioanalyseur (Bioanalyzer – Agilent) permettent de quantifier les ARN totaux et vérifier leurs profils. Les ARN purifiés sont stockés à -80 °C.

2. Séquençage Illumina et assemblage du transcriptome *de novo*

L'obtention du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* s'est réalisée en trois grandes étapes qui seront détaillée ci-dessous.

Pour la première étape, des quantités égales d'ARN des échantillons étudiés dans le Chapitre II sont prélevées et rassemblées (1 µg d'ARN final dans 40 µL). Après une étape de purification des ARN messagers uniquement, ces ARN sont fragmentés en présence de zinc suivis par la synthèse ADNc en utilisant des random primers et la ribonucléase H (EC : 3.1.26.4). Cette ribonucléase hydrolyse le brin d'ARN dans un double brin hybride ADN:ARN et libère les extrémités 3'-OH et 5'-phosphate. Les extrémités de chaque brin d'ADNc sont réparées afin de permettre la ligation d'adaptateurs spécifiques. Les fragments de taille désirée sont ensuite purifiés sur gel, et utilisés comme matrice pour générer par amplification PCR des colonies d'ADNc formant la librairie. Cette librairie ainsi générée est contrôlée sur le LabChip GX (Caliper) pour vérifier la qualité des ADNc puis séquencée lors d'un run de titration sur MiSeq de type 1*50 paire de bases afin de s'assurer de la qualité de sa librairie et de la présence de séquences apparentées aux diatomées (voir Chapitre I).

La deuxième étape est réalisée en utilisant la technologie Illumina/Solexa (HiSeq2500) avec une stratégie *paired-end* (2*100 paire de base) sur 1/10 de ligne. Le séquençage Illumina de type *paired-end* permet de séquencer les deux extrémités de chaque fragment d'ADNc de la librairie.

La dernière étape d'assemblage est réalisée en trois temps. En premier, les *reads* obtenus lors du séquençage sont assemblés entre eux avec le logiciel VELVET v1.2.07 pour obtenir des contigs. Puis, les contigs sont assemblés entre eux avec le logiciel OASES v0.2.08 pour former des transcrits. Ce logiciel permet l'assemblage des transcriptomes *de novo* en prenant en compte l'épissage alternatif et le polymorphisme. Enfin, une étape de validation permet la sélection du meilleur assemblage et l'estimation du pourcentage de *reads* assemblés. Pour détecter le meilleur assemblage, 1 millions de paires de *reads* sont alignés sur les transcrits par le logiciel BWA v0.5.9 et celui avec le meilleur pourcentage d'alignement est sélectionné. Ensuite, pour estimer le nombre de *reads* assemblés, tous les *reads* sont alignés sur les transcrits de l'assemblage sélectionné précédemment. Nous reviendrons plus en détail dans le Chapitre I sur l'obtention et l'analyse de ce transcriptome *de novo*.

3. Analyse de la composition nucléotidique et de l'usage des codons

La composition nucléotidique des séquences codantes (cds) issues du transcriptome de *T. weissflogii* est analysée en deux temps. Le logiciel BioEdit permet de déterminer le pourcentage des quatre bases azotées (A, T, C et G) de l'ensemble des cds. En utilisant le logiciel CodonW, nous pouvons quantifier avec les mêmes séquences le pourcentage des 4 bases azotées sur la troisième position des codons.

4. Annotation du transcriptome *de novo*: Blast2GO et Trinotate

L'étape d'annotation d'un transcriptome est une étape importante qui permet notamment d'identifier les relations ontologiques qui existent entre les transcrits (*Gene Ontology* appelé GO).

L'ensemble des transcrits assemblés est annoté en utilisant deux logiciels différents : Blast2GO et Trinotate. Pour Blast2GO, nous utilisons le programme blastx qui permet de traduire les séquences

nucléotidiques dans toutes les phases et de les comparer à des banques de données protéiques. Pour cette étape de blastx, la valeur minimale d'identité (*E*-value) est fixée à 10^{-5} et la banque de données utilisée est NCBI nr database (b2g_sep13). Une fois terminée, une étape dite de mapping permet de relier les séquences blastées à des informations fonctionnelles présentes dans la banque de données des Gene Ontology (GO). Enfin, des étapes d'annotation permettent d'identifier des domaines protéiques (InterProScan), mais aussi d'assigner ces gènes à des enzymes potentielles et donc des voies métaboliques (KEGG).

Une autre annotation via Trinotate vient compléter la première en utilisant les cds. L'ensemble des transcrits du transcriptome est analysé par le logiciel Transdecoder qui permet de prédire les peptides (> 50 acide-aminés) et ainsi récupérer les cds correspondant. Les résultats de ces deux logiciels d'annotation sont fusionnés et comparés.

5. Identification des gènes des organelles et des transposons

L'identification des gènes des organelles du transcriptome de *T. weissflogii* est réalisée essentiellement manuellement en se basant sur les génomes d'organelles de diatomées disponibles. En effet, la majorité des gènes du chloroplaste et de la mitochondrie sont présents sur des opérons et ne peuvent donc pas être annotés facilement de manière automatique.

Dans un premier temps nous avons récupéré l'ensemble des séquences chloroplastiques disponibles chez *P. tricornutum*, *T. pseudonana*, *T. oceanica*, *Fistularia sp.* et *Odontella sinensis* ainsi que celles mitochondriales disponibles chez *P. tricornutum*, *T. pseudonana* et *Synedra acus*. Dans un second temps, ces séquences sont comparées (blastx) au transcriptome de *T. weissflogii* en fixant une *E*-value inférieure ou égale à 10^{-5} . Cette étape permet d'obtenir une liste de transcrits potentiel des organelles. Pour compléter cette étape d'identification, chaque séquence identifiée du transcriptome de *T. weissflogii* est soumise à un programme de reconnaissance de domaines conservés (ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) en utilisant les paramètres par défaut. Cette étape permet d'obtenir des informations sur l'organisation des différents gènes sur les opérons chloroplastiques et mitochondriaux.

Pour identifier les ARN de transferts (ARNt) chloroplastiques ou mitochondriaux, nous utilisons le logiciel online tRNAscan-SE 1.21 (Lowe and Eddy 1997) avec un paramétrage par défaut.

Pour caractériser les éléments transposables (ETs), nous utilisons un module PASTEC (Hoede et al 2014) qui correspond à un outil d'identification et de classification automatique des ETs (urgi.versailles.inra.fr/download/repet/REPET_linux-x64-2.2.tar.gz). Les bibliothèques de ETs déjà présentes dans ce module sont complétées par une bibliothèque additionnelle d'ETs spécifique aux diatomées fournie par le docteur Florian Maumus (INRA, Versailles).

6. Analyse de paralogie et d'orthologie

Pour l'analyse de la paralogie, c'est-à-dire des gènes dupliqués de *T. weissflogii*, nous nous sommes inspirés des travaux de Blanc *et coll.* (Blanc and Wolfe 2004). Ainsi, les transcrits présentant un alignement avec plus de 80 % d'identité et une *E*-value inférieure à 10^{-100} entre eux sont considérés comme des paires de paralogues.

Pour l'analyse d'orthologie, nous utilisons les peptides prédits de *T. weissflogii* et les protéomes disponibles (genome.jgi.doe.gov/) de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102 (release 1.0), de *Phaeodactylum tricornutum* CCMP 2561 (release 2.0), de *Pseudo-nitzschia multiseriata* CLN-47 (release 1.0) et de *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1335 (release 3.0) ainsi que les peptides prédits de *Thalassiosira oceanica* CCMP 1051 (release 1.0) accessibles sur le site du NCBI. Ces protéomes sont comparés en utilisant successivement les logiciels *Inparanoid* v4.1 (Ostlund et al 2010) et *cd-hit* suite v4.6 (Li et al 2001).

En complément de cette analyse d'orthologie, nous nous sommes focalisés sur certains groupes d'orthologues spécifiques :

- (1)** Les orthologues partagés par l'ensemble des diatomées : "*Diatom Core Gene*" (DCG) ;
- (2)** Les orthologues partagés uniquement par l'ensemble des diatomées du genre *Thalassiosira* : "*Thalassiosira Core Gene*" (TCG).

Pour connaître les spécificités de ces deux groupes, nous réalisons une analyse d'enrichissement de terme GO. Cet enrichissement est défini en utilisant l'outil *Singular Enrichment Analysis* (SEA) du logiciel AgriGO (Du et al 2010). Ce logiciel était initialement destiné aux plantes d'intérêt agricole pour l'analyse des GO mais peut être "détourné" avec une autre banque de référence. Pour la création de notre propre banque, nous téléchargeons l'ensemble de l'annotation fonctionnelle de la diatomée modèle *T. pseudonana* (JGI). Ainsi les termes GO de *T. pseudonana* sont récupérés à partir du fichier d'ontologie

go-basic.obo mis à jour en septembre 2014 par le Gene Ontology Consortium (geneontology.org) auquel nous retirons les termes GO obsolètes. Au total 877 sur les 5 625 termes GO de *T. pseudonana* sont retirés. En utilisant les liens d'orthologies existants entre *T. weissflogii* et *T. pseudonana*, nous mettons en évidence des termes GO enrichis dans les 2 groupes DCG et TCG.

7. Analyse RNA-Seq

Les analyses RNA-Seq correspondent à l'analyse de l'expression de l'ensemble des transcrits de *T. weissflogii* et *T. oceanica* en utilisant le transcriptome de *T. weissflogii* ou les informations génomiques disponibles de *T. oceanica*.

Les single reads de 50 pb obtenus par un séquençage Illumina/Solexa (HiSeq 1500) dans chacune des conditions testées sont "remappés" sur le transcriptome et ou génome. Cette étape dite de remapping permet de lier un read avec un transcrit et donc de déterminer le niveau d'expression du gène correspondant. L'analyse différentielle ($p\text{-adj} < 0,05$ et \log_2 fold change > 2 ou < -2) est réalisée avec DESeq sous Galaxy.

8. Validation des résultats RNASeq par RT-qPCR

Une étape de validation de l'expression différentielle de certains gènes d'intérêts est réalisée pour confirmer les résultats RNA-Seq. Pour ce faire, des amorces spécifiques sont dessinées avec le logiciel Primer3 afin d'amplifier des fragments de 200 pb pour 15 gènes d'intérêts et de 4 gènes de références. Pour l'étape de rétro-transcription, nous utilisons le kit SuperScript III (Invitrogen) en partant de 50 ng d'ARN totaux. Les ADNc synthétisés sont amplifiés et quantifiés en temps réel à l'aide du kit Brilliant II SYBR® QPCR (Agilent) et des amorces spécifiques aux différents gènes avec une qPCR Stratagene Mx3005xP (Agilent). Les gènes de références (Histone h2a et GAPDH) sont sélectionnés du fait de leurs stabilités d'expression (Ct faible). Une fois les Ct de l'ensemble des gènes obtenus, le calcul du $\Delta\Delta Ct$ informe sur l'expression relative de chaque gène d'intérêt normalisé au gène de référence.

Chapitre I

Un nouveau modèle d'étude du genre *Thalassiosira* :

T. weissflogii* et apport de son transcriptome *de novo

A. Contexte

Historiquement, la diatomée *T. weissflogii* était l'une des diatomées centriques les plus étudiées. Elle présente une distribution écologique large, une taille moyenne pour une diatomée (~ 10-12 µm) et un temps de génération de l'ordre de la journée en condition de laboratoire qui lui permette d'être un bon modèle biologique. Cependant, avec l'arrivée du génome de *T. pseudonana* en 2004, *T. weissflogii* a perdu de son attrait initial. En effet, la disponibilité des informations génomiques de *T. pseudonana* et de la maîtrise de techniques de transformation et d'inactivation de gène, les recherches se sont davantage tournées vers cette espèce. A ce jour l'assemblage et l'annotation de 7 espèces de diatomées sont accessibles : *T. pseudonana* (2004), *P. tricornutum* (2008), *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102 (2008), *Pseudo-nitzschia multiseriata* CLN-47 (2011), *Thalassiosira oceanica* CCMP 1005 (2013), *Synedra acus* subsp. *radians* (2014) et très récemment *Fistulifera solaris* JPC DA0580 (2015). Cependant, pour ces deux dernières espèces, les assemblages ne sont pas disponibles.

Le séquençage du génome n'est pas la seule technique permettant d'avoir de l'information génétique dite de "référence" et constitue encore une étape longue et onéreuse au regard de la taille de certains génomes, de la redondance de son contenu et de la présence de nombreuses régions répétées. Un moyen plus simple et relativement moins coûteux d'avoir accès à de l'information génétique est de réaliser un transcriptome *de novo*. Ce dernier apporte de l'information sur "l'ensemble" des transcrits exprimés d'une espèce et permet l'étude de leurs expressions (RNA-Seq) sans avoir recours à un génome de référence. L'assemblage des données de séquençage (reads) semble être l'étape la plus limitante de cette technique et, pour pallier cette faiblesse, de nombreux assembleurs dédiés aux transcriptomes *de novo* ont vu le jour comme par exemple Trinity et OASES. Chacun de ces assembleurs possède des workflows et des paramètres différents et sont souvent choisis en fonction de l'expérience de l'utilisateur.

La caractérisation du transcriptome *de novo* permet donc d'enrichir les données génomiques, de mettre en évidence certaines spécificités et de réaliser des études comparatives avec d'autres espèces séquencées. Ainsi le transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* que nous avons réalisé nous a permis d'obtenir des informations génétiques nouvelles et de replacer cette espèce comme modèle d'étude du genre *Thalassiosira*.

Les principaux objectifs de cette partie sont donc :

- (1) De présenter le séquençage et l'assemblage du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* en utilisant différentes méthodes;
- (2) De caractériser ce transcriptome ;
- (3) De comparer ce transcriptome avec celui des autres diatomées séquencées.

Ce chapitre de thèse sera découpé en deux grandes parties : la première abordera les deux premiers objectifs présentés ci-dessus et la deuxième tentera de répondre aux troisièmes objectifs.

B. Protocole experimental

Après le séquençage Solexa/Illumina de type pair-end de deux fois 100 pb et l'assemblage du transcriptome avec VELVET et OASES, nous avons annoté automatiquement les transcrits en utilisant deux logiciels différents : Blast2GO et Trinotate. Cette annotation a été complétée par l'identification des gènes des organelles (chloroplastes et mitochondries) et des ETs. Ensuite, les séquences nucléotidiques codantes (cds) entières ou partielles de l'ensemble des transcrits ont été prédites en utilisant le logiciel Transdecoder. Cette étape a permis de réaliser différentes études dont celle de la composition nucléotidique et de la paralogie mais aussi de comparer les protéines putatives avec celles des autres diatomées séquencées. Cette analyse d'orthologie a permis de définir d'une part les gènes/protéines partagés entre les 5 diatomées séquencées et correspond à ce que nous avons appelé le *Diatom Core Gene* (DCG). Nous avons aussi tenté de définir les gènes spécifiques au genre *Thalassiosira* appelé le *Thalassiosira Core Gene* (TCG). L'analyse de l'enrichissement en GO avec le logiciel AgriGO de ces deux lots de gènes donne des informations sur l'enrichissement fonctionnel présent au sein du DCG et du TCG. Le schéma ci-dessous (Figure I-1) retrace le protocole suivi de l'extraction ARN jusqu'aux différentes analyses comparatives effectuées.

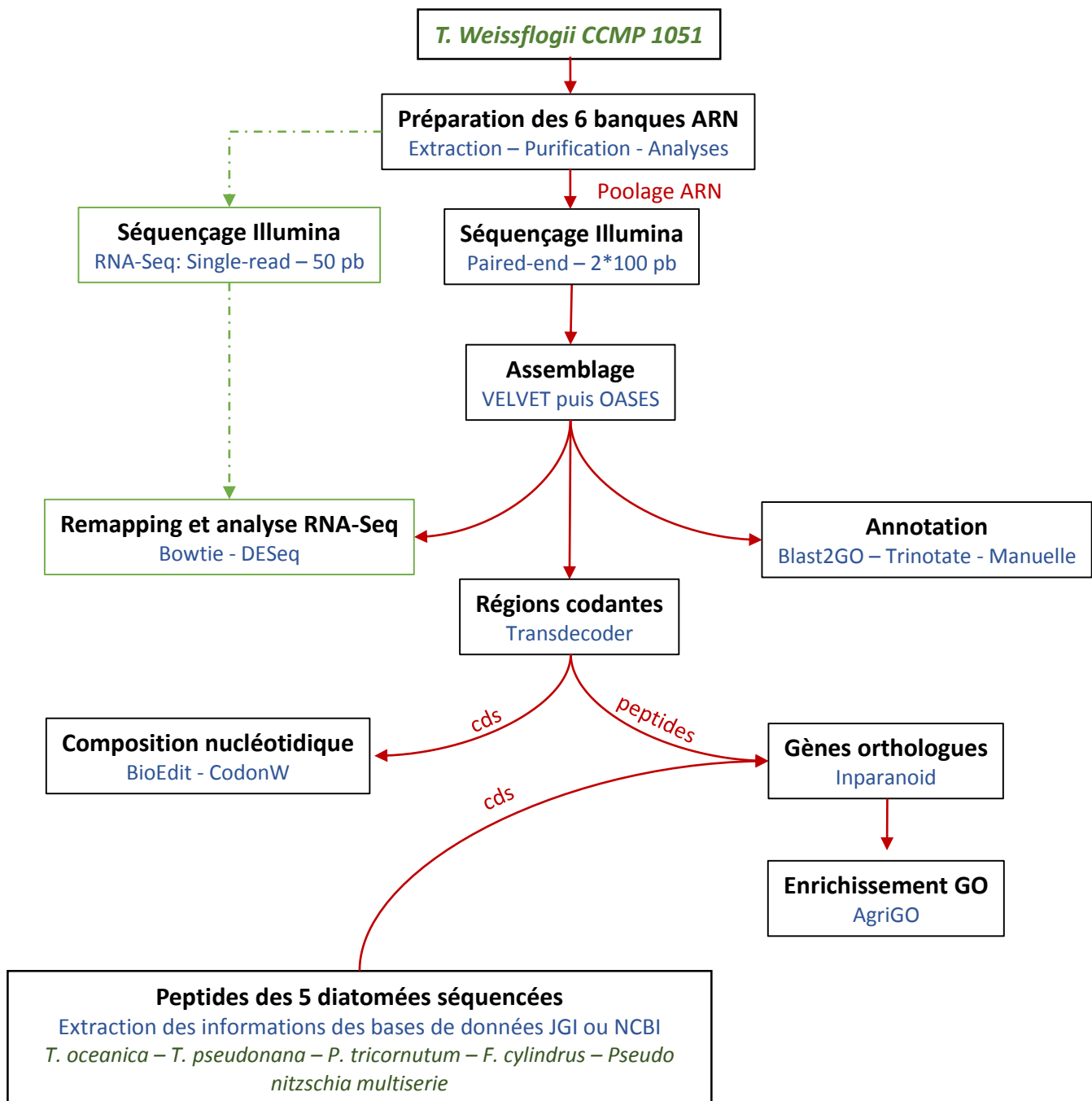


Figure I-1 : Schématisation des différentes étapes de l'analyse du transcriptome de *T. weissflogii*. Dans chaque case est indiqué : en noir le type d'analyse, en bleu les actions réalisées ou les logiciels utilisés et en vert les espèces de diatomées.

L'ensemble des protocoles mentionnés ci-dessus sont détaillés dans les **Méthodes d'analyse**.

C. Séquençage et assemblage du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii*

1. Tests préliminaires et vérifications des librairies

Le séquençage et l'assemblage principal du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* ont été réalisés par la société Genoscreen. Les rapports correspondants aux étapes de vérification de la librairie d'ADNc, de séquençage et d'assemblage sont repris, complétés et analysés dans le paragraphe ci-dessous. Avant de séquencer et d'assembler le transcriptome *de novo*, des tests préliminaires de la librairie sont nécessaires pour éviter des erreurs qui auraient pu compromettre le projet. Des tests de contrôle ont donc été effectués en trois temps sur la qualité, la production et la contamination de la librairie avant l'étape clé de séquençage.

a) Qualité de la librairie

A partir des ARN extraits et purifiés, provenant des 6 différentes conditions de cultures de *T. weissflogii* qui sont détaillées dans le Chapitre II, ces banques d'ARN ont été poolées en même quantité et une étape de transcription inverse a permis d'obtenir une librairie d'ADNc.

La qualité de cette librairie a été contrôlée sur un LabChip GX (Caliper). Le pic correspondant à la librairie présente une forme gaussienne sans aucun épaulement du côté gauche qui aurait traduit une

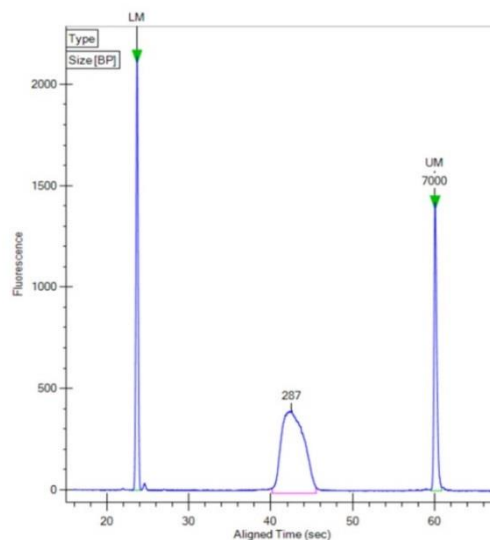


Figure I-2 : Test d'intégrité des ADNC composant notre librairie sur LabChip GX. Ce graphique représente trois pics différents: un pic central correspondant à notre librairie entouré de deux autres pics correspondant aux marqueurs de tailles. Les séquences composant notre librairie possèdent une taille moyenne de 287 pb.

dégradation des ADNc constituant la librairie (Figure I-2). La taille moyenne des fragments de la librairie est de 287 pb.

b) Test de séquençage

Une première étape de séquençage a été réalisée afin de vérifier la qualité de la librairie selon une méthode single-read de 50 pb (MiSeq). Un score de qualité est généralement exprimé par le Qxx est défini pour le séquençage. Il correspond à la probabilité d'erreur (Pe) suivante :

$$Pe=10^{(-Qx/10)}$$

Traditionnellement, le taux d'erreur utilisé est fixé à 0,1 % et donc le score de qualité associé est Q30. Pour un run *single-read* de 50 pb la valeur de Q30 doit être supérieure à 85 %. En d'autres termes 85 % des séquences doivent présenter un score qualité supérieur à Q30. La librairie réalisée présente 97,66 % des séquences avec un score qualité supérieur à Q30. Pour tester une contamination de la librairie, 50 séquences ont été sélectionnées aléatoirement et comparées avec la base de données NCBI. Sur les 50 séquences testées, 94 % ont pu être annotées avec succès et correspondent à des gènes/protéines de plantes, de diatomées, de microalgues, de métazoaires et de bactéries. Cette mixité est cohérente avec la composition "mosaïque" du génome des diatomées. Ces vérifications réalisées, le séquençage de la librairie a été réalisé.

2. Séquençage Solexa/Illumina

Cette librairie a été séquencée sur un run de type *paired-end* de 2*100 pb en utilisant la technologie Solexa/Illumina (HiSeq2500). Sur les 50 599 090 clusters séquencés, 94,52 % ont passé l'ensemble des filtres de qualité définis par la technologie Solexa/Illumina. Au total, 10 119 818 000 pb ont été séquencés. Pour s'assurer de la qualité, nous avons étudié 2 indicateurs qualité couramment utilisés dans la technologie Solexa/Illumina:

- (1) Le taux d'erreur PhiX : *PhiX* est un génome connu de virus bactériophage (NC_001422) de 5 386 nucléotides composé de 31,3 % de T, 24,0 % de A, 23,3 % de G, 21,4 % de C. Le séquençage de *PhiX* permet de calculer le taux d'erreur du séquençage qui doit être inférieur à 1,5 % d'erreur sur 100 pb. Ce séquençage, réalisé en duplicat, a donné un taux d'erreur faible de 0,45 % et 0,65 %.

- (2) Le Q30 calculé pour les deux séquençages de *PhiX* ainsi que celui de notre librairie était de 85,58 % et 81,95 % pour *PhiX* et de 90,02 % pour notre librairie.

3. Assemblage bioinformatique des séquences

L'assemblage des reads a été réalisé en 3 étapes :

Dans un premier temps, les reads ont été alignés entre eux avec le logiciel VELVET v1.2.07 pour former des contigs. Ensuite, ces contigs ont été assemblés en transcrits par le logiciel OASES. La sortie de ces logiciels permet d'avoir également les différentes isoformes pour chaque transcrit. Le tableau suivant présente les résultats des deux premières étapes d'assemblage obtenues pour chaque kmer utilisé (Tableau I-I).

Tableau I-I : Caractéristiques des deux étapes d'assemblage en fonction de la valeur de kmer et des logiciels utilisés.

Kmer utilisé		91	83	75	67	61	59	51
VELVET	Longueur totale des contigs	15 350 853	35 502 408	49 494 414	58 637 370	64 510 352	66 284 406	72 330 633
	Nombre de contigs	28 105	63 665	91 840	121 072	160 020	175 768	250 499
	Longueur moyenne des contigs	546	557	538	484	403	377	288
	Taille du plus grand contig	6 362	6 928	6 696	7 148	8 507	7 210	6 483
OASES	Longueur totale des contigs	16 247 133	40 099 212	60 426 157	77 711 906	89 594 562	93 681 238	105 781 998
	Nombre de contigs	25 961	54 761	69 049	74 739	76 772	77 397	80 020
	Nombre de bases indéterminées	6	19	63	234	818	878	210
	Longueur moyenne des contigs	625	732	875	1 039	1 167	1 210	1 321
	Taille du plus grand contig	6 362	7 165	8 178	8 852	11 026	11 026	11 231

Les différents kmer sont utilisés pour construire des graphiques de Bruijn qui vont permettre l'assemblage. Le graphique ci-dessous aide à mieux comprendre l'utilité des kmer (Figure I-3).

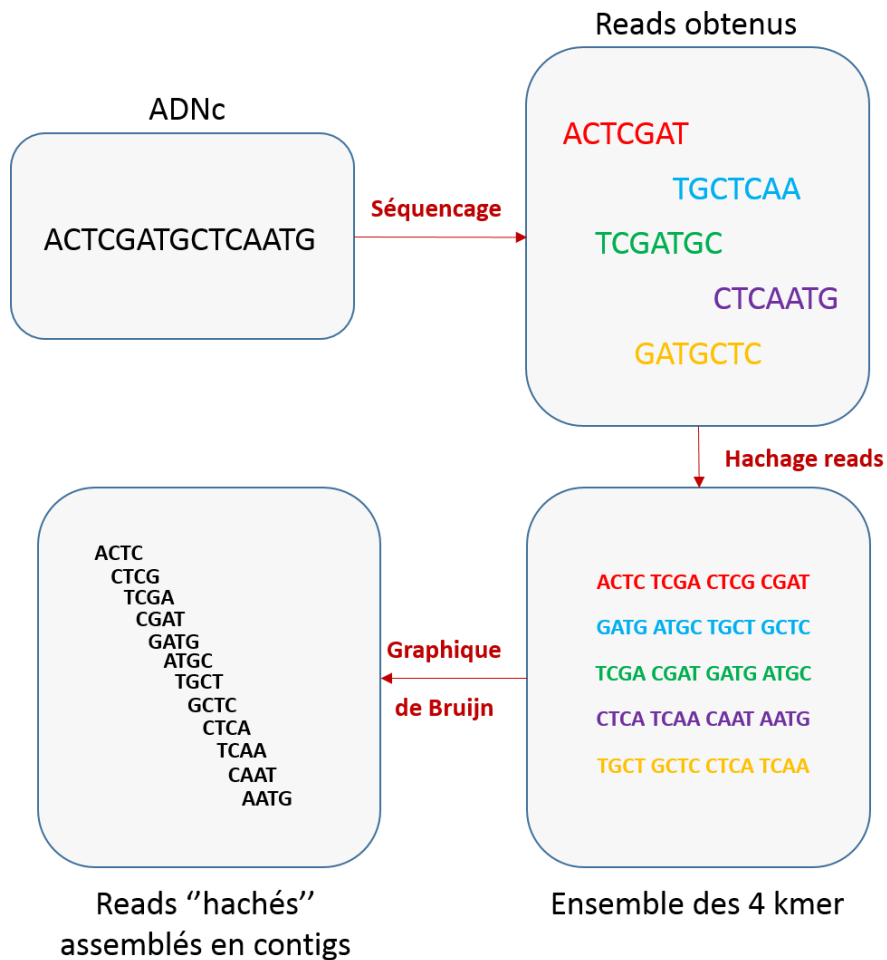


Figure I-3 : Exemple d'utilité d'un hachage des reads en kmer différent. Pour l'exemple nous avons choisi un kmer où k est égal à 4. Les kmer découpent l'ensemble des transcrits en "tronçons" de longueur k qui seront utilisés pour créer des graphiques de Bruijn qui serviront pour l'assemblage.

Pour optimiser l'assemblage, différentes valeurs de "kmer" allant de 91 pour le maximum et 51 pour le minimum ont été définies. Le nombre de reads alignés tend à augmenter plus le kmer diminue jusqu'au kmer 61 puis diminue très légèrement lorsque le kmer augmente. Cependant il reste assez difficile d'estimer le meilleur kmer uniquement avec l'obtention de ces résultats. Pour sélectionner le meilleur assemblage, il a été nécessaire d'effectuer une étape de validation. Pour cela, 1 million de paires de reads ont été alignés sur les transcrits par le logiciels BWA v0.5.9. Celui présentant le meilleur pourcentage d'alignement (90,0 %) a été obtenu avec le kmer 61 et le plus bas (71,8 %) avec le kmer le plus élevé (Tableau I-II).

Tableau I-II : Résultat de l'assemblage avec le logiciel BWA en fonction du kmer utilisé.

Kmer utilisé	91	83	75	67	61	59	51
Nombre de reads à aligner	2 000 000	2 000 000	2 000 000	2 000 000	2 000 000	2 000 000	2 000 000
Nombre de reads alignés	1 436 087	1 645 221	1 733 853	1 770 338	1 799 548	1 788 720	1 771 229
% de reads alignés	71,8	82,3	86,7	88,5	90	89,4	88,6

L'assemblage avec le kmer 61 a donc été considéré comme le meilleur assemblage car c'est sur les transcrits de cet assemblage que le plus de reads s'alignent. Vu que pour cette valeur de kmer 90,0 % des reads s'alignent, on peut estimer que 91 277 478 reads ont été assemblés entre eux pour former 76 772 transcrits avec une longueur moyenne de 1 167 pb. Parmi les 76 772 transcrits assemblés, on compte 58 801 gènes uniques et 17 970 isoformes de ces gènes. Pour faciliter notre analyse, nous avons travaillé uniquement sur les gènes uniques en ne conservant que l'isoforme avec la taille la plus importante.

D. Analyse complète du transcriptome *de novo* : caractérisation et comparaison

1. Annotation

Après l'assemblage des 58 801 gènes, la première étape de caractérisation a été l'annotation. Cette étape, bien que coûteuse en temps, est fondamentale pour l'analyse des données transcriptomiques. Pour obtenir une annotation optimale, nous avons décidé d'utiliser deux logiciels d'annotation que sont Blast2GO et Trinotate ainsi qu'une annotation manuelle de quelques gènes clés. Avec Blast2GO, l'étape de recherche de séquences similaires a permis d'identifier 36 977 gènes (62,8 %) avec au moins une séquence similaire pour une *p*-value minimale fixée à 10^{-5} . Cette recherche de similarité permet d'assigner une identité putative à un gène en fonction de la description existante ou non de la séquence la plus similaire trouvée. Comme attendu et espéré, les séquences les plus similaires appartiennent à des diatomées comme *T. pseudonana* (24,9 %), *T. oceanica* (23,8 %) et *P. tricornutum* (12,4 %). A cette liste, on retrouve également d'autres hétérochontes, des plantes et des bactéries. Ensuite nous avons lancé l'étape dite de "Mapping" qui permet, dans un cadre ontologique,

d'assigner des séquences à des termes génériques. L'ontologie permet de prédire les relations existantes entre les gènes en utilisant des termes communs à toutes les espèces. Cette étape cruciale a permis d'assigner au moins un terme GO à 7 847 gènes soit 13,3 % de l'ensemble des gènes. La distribution des termes GO de niveau 2 au travers des trois grandes catégories (*Biological Process*, *Cellular Component* et *Molecular Function*) est représentée dans la Figure IV-4.

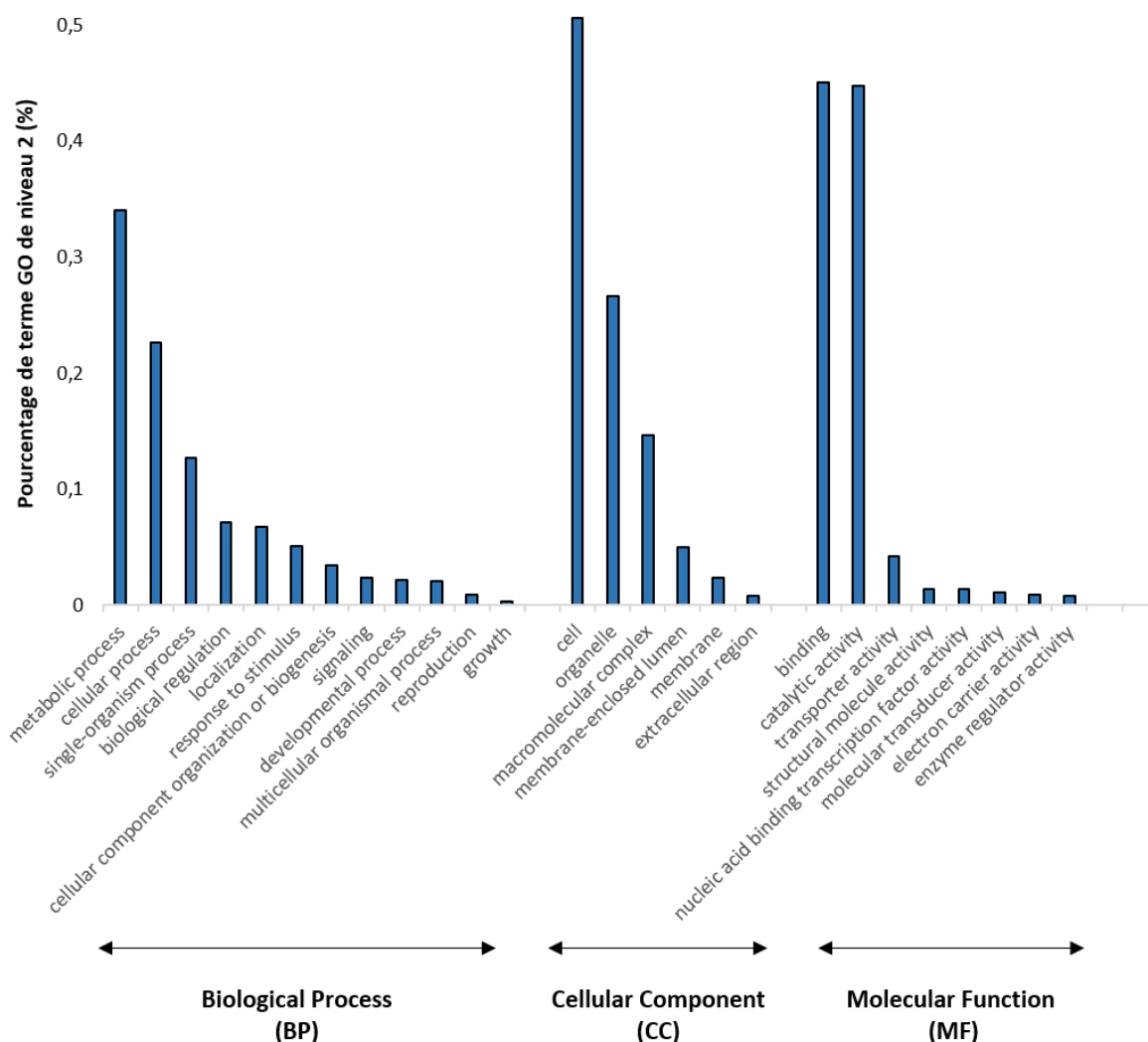


Figure IV-4 : Distribution des termes GO de niveau 2 du transcriptome de *T. weissflogii*. Ces termes GO sont découpés en trois grandes catégories à savoir les processus biologique (*Biological process* ; BP), les fonctions moléculaires (*Molecular Function* ; MF) et les composants cellulaires (*Cellular Component* ; CC).

Une autre étape d'assignation a permis d'identifier 4 586 gènes codant pour une enzyme dont 698 sont uniques et se répartissent en 124 voies métaboliques plus communément appelées KEGG pathways. Pour compléter l'annotation les 21 824 gènes n'ayant pas trouvé de séquences similaires avec Blast2GO ont été étudiés avec le logiciel Transdecoder. Ce logiciel a permis d'annoter 46 gènes et d'en identifier 58 autres avec des domaines PFAM.

Nous avons manuellement identifié 137 gènes chloroplastiques et 11 gènes mitochondriaux dont les descriptifs sont présentés dans le Chapitre II pages 156 et 157. Le fait que la totalité des gènes chloroplastiques ou mitochondriaux n'a pas été identifiée pourrait provenir de l'étape de purification des ARN polyadénylés lors de la réalisation des différentes banques.

Pour finaliser l'annotation, le docteur Florian Maumus a identifié 158 éléments transposables (ETs) à l'aide du logiciel PASTEC complété par une librairie de transposons de diatomées. Ces ETs se répartissent en deux grandes classes, les rétrotransposons et les transposons, et en 8 familles. Ces ETs représentent 2,7 % de l'ensemble du transcriptome de *T. weissflogii* dont les rétrotransposons représentent la classe la plus importante avec 133 éléments. Parmi les rétrotransposons, la famille *Copia* est très majoritairement représentée avec 121 éléments (Figure I-5).

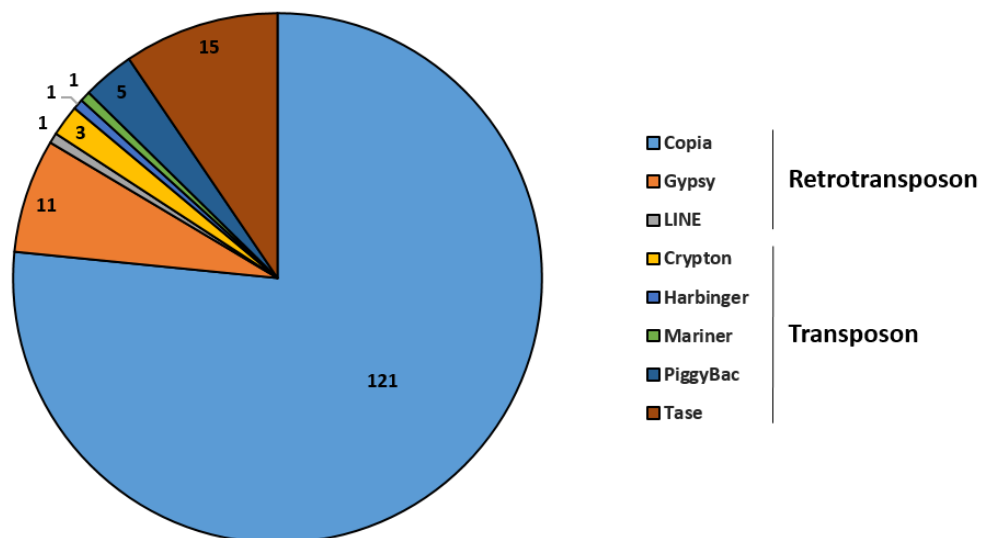


Figure I-5 : Figure présentant la composition en éléments transposables (ETs) du transcriptome de *T. weissflogii*. Sur les 158 ETs identifiés, 133 appartiennent respectivement à la classe des rétrotransposons (ETs à ARN) et 25 à celle des transposons (ETs à ADN). Les rétrotransposons comportent 3 familles différentes (Copia, Gypsy et LINE) et les transposons en comportent 5 (Crypton, Harbinger, Mariner, PiggyBac et Tase). Au sein des rétrotransposons, Copia et Gypsy possèdent des longs éléments répétés à leurs extrémités (LTR) alors que LINE n'en possède pas.

2. Composition nucléotidique

En partant des 58 801 gènes, les 65 354 séquences peptidiques codantes prédites par Transdecoder présentent un pourcentage en GC moyen de 47,54 % et une proportion des 4 bases

azotées relativement homogène (A : 28,28 %, C : 23,13 %, G : 24,42 %, T : 24,18 %). Le pourcentage en GC à la troisième position du codon (GC₃) est considéré comme déterminant dans la composition en base azotée du génome qui peut varier suivant les espèces. Nos résultats montrent que le pourcentage de GC₃ est de 49,03 %.

3. Paralogie et orthologie : définition des groupes de gènes

Deux séquences génétiques de deux espèces différentes sont orthologues si elles descendent d'une séquence unique présente dans leur dernier ancêtre commun. Pour que deux gènes soient considérés comme orthologues, il faut donc d'abord établir qu'ils sont homologues, c'est-à-dire qu'ils descendent d'un même gène ancestral. Ensuite, il faut montrer que c'est après l'évènement de spéciation qu'il y a eu une évolution séparée des deux gènes. Si, au contraire, l'origine commune des deux gènes est due à un phénomène de duplication, les gènes sont dits paralogues. L'analyse de paralogie du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* a révélé que 9 737 gènes étaient paralogues donc issus d'un processus de duplication post-spéciation.

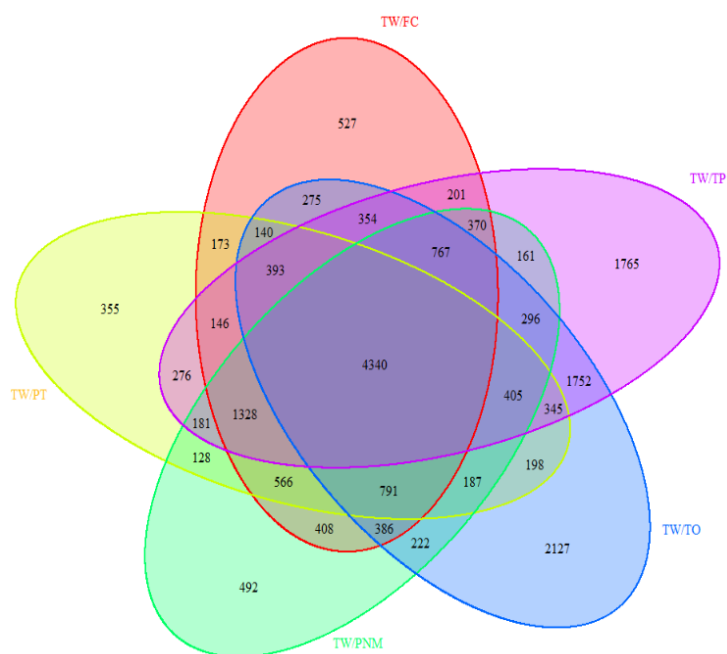


Figure I-6 : Diagramme de Venn représentant la distribution des groupes d'orthologues entre *T. speudonana* (TP), *T. oceanica* (TO), *P. tricornutum* (PT), *F. cylindrus* (FC) et *PN. Multiseriens* (PNM) en comparaison à *T. weissflogii* (TW). Les 4 340 groupes d'orthologues partagés par toutes les diatomées forment ce que nous avons appelé le *Diatom Core Gene* (DCG).

La paralogie implique que les gènes ont dérivé, ce qui a induit potentiellement l'apparition de fonctions différentes, sans rester de simples copies du même gène et sans perte de fonction.

Pour déterminer les relations orthologiques partagées avec les 5 diatomées séquencées et disponibles, nous avons utilisé le logiciel Inparanoid 7 qui permet d'obtenir des groupes de gènes orthologues partagés (Figure I-6). Parmi les nombreuses combinaisons d'orthologies, nous avons pu mettre en évidence 4 340 groupes d'orthologues partagés par l'ensemble des diatomées que nous avons appelé le *Diatom Core Gene* (DCG). En se basant sur les termes GO disponibles chez *T. pseudonana* et du logiciel AgriGO, nous avons montré que respectivement 31 et 7 termes GO étaient significativement enrichie dans les catégories *Biological process* (BP) et *Cellular Component* (CC). Parmi ces termes GO, on retrouve le transport (GO:0006810), les processus de traductions des ARN messagers (GO:0006412) et la biosynthèse des petites molécules essentielle au fonctionnement cellulaire (GO:0044283). La liste détaillée des termes GO enrichis est disponible dans le Chapitre II page 159. Nous avons également porté notre analyse sur les gènes orthologues partagés spécifiquement entre les diatomées du genre *Thalassiosira* que nous avons appelé le *Thalassiosira Core Gene* (TCG). Ce TCG présente 1 752 groupes d'orthologues spécifiquement partagés par les diatomées du genre *Thalassiosira*. De la même façon que pour le DCG, nous avons analysé l'enrichissement en terme GO et montré un enrichissement spécifique de 7 termes GO relatifs aux métabolismes de la chitine (GO:0006030 : chitin metabolic process ; GO:0004568 : chitinase activity ; GO:0005576 : extracellular region), des aminoglycanes et des polysaccharides.

E. Discussion et conclusion

Nous avons au cours de cette thèse séquencé, assemblé et annoté le transcriptome de *T. weissflogii*. Au total, 101 398 180 reads ont été séquencés et 90 % d'entre eux ont été assemblés en 76 772 transcrits ce qui représente 58 801 gènes uniques. Les tests de qualité de la librairie initiale et du séquençage ont donné des résultats plus que satisfaisants supportant un transcriptome de qualité. Nous espérons qu'il est représentatif de la grande majorité des gènes de cette espèce. Toutes ces informations permettent de compléter les connaissances sur les diatomées et plus particulièrement celles du genre *Thalassiosira*. Avec un contenu en GC de 47,6 %, la composition nucléotidique de *T. weissflogii* est proche des autres diatomées séquencées (*T. pseudonana* : 47,0 % ; *P. tricornutum* : 48,5 % ; *T. oceanica* : 53,3 %) (Armbrust et al 2004 , Lommer et al 2012, Scala et al 2002). En plus des 194 gènes de *T. weissflogii* déjà disponible sur NCBI relatif aux gènes chloroplastiques (Sabir et al 2014) et quelques gènes clés des mécanismes de concentration du carbone (CCM ; anhydrases carboniques, enzymes métabolismes C₄,...) (Lane et al 2005), ce transcriptome a permis d'apporter plusieurs dizaines de milliers de nouveaux gènes. Les différentes annotations de Blast2GO et Trinotate ont permis d'identifier 7 848 gènes assignés avec des termes GO et 4 586 gènes codant pour au moins une enzyme qui se répartissent en 124 voies métaboliques différentes dont celle du métabolisme C₄. Initialement découvert chez *T. weissflogii* par l'utilisation d'isotope du carbone (Reinfelder et al 2000), ce métabolisme primordial conférerait un avantage sélectif dans l'assimilation du carbone comparé aux autres algues unicellulaires (Obata et al 2013, Reinfelder et al 2004). Toutes les enzymes clés de ce métabolisme (phosphoenolpyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase,...) ont aussi été identifiées.

Parmi l'ensemble des gènes séquencés, 2,6 % ont été identifiés comme correspondant à des éléments transposables (ETs). Cette proportion est en accord avec celle observée dans le génome nucléaire de *T. pseudonana* (~2 %) (Armbrust et al 2004) mais reste faible comparée à certaines plantes comme le maïs (~80 %) (SanMiguel et al 1998). Les rétrotransposons possédant de long domaines répétés à chaque extrémité (RT-LTR), incluant les familles *Copia* (Pseudoviridae) et *Gypsy* (Metaviridae), sont les plus représentés avec 84,5 % de l'ensemble des ETs retrouvés chez *T. weissflogii*. Cette proportion est également retrouvée chez *T. pseudonana* et *P. tricornutum* avec respectivement 58 et 90 % de RT-LTR. Sachant que les diatomées se divisent principalement par mitose, l'activité des RT-LTR pourrait avoir un effet important sur l'évolution des génomes (Maumus et al 2009). Ainsi, il a été proposé que leur activité mutagénique, leur accumulation et leur recombinaison en fonction des stress

environnementaux pourraient contribuer majoritairement à la diversification des génomes de diatomées (Vicient et al 1999 , Wessler 1996).

L'évolution de leurs génomes pourraient aussi s'expliquer par des événements de duplication même s'il semblerait que ces phénomènes n'aient pas un rôle primordial dans l'évolution des génomes de diatomées (Vardi et al 2008). Avec un nombre de gènes presque 5 fois plus important que *T. pseudonana* et *P. tricornutum*, *T. weissflogii* serait à ce jour l'une des diatomées séquencées contenant le plus de gènes. Les 9 737 gènes paralogues identifiés seraient issus d'un processus de duplication post-spéciation. Ces 16,6 % de duplication génomique, bien qu'importants à l'échelle des diatomées, restent relativement faibles comparés à d'autres organismes comme les plantes. En effet l'évolution moléculaire des plantes terrestres est ponctuée de phénomènes de duplications génomiques qui participent grandement à leur adaptation et leur diversification (De Bodt et al 2005). A titre d'exemple le génome du riz (*Oryza sativa*) et du maïs (*Zea mays*) possèdent respectivement 49 % et 32 % de gènes paralogues (Blanc and Wolfe 2004).

Pour comprendre spécifiquement l'évolution génétique existant entre les diatomées et les différents ancêtres communs, une analyse d'orthologie avec l'ensemble des diatomées disponibles (*T. pseudonana*, *P. tricornutum*, *PN. multiserie*, *F. cylindrus* et *T. oceanica*) a permis d'identifier les gènes orthologues (Figure I-6). De manière assez intéressante, 4 340 groupes d'orthologues sont partagés par l'ensemble de ces diatomées et constituent le *Diatom Core Gene* (DCG). Ce DCG, malgré un jeu de données initial et un outil d'analyse différent, est cohérent avec les autres DCG précédemment décrits et présentés dans le Tableau I-III (Bender et al 2014 , Bowler et al 2008 , Cheng et al 2014).

Tableau I-III : Etudes ayant analysées les gènes orthologues chez les diatomées.

Nombre de groupes d'orthologues	Espèces étudiées	Types d'analyses	Références
4 267	PT / TP	Reciprocal Best Hit	Bowler et al., 2008
4 425	TP / PT / Nsp	OrthoML	Cheng et al., 2013
5 583	TP / FC / PM	OrthoML	Bender et al., 2014

Nous avons à notre connaissance, réalisé les premières études du DCG permettant de montrer un enrichissement en terme GO de gènes impliqués dans les métabolismes de base essentiels. De la même façon que pour le DCG, nous avons analysé les 1 752 groupes d'orthologues spécifiques aux *Thalassiosira* appelé le *Thalassiosira Core Gene* (TCG). Ce TCG a révélé un enrichissement intéressant en terme GO relatifs au métabolisme de la chitine. De manière assez originale, seulement une centaine de diatomées

appartenant aux genres *Thalassiosira* et *Cyclotella* sont connus pour produire des longues fibres chitineuses sécrétées à partir des fultoportulae (Herth 1980 , Kaczmarek et al 2006). Même si le rôle de ces fibres est encore teinté d'incertitude, ces structures chitineuses pourraient être un facteur important dans le positionnement dans la colonne d'eau, dans la formation de chaînes ou encore dans la protection contre la prédation (Medlin et al 1996b). Leurs synthèses et dégradations seraient modulées en fonction des facteurs biotiques et abiotiques. Assez étrangement, les gènes de ce métabolisme ont été retrouvés chez plusieurs diatomées du genre *Thalassiosira* mais aussi chez des pennées du genre *Chaetoceros*, *Phaedactylum* et *Skeletonema* qui ne sont pas spécialement connus pour synthétiser des fibres de chitines (Durkin et al 2009). Pour comprendre pourquoi ce métabolisme semble être propre au *Thalassiosira* malgré le fait que *P. tricornutum* possède ces mêmes lots de gènes, il faut regarder leur évolution moléculaire. Si nous prenons l'exemple de la chitine synthase, gène clé de ce métabolisme, une divergence forte entre *T. pseudonana* et *P. tricornutum* a été observée. Cette divergence s'explique par un nombre et des positions des domaines transmembranaires différents et de la perte d'un domaine cytochrome b5, permettant l'accrochage à la membrane lipidique (George et al 1989), chez *P. tricornutum* comparé à *T. pseudonana*. La perte de ce domaine serait responsable potentiellement de la divergence de ces gènes. Cette même perte a également été observée chez les chitines synthases de champignons et pourrait constituer un exemple intéressant de convergence évolutive avec les diatomées (Durkin et al 2009).

D'un point de vue écologique et évolutif, l'apport d'information génétique de *T. weissflogii* nous a semblé être un choix stratégique pour étudier l'acclimatation à des environnements perturbés comme les côtes. De plus ces informations correspondent à un accroissement de nos connaissances sur le genre *Thalassiosira* (Armbrust et al 2004 , Lommer et al 2012). *T. pseudonana*, bien que vivant dans les mêmes écosystèmes que *T. weissflogii*, descendrait d'un ancêtre commun au genre *Cyclotella* mais d'eau douce (Alverson et al 2011). Cette origine d'eau douce devrait sûrement être prise en compte dans l'étude de son acclimatation à différents stress comme la salinité. Par opposition, *T. oceanica*, l'autre *Thalassiosira* séquencée, vit strictement dans les océans ouverts où les paramètres physico-chimiques sont relativement stables (Alverson et al 2011, Lommer et al 2012). Ainsi la combinaison de ces trois *Thalassiosira* permettrait d'affiner nos connaissances sur ce genre et éventuellement d'inférer des hypothèses sur la coévolution entre les réseaux de gènes et les écosystèmes de vie.

Séquencage et assemblage du transcriptome *de novo* de *T. weissflogii*

Le séquençage et l'assemblage ont permis de proposer une première version du transcriptome de *T. weissflogii*. Parmi les 58 801 gènes uniques obtenus, l'étape d'annotation a permis d'obtenir une description pour 36 977 gènes dont 7 847 présentent au moins un terme GO. Les gènes des organelles ainsi que les éléments transposables ont également été caractérisés. Après réalisation du protéome correspondant, nous avons montré que 16,7 % des gènes étaient issus d'un phénomène de duplication du génome. Pour comprendre l'histoire évolutive des diatomées, une analyse d'orthologie a permis de définir les gènes communs entre toutes les diatomées (*DCG*) et ceux spécifiques aux *Thalassiosira* (*TCG*) avec respectivement 4 340 et 1 752 groupes d'orthologues. Le *DCG* est spécifiquement enrichi en termes GO impliqués dans le métabolisme cellulaire de base alors que le *TCG* est enrichi en termes GO relatif au métabolisme de la chitine. Avec l'apport des informations génétiques de *T. weissflogii*, de *T. pseudonana* et *T. oceanica*, le genre *Thalassiosira* constitue le genre de diatomées avec le plus d'informations génétiques disponibles à ce jour.

Chapitre II

Capacité d'acclimatation de la diatomée *T. weissflogii*

à un gradient hyposalin

A. Contexte

La salinité, la température, les nutriments, les mouvements de l'eau ou la lumière sont des facteurs abiotiques qui contrôlent la croissance et la distribution des espèces phytoplanctoniques dans les écosystèmes marins (Brand 1984). La salinité est un paramètre physico-chimique plutôt local que global qui peut-être très variable dans les écosystèmes côtiers et estuariens (Kirst 1990). Des variations importantes des forces ioniques externes entraînent généralement des réponses physiologiques contrastées en partie pour maintenir l'homéostasie cellulaire et donc l'optimum de croissance des organismes. Il a par ailleurs été montré que de nombreuses protéines impliquées dans le transport de différents ions ou molécules ont une activité couplée avec le transport des ions sodium. Il a été proposé chez les diatomées qu'une modification de ces transporteurs pourrait engendrer une modification de l'homéostasie générale (Taylor et al 2012). Lors notamment des blooms phytoplanctoniques, on peut observer une augmentation de la densité de certaines espèces principalement marines dans les estuaires. Leur résilience et croissance dans ces nouveaux environnements proviendrait de leurs capacités d'acclimatation rapides et efficaces (Kirst 1990). Les organismes, vivant dans ces environnements où la salinité est variable, sont appelés euryhalins par opposition aux organismes sténohalins ne pouvant pas s'acclimater à un gradient salin important.

Certaines espèces ont été très étudiées pour comprendre les compromis physiologiques mis en place et les modifications génétiques associés à des variations salines comme par exemple la microalgue verte *Dunaliella salina* ou encore des macroalgues brunes vivant sur l'estran comme *Ectocarpus siliculosus* (Dittami et al 2012). Cependant, il n'existe aucune étude traitant spécifiquement de l'acclimatation des diatomées à un tel stress. Comme précédemment mentionné, l'espèce *T. weissflogii* est euryhaline. Elle est donc capable de vivre, au moins transitoirement, dans les eaux saumâtres estuarienne (Radchenko and Il'yash 2006). Même s'il existe quelques études sur les réponses transitoires de *T. weissflogii* à un stress hyposalin (Garcia et al 2012, Radchenko and Il'yash 2006, Vrieling et al 1999), aucune étude n'existait au début de cette thèse sur la mise en place des processus d'ajustement à long-terme. Pour essayer de comprendre les stratégies d'acclimatation mis en place pour l'acclimatation de *T. weissflogii*, nous avons réalisé une analyse multiparamétrique mêlant des études physiologiques, morphologiques et transcriptomiques pour essayer de dégager les processus d'ajustement et les compromis physiologiques mise en place par *T. weissflogii*. Cette étude avait également pour but de tester si cette diatomée peut s'acclimater efficacement à plus long-terme.

Les principaux objectifs de ce chapitre est:

- (1) D'étudier la réponse de *T. weissflogii* à un gradient hyposalin à court et long-terme au niveau physiologique et morphologique ;
- (2) D'analyser le transcriptome de *T. weissflogii* dans les différentes conditions de stress ;
- (3) De tenter de mettre en relation les réponses physiologiques et morphologiques avec l'expression des gènes.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article intitulé "*Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in acclimation to salinity gradients in diatoms*" (Bussard et al Submitted) et soumis en 2015 dans le journal "*The ISME Journal*" et permet de répondre aux trois objectifs posés. Les différentes **Supplementary Informations** sont présentées après la discussion générale de cet article.

B. Protocole expérimental

Pour étudier les acclimations morphologiques, physiologiques et transcriptomiques en réponse à un gradient hyposalin, nous avons choisi la diatomée côtière *T. weissflogii*. Cette diatomée euryhaline a été cultivée dans des milieux artificiels (ASW) où le pH a été ajusté à 8,1 et seule la concentration en NaCl a été modifiée. Au final, nous disposons de trois milieux avec une salinité de 21, 28 et 35 psu. Pour étudier l'acclimation, nous avons cultivé *T. weissflogii* dans ces 3 milieux pendant 5 jours pour étudier la réponse court-terme (21-S, 28-S et 35-S), et pendant plus de 2 ans pour analyser la réponse long-terme (21-L, 28-L et 35-L).

A partir de ces 6 conditions, nous avons analysé la réponse physiologique (croissance, métabolisme du silicium et du carbone, paramètres photosynthétiques, incorporation de carbone et de la composition pigmentaire), la morphologie et la réponse transcriptomique. Tous les protocoles utilisés sont décrits de manière exhaustive dans les **Méthode d'analyses** et également repris spécifiquement dans le Matériel et Méthodes du manuscrit de l'article.

Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in acclimation to salinity gradients in diatoms

Adrien Bussard, Erwan Corre, Cédric Hubas, Evelyne Duvernois-Berthet, Gildas Le Corguille, Laurent Jourdren, Fanny Couplier, Pascal Claquin and Pascal Jean Lopez

Article soumis pour publication dans The ISME Journal en juin 2015

Abstract

Salinity regimes in estuaries and coastal areas vary with river discharge, seawater evaporation, morphology of the coastal waterways, and dynamics of marine water mixing. Therefore, microalgae have to respond to salinity variations at various time scales ranging from daily to annual cycling. Microalgae may also be able to adapt to physical alterations that induce the loss of connectivity and enclosure of water bodies. Here, we integrated physiological-based assays and morphological plasticity with a functional genomics approach to examine the regulatory changes that occur during the acclimation to salinity in the estuary diatom *Thalassiosira weissflogii*. We found that cells exposed to different salinity regimes (*i.e.* 21, 28 and 35 psu) for a short- (*ca.* 5 generations) or long-term (*ca.* 700 generations) period presented minute adjustments in their carbon fractions, silicon pools, pigment concentrations or photosynthetic parameters. In contrast, whole transcriptome analyses revealed that most of the nuclear and plastidic genes were down-regulated during the long-term response, and only a few genes were common between the short- and long-term responses. We propose that a decrease in transcription with no impact on cellular fitness may represent a general feature of diatoms living in fluctuating environments.

Introduction

Significant variations in annual cycling (*e.g.* variability in upwelling or subsurface stratification) of average sea surface salinity have been measured throughout the world's oceans (Reul et al 2014). Several ecosystems, including coastal saltmarshes, lagoons, intertidal flats, wetlands, mangroves, bays and estuaries, can also present large and rapid variations in their salinity that affect phytoplankton assemblages (Bazin et al 2014, Bolhuis et al 2013). Therefore, phytoplankton and other species respond to salinity stresses on various time scales: from typically hours in intertidal zones to residence times in estuaries and variable times ranging from days to a few weeks to months in coastal areas (Cloern et al 1985). Seasonal variation has also been observed in coastal and estuarine areas (Pennock and Sharp 1986, Schumann et al 2006), and decadal time scale changes in salinity have been observed in the North Pacific Ocean (Ren and Riser 2010). Generally, studies have supported the hypothesis that there is variation in surface water salinity within regions or the entire world's oceans over specific periods of time, such as the glacial–interglacial periods (Espinosa et al 2012). Furthermore, the semi-enclosure of water bodies and loss of marine–estuarine–freshwater connectivity that occur as a consequence of physical alterations due to human activity or sea-level variations can also modify flow velocity and salinity levels and dynamics.

Diatoms are divided into two morphological groups (*i.e.* centric vs. pennate) that are paraphyletic; these groups diverged during the Triassic and Jurassic periods (Medlin and Sato 2009). Diatoms are now encountered in a large diversity of aquatic habitats including both marine and freshwaters, implying that they have developed survival strategies to protect themselves from contrasting and adverse environments, especially with regards to salinity levels. Spatial and temporal changes in diatom assemblages and modifications in salinity levels have been demonstrated in various aquatic ecosystems (Clavero et al 2000, Du and Peterson 2014, Nodine and Gaiser 2014, Nubel et al 2000, Rehakova et al 2009). Salinity was also shown to affect the spatial distribution of benthic diatoms by modifying their migration behavior or favoring a drifting-like strategy (Araujo et al 2013, Sauer et al 2002, Underwood et al 1998). Diatom composition shifts and their ecological and physiological performances are mainly driven by: (*i*) the extent to which diatom species are able to respond to salinity changes, (*ii*) the magnitude and the frequency of the salinity gradient experienced, (*iii*) the balance between growth rates and salinity limits of a given species, and (*iv*) their evolutionary adaptation capability.

Field and laboratory experiments have shown that salinity alone or in combination with other physicochemical factors can impact diatom growth (Baek et al 2011, Sogaard et al 2011), cell size (De Miranda et al 2005), frustule morphology (Leterme et al 2013, Ligowski et al 2012, Martin-Cereceda and Cox 2011, Trobajo et al 2011) or thecae physical properties (Vrieling et al 2007). For example, several studies have correlated salinity levels with changes in photosynthesis and primary production (Osborn and Hook 2013, Radchenko and Il'yash 2006) or the induction of oxidative stress responses (Rijstenbil 2005, Zhang et al 2006). An increase or decrease in salinity can also influence the production of dimethylsulfoniopropionate (DMSP), a biogenic precursor to a climatically active sulfur compound that is involved in cloud formation (Kettles et al 2014, Lyon et al 2011). The effect of salinity on the production of the potent algal neurotoxin domoic acid was demonstrated in laboratory experiments (Doucette et al 2008) and was correlated with environmental gradients (Downes-Tettmar et al 2013, Thessen and Stoecker 2008). Depending on the diatom species studied and the laboratory conditions, the cell lipid content and composition were found to be modified upon changes in salinity levels, with an increase in lipid production with low (Garcia et al 2012, Khatoon et al 2010, Wraige et al 1998) or elevated salinity (Cheng et al 2014, Rowland et al 2001). Correspondingly, the expression of genes involved in lipid biosynthesis was shown to be significantly regulated under salinity stress (Cheng et al 2014, Maheswari et al 2010, Petrou and Ralph 2011).

To explore the ability of diatoms to respond and/or acclimate to a salinity gradient, we investigated several physiological traits (*i.e.* growth rates, photosynthetic parameters, pigment concentrations, carbohydrate fractions, carbon incorporation, and silicon pools) and phenotypic plasticity (*i.e.* morphometric changes of the valve) after short- (5 days) or long-term (*ca.* 2 years) exposure to 3 salinity concentrations (21, 28 and 35 psu). We selected the centric species *Thalassiosira weissflogii* as a diatom model for this study because it belongs to the *Thalassiosira* genus. The members of this genus present large degrees of species diversification and have colonized marine, brackish and freshwater ecosystems (Alverson 2014). More precisely, we worked with an isolate (CCMP 1051) that was proposed to be specialized to highly variable environments (Sorhannus et al 2010), for which we sequenced and assembled a *de novo* transcriptome. We also performed whole-genome differential gene expression (RNA-seq) analyses to better understand the diatom's genomic adjustments to salinity levels and its acclimation capability from polyhaline to euhaline salinity regimes.

Material and methods

Details of the methods used for the determination of the carbohydrate production, carbon incorporation, photosynthesis, pigment concentrations, silicon (Si) metabolism, valve morphology, transcriptome annotation and RT-qPCRs are presented in the Supplementary Methods.

Experimental design and growth conditions

The diatom *Thalassiosira weissflogii* (Grun.) Fryxell and Hasle was obtained from the Provasoli-Guillard National Center of Marine Algae and Microbiota (CCMP 1051). This axenic diatom was cultured in artificial seawater medium (ASW) (see reference (Vartanian et al 2009) for details) with modified NaCl concentrations to obtain the three different salinities: 21, 28 and 35 psu (control), corresponding to osmolarities of 630, 840 and 1050 mOsm.L⁻¹, respectively. The cultures were maintained at 19°C in polycarbonate sterile flasks (Corning) under a light:dark (12 h:12 h) cycle with a light intensity of *ca.* 100 μ Einstein m⁻² s⁻¹. For the short-term experiments, *T. weissflogii* cells were grown under the three different salinity conditions for 5 days (*ca.* 5 generations). For long-term acclimation, the cells were cultured under the different salinity conditions for approximately 2 years (*ca.* 700 generations), with weekly renewal of the medium. Cellular growth rates were measured using flow cytometry (FACSVerse; Becton Dickinson) and the FACSuite software.

Total RNA extraction, transcriptome sequencing and *de novo* assembly

Total RNA was extracted using the TRIzol (Life Technology)-chloroform-isopropanol (5:1:2.5 v/v/v) protocol followed by DNase treatment (Life Technology) and purified using the RNeasy kit (Qiagen) from 50 mL of each culture. *De novo* sequencing was performed starting from a pool that contained an equal quantity of RNA extracted from the six different growth conditions and duplicate biological replicates. After mRNA purification and fragmentation, the cDNA library was controlled on LabChip GX (Caliper) prior to sequencing. The sequencing step was performed using Illumina/Solexa technology (HiSeq2500) with a paired-end strategy (2 x 100 bp). For assembly, raw reads (over 101 million of reads) were first assembled into contigs using VELVET (v1.2.0.7), and then into transcripts using OASES (v0.2.08).

Each transcript was subjected to Blast2GO (v2.7.0) analysis to perform functional annotation. Similarity searches by BlastX were performed with an *E*-value threshold of 1e⁻⁵ on the NCBI nr database.

Ontology mapping of relevant blast hits was performed using the Gene Ontology database (GO). The domain/motif annotation step and enzyme code annotation was performed by running InterProScan (v5). Additionally, a second annotation was conducted using the Trinotate pipeline. Coding sequence prediction was performed using the software Transdecoder that identifies the longest open reading frame (ORF) for each transcript. Transcripts and Transdecoder predicted ORFs were subjected to Blastx and Blastp alignments against the Uniprot-Swissprot database, respectively. Then, the protein domains were identified using HMMER (v.3.1b1) software against the Pfam-A database. Signal peptides and transmembrane regions were detected using the signalP (v4.1) and tmhmm (v2.0c) software, respectively. Finally, annotation with eggNOG and Gene Ontology terms was added by integration with the Trinotate database. In addition to the signalP analysis, subcellular localization of the predicted proteins was performed using the HECTAR software that takes into account the complex chloroplast targeting of the Heterokonts proteins. This software integrates several decision modules coming from ten different subcellular localization methods into a Support Vector Machine approach to produce predictions in five categories of subcellular targeting. Finally, results of the annotation from Blast2GO and the Trinotate pipeline were merged and compared.

Differential expression RNA-Seq analyses

Library preparation and Illumina sequencing were performed at the Ecole Normale Supérieure Genomic Platform (Paris, France). Messenger (polyA⁺) RNAs were purified from 800 ng of total RNA using oligo(dT). Libraries were prepared using the strand non-specific RNA-Seq library preparation TruSeq RNA Sample Prep Kits v2 (Illumina). Libraries were multiplexed on one single flowcell lane and subjected to 50 bp single read sequencing on a HiSeq 1500 device. A mean of 21 ± 2.2 million passing Illumina quality filter reads was obtained for each of the 6 samples. The entire RNA-Seq data analysis was performed using the Eoulsan software (Jourden et al 2012) with the following parameters. Prior to mapping, poly N read tails were trimmed, reads ≤ 11 bases were removed, and reads with quality means ≤ 12 were discarded. Then, the reads were aligned against the *T. weissflogii* reference transcriptome using the Bowtie mapper. *T. weissflogii* transcriptome annotation was used to compute gene expression. Data normalization and differential analysis was performed using the DESeq package. The RNA-Seq gene expression data and raw Fastq files are available at the GEO repository under accession number: GSM1702868, GSM1702869, GSM1702870, GSM1702871, GSM1702872 and GSM1702873.

Statistical analyses

Salt stress tolerance was tested by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD post-hoc test after checking the normality (Shapiro test) of each sample and the homoscedasticity (Bartlett test). When normality or the homogeneity of the variance assumption were not met, we used the Kruskal Wallis test followed by the Van der Waerden test, which converts the ranks of a non-parametric Kruskal-Wallis rank sum test into quantiles of the standard normal distribution. The results of morphological, pigment and multi-color Pulse-amplitude modulation (PAM) analyses were submitted independently to a principal component analysis (PCA) to obtain an overview of all of the results using all of the parameters studied. Each PCA was plotted using the two first dimensions (Axis 1 and Axis 2) to explain the greatest variability of each data set. Multivariate and univariate statistics were performed using the R software with the ade4, FactoMineR, agricolae and vegan packages.

Results

To infer the regulatory mechanisms involved in the response and acclimation of diatoms to salinity, we measured the responses of the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii* to short- or long-term exposure to ecologically realistic stress conditions. Cells were exposed for 5 days (hereafter named short-term) or approximately 2 years (hereafter named long-term) to 3 different salinities (21, 28 or 35 psu). We did not detect any important effects on *T. weissflogii*'s growth rates under these salinity concentrations and acclimation periods (with a generation time of *ca.* 25 hours; Table II-I). Then, we tested the possible modification of energy parameters and physiological traits (*i.e.* pigment concentration, photosynthesis rates, carbon fixation and export, and silicon metabolism) for the *maintenance* of biomass formation.

Table II-I: Physiological parameters

Acclimation		Short-term			Long-term		
Salinity (psu)		21	28	35	21	28	35
Carbon	μ_{\max} (d ⁻¹)	0.97 ± 0.03	0.94 ± 0.01	0.93 ± 0.02	0.93 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.93 ± 0.03
	Cl (fg C.L ⁻¹ .cell ⁻¹)	28.0 ± 0.3	29.8 ± 0.9	33.3 ± 0.3	29.9 ± 0.1	31.4 ± 0.2	32.3 ± 0.6
	sEPS (fg C.L ⁻¹ .cell ⁻¹)	62.1 ± 0.7	62.8 ± 0.4	63.9 ± 0.1	62.8 ± 0.8	62.3 ± 0.6	64.0 ± 2.0
	bEPS (fg C.L ⁻¹ .cell ⁻¹)	28.6 ± 0.7	28.9 ± 0.5	32.9 ± 0.2	30.5 ± 0.7	32.2 ± 0.3	32.5 ± 0.2
	TEP (pg C X eq.L ⁻¹ .cell ⁻¹)	7.08 ± 0.24	5.51 ± 0.12	5.38 ± 0.48	6.60 ± 0.50	6.20 ± 0.52	5.31 ± 1.33
	¹³ C incorporation (μg C.μg Chla.h ⁻¹)	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.01
Silicon	Sii (pmol Si.cell ⁻¹)	0.132 ± 0.011	0.132 ± 0.009	0.132 ± 0.012	0.131 ± 0.015	0.131 ± 0.021	0.130 ± 0.016
	BSi (pmol Si.cell ⁻¹)	0.573 ± 0.056	0.594 ± 0.021	0.596 ± 0.048	0.600 ± 0.029	0.595 ± 0.075	0.584 ± 0.044
	InCR (pmol Si.cell ⁻¹ μ _{max} ^{-d})	0.588 ± 0.057	0.632 ± 0.023	0.642 ± 0.051	0.647 ± 0.032	0.641 ± 0.081	0.625 ± 0.047

Long-term adjustment of the photosynthetic apparatus

We investigated the consequences of salinity fluctuation on the composition and intracellular concentration of both the light-harvesting and photoprotective pigments. HPLC was used to measure the concentrations of the main pigments found in diatoms (Katayama et al 2011): fucoxanthine (Fuco), chlorophyll *a* (Chl_{*a*}), chlorophyll *c* (Chl_{*c*}), diadinoxanthine (DD), diatoxanthine (DT) and β-carotene (Caro). ANOVA analyses ($p < 0.05$) revealed a decrease in the DD concentration as a function of salinity, in DD, DT, Fuco, Chl_{*a*} and Chl_{*c*} as a function of acclimation time, and in Chl_{*a*} as a function of both salinity and acclimation time. The principal component analyses confirmed these results and showed that the long-term cultures at 28 and 21 psu tended to form a separate group (Figure II-1a). Altogether, these data demonstrates that both the level of the salinity and the duration of the “stress” induce a slight (from 20 to 35%) but significant adjustment of the concentration of several of the main pigments.

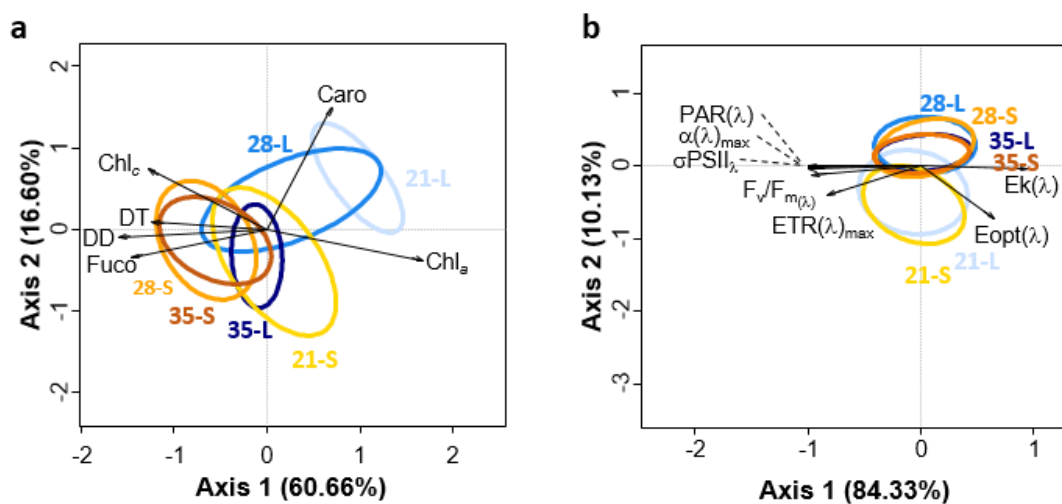


Figure II-1: Influence of salinity and acclimation time on pigment composition and photosynthetic parameters. (a) The concentration of the photosystem-associated pigments (fucoxanthine (Fuco), chlorophyll *a* (Chl_{*a*}), chlorophyll *c* (Chl_{*c*}), diadinoxanthine (DD), diatoxanthine (DT) and β-carotene (Caro)) were measured from six independent cultures and analyzed with PCA. Light orange, 21-S; orange, 28-S; dark orange, 35-S; light blue, 21-L; blue, 28-L; and dark blue, 35-L. -S and -L indicate short-term and long-term, respectively. (b) PCA analyses revealing the impact of low-salinity on 7 photosynthetic parameters of PSII. The ellipses around the centroid of each cluster correspond to the 75% standard deviation confidence levels. The results are from 3 measurements from independent cultures, and the color code is as described in (a).

To further analyze the acclimation capability of *T. weissflogii*, we used a non-invasive multi-color pulse amplitude modulation (PAM) fluorometer to measure several photosynthetic parameters. To gain information on electron production by PSII, PAM analyses were performed using five colors of actinic light (440, 490, 540, 590, and 625 nm) (Schreiber et al 2012). Eight photosynthetic parameters were calculated: $F_v/F_{m(\lambda)}$, $\sigma\text{PSII}_\lambda$, $\alpha(\lambda)_{\text{max}}$, $E_{\text{opt}}(\lambda)$, $E_k(\lambda)$, $ETR(\lambda)_{\text{max}}$, and $PAR(\lambda)$ (for details see Supplementary

Methods). The principal component analyses demonstrated a difference for both the 21-L and 21-S cultures when the different photosynthetic parameters were combined under different conditions (Figure II-1b). Overall, we found a significant increase of 20% for $F_v/F_{m(440)}$ at 21 psu and 20% for the cross-section of PSII ($\sigma_{PSII_{440}}$) at the lower salinity condition and in the long-term adapted cultures. An increase in the absorption cross-section when the pigment content decreases might be due to a rearrangement in the packaging of the pigments, leading to an increase in the efficiency of light absorption.

Carbon metabolism is barely affected by salinity

Because photosynthesis also drives carbon fixation, we examined whether the observed modifications in the photosynthetic rates at 21 psu (see above) led to variations in carbon acquisition and export. The ^{13}C incorporation rate varied from 0.60 to 0.62 $\mu\text{g C} \cdot \mu\text{g Chl}_a \cdot \text{h}^{-1}$ independently of the tested conditions (Table II-I), suggesting similar inorganic carbon incorporation into organic matter. The combination of both ^{13}C incorporation and PAM analysis (which together correspond to a powerful tool to estimate carbon assimilation) demonstrated a relative homogenous primary production and a minute impact of salinity.

In photosynthetic organisms, the carbon fixed through photosynthesis allows the formation of photoassimilates that are used for the central metabolic processes (*i.e.* glycolysis and the TCA cycle) to fulfill the cellular metabolic needs or for energy storage in the form of chrysolaminaran or lipids. To further assess the impact of the salinity regime on carbon metabolism, we measured the carbohydrate fractions present inside the cells (known as the pool of internal carbohydrates, or CI). The CI showed a slight decrease of *ca.* 15% and 10% at 21 psu in the short- and long-term acclimated cultures, respectively (Table II-I).

Planktonic and benthic diatoms can secrete polysaccharides through the cytoplasmic membrane to form a soluble exopolysaccharide fraction (sEPS) and a frustule-bound exopolysaccharide fraction (bEPS). In the presence of divalent cations (*i.e.* Mg^{2+} and Fe^{2+}), the exudation of these fractions can aggregate to produce transparent exopolysaccharides (TEP) that act as the glue for diatom and particle aggregation. The sEPS was found to be rather similar under the different culture conditions, but the bEPS presented a slight decrease with decreasing salinity for the 28-S and 21-S cultures (Table II-I). A clear increase in the TEP concentration was observed with decreasing salinity for both the short- and long-term cultures (Table II-I). Changes in environmental conditions and stress conditions (*i.e.* higher

temperature, nutrient limitation, elevated $p\text{CO}_2$ and oxidative stress) were shown to affect TEP production in diatoms (Passow 2002).

De novo* assembly and functional annotation of the transcriptome of *T. weissflogii

One goal of this study was to infer the form of the genomic regulatory response to decreasing salinity. Therefore, we performed sequencing of the *T. weissflogii* transcriptome and used several workflows for the annotation. A cDNA library for paired-end Illumina sequencing was prepared from a mixture of total RNA isolated from the 6 different culture conditions. Using VELVET and OASES, the final assembly reconstructed 76,772 contigs (Table II-II), including 58,801 unigenes (hereafter named genes). This number of genes for *T. weissflogii* seems “reasonable” considering that its genome size was estimated by fluorescent dye to be 17 times bigger than the genome of *T. pseudonana* (Connolly et al 2008), which is known to contain 11,242 genes (Armbrust et al 2004). Moreover, the oceanic species *T. oceanica* was shown to present 37,921 genes (Lommer et al 2012). Using Blast ($E\text{-value} < 1e^{-100}$; coverage $> 80\%$) after cleaning the short genes, we found that 9,737 genes presented at least one paralogue (Table II-II), suggesting that several duplication events or a whole genome duplication followed by deletions might have occurred during the evolution of this species.

Table II-II: Description and annotation of *T. weissflogii de novo* transcriptome.

Assembly	
Total transcripts	76,772
Average length	1,167
Unigenes	58,801
Average length	913
Duplicated genes	9,737
Annotation	
Blast Hit	36,917
Annotation Hit	11,757
Mapping Hit	7,905
With Enzyme code	4,586
Specific genes	
Chloroplast	137
Mitochondrial	11
Transposable elements	158

In total, we obtained a Blast result and sequence description for 36,977 (62.8%) genes, with the majority of them presenting a best match with genes from other diatoms: *T. pseudonana* (24.9%),

T. oceanica (23.8%) and *Phaeodactylum tricornutum* (12.4%) (Table II-II). We also found 7,905 genes with at least one GO term. The distribution of the most represented GO terms from Level 2 are presented in Supplementary Figure S1. We identified 4,586 genes with a KEGG assignment that corresponded to a total of 698 different enzymes distributed over 124 different KEGG pathways. We also identified a total of 138 plastid and 11 mitochondrial genes (Table II-II and Supplementary Table II-I and II-II). Finally, the PASTEC tool (Hoede et al 2014) was used to identify 158 transposable elements (Table II-II and Supplementary Table II-III).

To better understand the evolution of diatom proteomes, an orthologous gene search was performed using the Inparanoid suite and the available data from the centrics *T. pseudonana* and *T. oceanica* and the pennates *P. tricornutum*, *Fragilariopsis cylindrus* and *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Figure II-2).

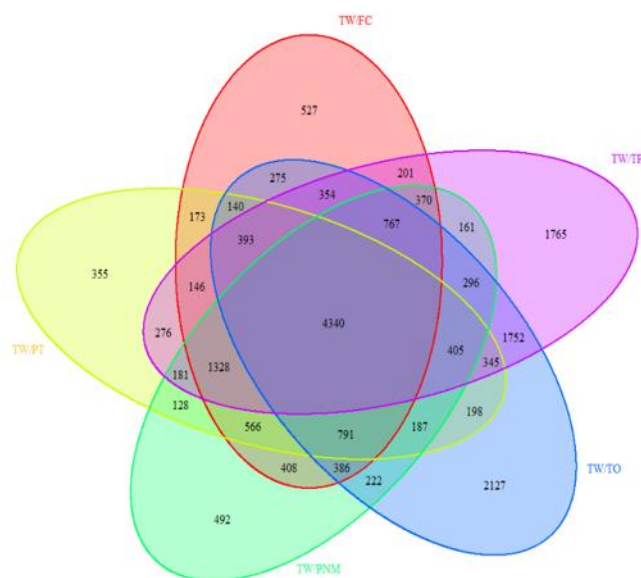


Figure II-2: Identification of the orthologous groups shared by five pennate or centric diatoms compared to *Thalassiosira weissflogii*. Using Inparanoid, we found ortholog groups shared by *T. pseudonana* (TP), *T. oceanica* (TO), *Phaeodactylum tricornutum* (PT), *Pseudo-nitzschia multiseriis* (PNM) and *Fragilariopsis cylindrus* (FC) compared to *T. weissflogii* (TW). The Venn diagram of the comparison of the five pairwise analyses shows 4,340 orthologous groups shared by all diatoms called “Diatom core genes” (DCG) and 1,752 shared by the three diatoms belonging to the genus *Thalassiosira* that comprise the “*Thalassiosira core genes*” (TCG).

In total, 4,340 orthologous groups were found to be conserved in each diatom and represented the Diatom Core Gene (DCG); this number was consistent with previous analyses (Bender et al 2014, Bowler et al 2008, Cheng et al 2014). Analyses of GO term enrichment (p -value of $1e^{-5}$, Fisher’s exact test with multiple testing correction of the FDR) of the DCG demonstrated other representations of several GO terms involved in core metabolic pathways, such as transport (GO:0006810), translation (GO:0006412) or small molecule biosynthetic processes (GO:0044283) (Supplementary Table II-IV).

Finally, the presence of three diatoms belonging to the *Thalassiosira* genus allowed us to determine 1,752 orthologous groups specifically shared among this genus (hereafter named the *Thalassiosira* Core Genes, or TCG). Interestingly, the TCG presented an enrichment of several GO terms, especially those corresponding to chitin metabolism (GO:0006030, GO:0004568 and GO:0005576) (Supplementary Table II-IV). This result supports the hypothesis that *Thalassiosira* as a genera is particularly competent at producing chitin, thereby confirming previous studies on *T. pseudonana* (Durkin et al 2009).

Adjustment of the whole gene expression profile in response to salinity

To investigate the response to lower salinity and the differences between short- and long-term exposure, we considered the differentially expressed genes under at least one condition relative to their reference conditions as informative. After filtering (cutoff values \log_2 fold change >2 or <-2 and p -value <0.05), we obtained a set of 1,718 genes that were reliably and significantly differentially expressed (Supplementary Table V). The differential expression of several of these genes was confirmed by quantitative PCR (Supplementary Figure S2). Among this set of differentially expressed genes, 664 were found to have at least one GO term, whereas 452 had a Blast hit but no GO term. Searches for GO term enrichment did not reveal significant differences between the 1,718 genes and the total *de novo* transcriptome of *T. weissflogii*, thereby revealing that the response and acclimation to salinity involved genes involved in various biological processes, cellular compartments and molecular functions (Supplementary Figure II-S1).

For the short-term cultures, we found 553 and 185 differentially expressed genes for 21-S and 28-S, respectively (Figure II-3). The total number of differentially expressed genes was significantly higher for the long-term acclimated cultures, with 953 and 245 genes identified for 21-L and 28-L, respectively (Figure II-3). However, comparisons between the set of differentially expressed genes under the short- and long-term conditions revealed only 42 genes in common between 21-S and 21-L and 4 between 28-S and 28-L. Moreover, 85.9% of the differentially expressed genes in 21-L were down-regulated, compared to 63.7% of the upregulated genes in 21-S (Figure II-3).

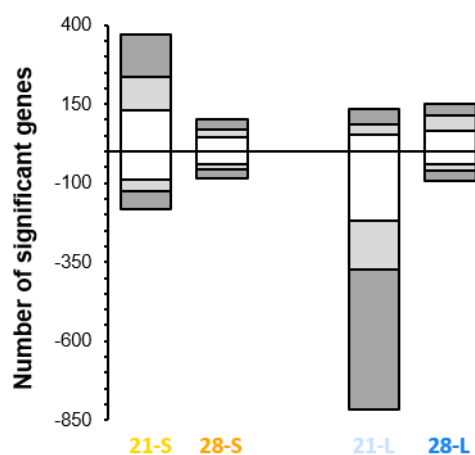


Figure II-3: Transcriptional profile of significant genes in *T. weissflogii* under short- and long-term salt stress. Number and distribution of differentially expressed genes with annotation information without level 2 of the Biological Process GO assignment or blast results (white block, gray block and dark gray block, respectively).

These differences were also supported using an Omic viewer tool (BioCyc) adapted to the *T. pseudonana* metabolic pathways (Supplementary Figures II-S3 and II-S6). In particular, we identified 103 differentially expressed genes of interest that belonged to several pathways (*i.e.* carbon, photosynthesis, nitrogen, and lipids) involved in stress metabolism (Supplementary Figure II-S7). These data demonstrated that acclimation to lower salinity involved the differential expression of a higher number of genes involved in different pathways, and suggested that transcriptome reprogramming might also require a decrease in the amount of transcription.

To analyze the time dependence of the genome response to salinity, we compared the short-versus long-term responses under each salinity condition. A set of 813 and 180 differentially expressed genes were identified at 21 and 28 psu, respectively (Figure II-4a). Of these new sets, 157 genes at 21 psu and 91 genes at 28 psu corresponded to new genes that were induced or repressed as the result of the acclimation period (Figure II-4b, and Supplementary Table II-V). Analyses of GO term enrichment demonstrated that three GO terms were particularly enriched; these GO terms included the Cellular Component plastid (GO:0009536), thylakoid (GO:0009579), and Biological Process GO terms that corresponded to the generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091). These results of the time-dependent genes supported the hypothesis that acclimation might also involve adjustment in the management of energy metabolism.

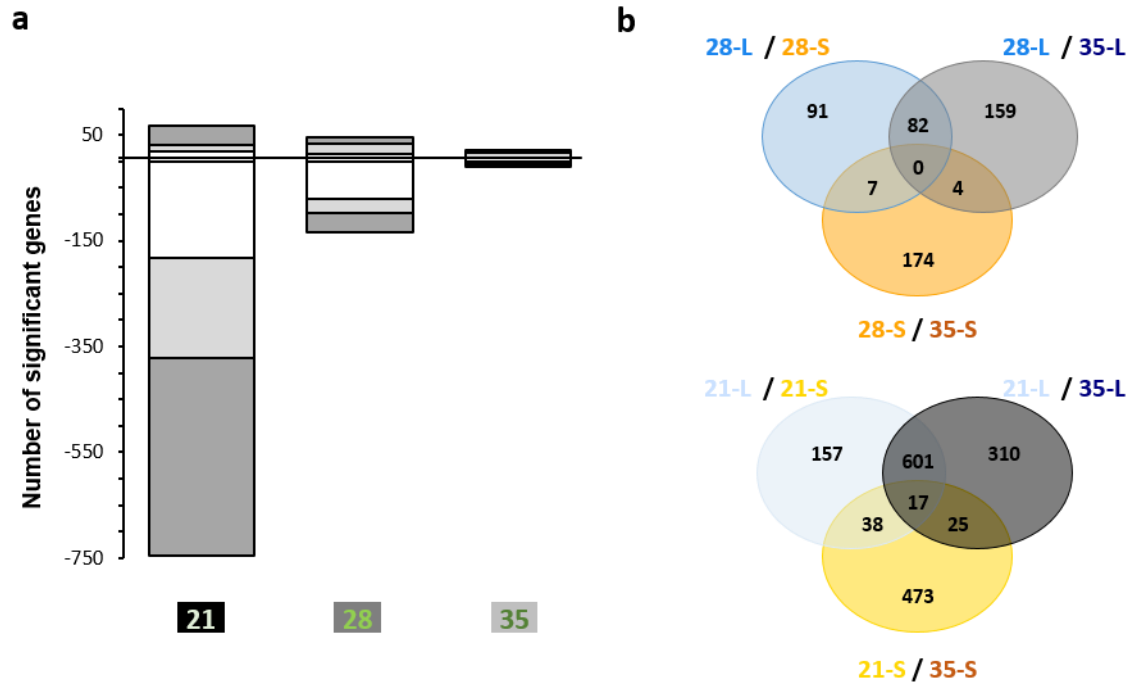


Figure II-4: Differential expression as a function of time dependence. The barplots correspond to differentially expressed genes at 21 and 28 psu (cutoff values \log_2 (Short/Long) fold change > 2 or < -2 and p -value < 0.05).

Silicon metabolism and morphogenesis under variable salinity conditions

Silicon metabolism is generally characterized by the intracellular silicon pool (Sii) and the biogenic silica pool (BSi). Another interesting parameter is silicon incorporation (Incr), which is directly related to the rate of frustule formation and is calculated as the BSi content per cell divided by the specific growth rate (see Supplementary methods). Measurements from 6 independent cultures revealed that salinity had no impact on the accumulation and incorporation of silicic acid independent of the duration of the acclimation period (Table II-I).

To test the potential impact of lower salinity on valve morphology, frustules were purified from cells grown under the different conditions and the valve morphology was analyzed from TEM images. Seven morphological traits were measured from 15 to 20 individual valves per condition. These traits included the diameter (D), number of central fultoportulae (NFc), number of marginal fultoportulae (NFm), distance between adjacent central fultoportulae (DFc), distance between adjacent marginal fultoportulae (DFm), and the “accuracy” (Acc) and “precision” (Pr) of central fultoportulae. The Acc and Pr are new indicators that we introduced here to measure the degree of closeness of the fultoportulae.

Principal component analyses (Figure II-5a) and statistical tests revealed a significant variation for *DFm*, *Acc*, *NFc*, and *NFm* as a function of salinity ($p < 0.05$) and *DFm*, *Acc*, *Pr*, and *DFc* as a function of the acclimation time ($p < 0.05$).

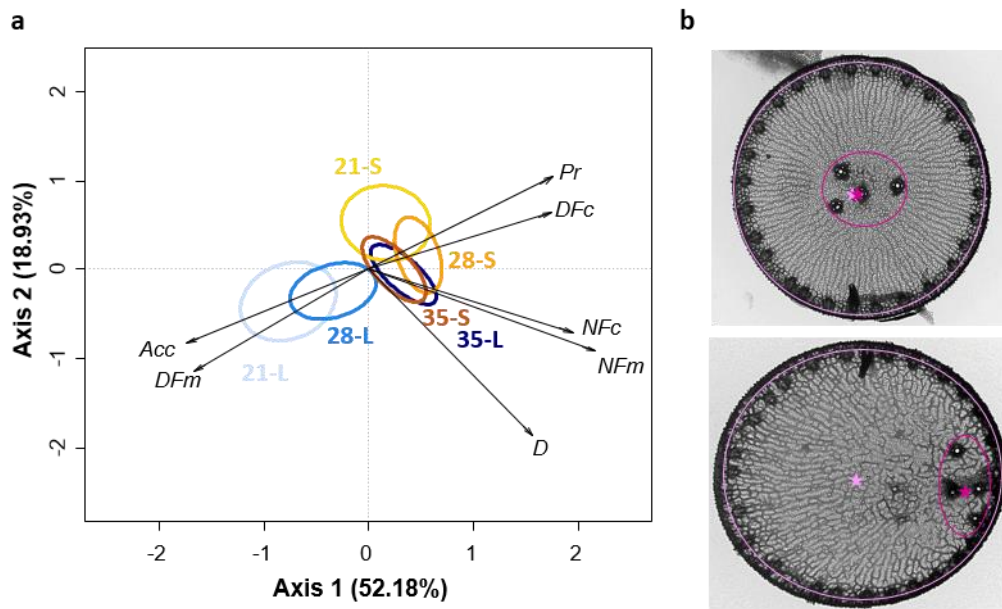


Figure II-5: Valve morphology is affected by the combination of salinity and acclimation time. (a) The PCA of 7 measured morphological traits: valve diameter (*D*), number of central fuloportulae (*NFc*), number of marginal fuloportulae (*NFm*), distance between adjacent central fuloportulae (*DFc*), distance between adjacent rim fuloportulae (*DFm*), and the “accuracy” (*Acc*) and the “precision” (*Pr*) of the central fuloportulae. The results are from measurements of 15 to 20 individual valves per condition, and the color-code is as described in Figure 1. (b) Asymmetry of the valve morphology observed in the long-term culture at 21 psu (upper picture) compared to the valves from cells grown under current open ocean salinity and pH conditions (lower picture). The light pink star indicates the gravity center of the marginal fuloportulae, and the dark pink star indicates one of the central fuloportulae. The fuloportulae is a biosilica ornamentation formed by a tube connected to a chamber that permits extrusion outside of the cell.

The largest variation for a morphometric trait was a decrease in the long-term acclimated culture by approximately 4-fold and a 2-fold decrease in the *Acc* at 21 and 28 psu, respectively. We also found that the lower the *Acc*, the more ellipsoid is the valve (compare in Figure II-5b the upper and lower images). Overall, our results revealed that even when the external salinity had tiny effects on Si metabolism, the ontogeny of the valve might be sensitive to the ionic strength of the culture medium.

Discussion

Due to the growing recognition of the importance of understanding the timescale acclimation strategies developed by diatoms in response to modification of the environmental conditions, we studied short- (*ca.* 5 days) and long-time (*ca.* 2 years) scale responses to polyhaline-euhaline salinity (21, 28 and 35 psu). These salinities correspond to natural water bodies such as brackish bays, estuaries or the average ocean sea surface. Here, we integrated physiological-based assays and morphological plasticity with a functional genomics approach to examine the regulatory changes that occurred during the acclimation to salinity in the typical estuary diatom *Thalassiosira weissflogii* (CCMP 1051). This species was of particular interest because information was available on its sensitivity to several environmental stresses, including salinity (Vrieling et al 2007) and the $p\text{CO}_2$ concentration (Seebah et al 2014), but no genomic information was available. The *de novo* assembly and annotation of its transcriptome performed in this study offer a new possibility to investigate the genomic cost associated with the acclimation to salinity, complement general information on diatom gene networks, and decipher specific gene pathways that are enriched in *Thalassiosira*, which is considered to be a representative diatom genus.

Phytoplankton strains living in coastal and estuary environments can be considered generalists and should not present much difference in growth rates and fitness under low or high salinity conditions (Brand 1984). Indeed, we did not detect alterations in the growth rate when *T. weissflogii* was exposed for 5 generations to 21, 28 or 35 psu. This result confirms that this strain can quickly acclimate to lower salinity under laboratory conditions and is in agreement with its distribution in natural environments. Given that unicellular algae tend to maximize their specific growth rate, the environmental conditions can induce changes in the cellular composition or structure of the photosynthetic apparatus. We investigated the carbon fixation rate using a multi-color PAM fluorimeter and ^{13}C incorporation (Napoleon et al 2013) and found that cells grown at 21 psu presented a slight increase in F_v/F_m . These results represent a comparable yield of energy production under the different salt stresses tested and further confirm that *T. weissflogii* can acclimate to low salinities. Another physiological parameter for acclimation may be the optimization of the allocation of carbon and material flows between compartments and between cells and their environment (Shuter 1979). We found that several carbohydrate fractions presented a slight decrease in bound extracellular polymeric substances (bEPS) and internal carbohydrates (CI) and a significant increase in transparent exopolymer particles (TEP) with decreasing salinity. Although modifications in the flow of carbon (and more precisely of the TEP fraction)

represent a common response to environmental clues (Seebah et al 2014) or grazing (Prieto et al 2001) in *T. weissflogii*, our results demonstrate adjustments of carbohydrate metabolism in response to short-term salt acclimation.

Our goal was to characterize the pattern of gene expression that sustains physiological acclimation to varying salinity in a coastal diatom for the first time. We identified 185 and 553 differentially regulated genes in response to short-term exposure to 28 psu and 21 psu, respectively, with 35 psu used as a control condition. A global analysis based on GO term enrichment and a search for specific metabolic pathways revealed that the differentially expressed genes belonged to different pathways, such as nitrogen metabolism (4 genes), lipid metabolism (7 genes), silicon transporters (2 genes), stress (1 gene) and photosynthesis (1 gene of PSII) (Supplementary Figures II-S3, II-S4 and II-S7). Large modification of the whole transcriptome and the involvement of several metabolic pathways (*i.e.* photosynthesis, urea cycle, amino-acid biosynthesis, stress and transporters) are characteristic of other recent investigations of the regulatory response to salinity in brown macroalgae (Dittami et al 2012) or diatoms (Cheng et al 2014).

A decrease in the NaCl concentration in the growth medium is expected to impact the dissolution of several ions or gas species. Although the complex relationship between many environmental factors may influence the actual effects, we estimated that oxygen dissolution would be increased at 21 psu compared to 35 psu by a factor of *ca.* 10% (Lay et al 2010). Decreasing salinity should also induce a modification in the equilibration of dissolved inorganic carbon species, leading to an increase in the HCO_3^- concentration (Falkowski 2007). Therefore, osmotic stress might imbalance the homeostasis of several ions, including inorganic carbon. We specifically investigated the transcriptional regulation associated with the metabolic pathways involved in the carbon concentrating mechanisms (CCMs). Diatoms CCMs have been proposed to require the transport of inorganic carbon through the cell using transporters and carbonic anhydrases, as well as the fixation of inorganic carbon into C4 compounds in a manner similar to the C4 mechanism in plants (Obata et al 2013). We found a few upregulated genes after 5 days at moderate salinity (28 psu) that belonged to CCM and encoded a pyruvate carboxylase or a phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC). This last enzyme catalyzes the carboxylation of bicarbonate (HCO_3^-), which is used as a precursor for enzymes belonging to both C3 and C4 metabolic pathways. Among the two PEPC identified in the *Phaeodactylum tricornutum* and *T. pseudonana* genomes, one was reported to possibly have a green algae origin (PEPC1) and the other a bacterial origin (PEPC2) (Kroth et al 2008). The PEPC gene that was over-expressed under low salinity stress conditions in *T. weissflogii* was related to PEPC1, and therefore might be targeted to either the

endoplasmic reticulum or periplastidic space. Although the localization of the initial carboxylation step by PEPC remains unclear in diatoms, the activation of the enzyme belonging to the C4 pathway could suggest a mechanism to dissipate excess energy and/or enhance the CO₂ concentration close to the Rubisco (Kroth et al 2008, Kroth 2015). In the 21-S culture, we observed an increase in the expression of one triose-phosphate-translocator, the same PEPC1 gene mentioned above and several genes belonging to three different classes of carbonic anhydrases (one α -CA; two δ -CAs and one CDCA). Another gene encoding an α -CA was found to be down-regulated. Carbonic anhydrases are ubiquitous enzymes present in eukaryotes and prokaryotes with two specific classes (δ -CAs and ζ -CAs, also named CDCAs) that were first isolated in *T. weissflogii* and are still restricted to the *Thalassiosira* genera and a few other marine secondary endosymbiotic algae. These enzymes were shown to be differentially expressed under a broad range of environmental conditions (Lane and Morel 2000, Lane et al 2005, McGinn and Morel 2008, Tachibana et al 2011, Xu and Morel 2013). Interestingly, *T. weissflogii* presents a higher number of putative CAs (34 genes were identified; Supplementary Figure S8) compared to previous reports on other diatoms (13 in *T. pseudonana* and 9 in *P. tricornutum*) and seems to have maintained all of the different classes of CAs, including the presence of the β -class that is not present in the two other *Thalassiosira* species for which genomes are available (*T. oceanica* and *T. pseudonana*). However, the different CA classes are present in the pennates (*P. tricornutum*, *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *Fragilariopsis cylindrus*) (not shown). We propose that the increase in the transcription of CAs might compensate for a decrease in the DIC and/or a decrease in Na⁺-dependent HCO₃⁻ transport under low salinity conditions. However, despite evidence of the modification of the transcription of several genes involved in CCM, regulation of this essential pathway could correspond to the short-term response of the cell to the energy demand required for the maintenance of the intracellular ionic homeostasis and possibly other metabolic pathways (Haimovich-Dayana et al 2013).

After 2 years of acclimation with various salinity concentrations, we found similar growth rates using equivalent concentrations of the bEPS and sEPS fractions and the measured silicon pools (Table II-I). Nevertheless, we found a slight increase in two photosynthetic parameters (F_v/F_m and the cross-section of PSII ($\sigma_{PSII_{440}}$)) and a small but significant decrease in several pigment concentrations (DD, DT, Fuco, Chl_a and Chl_c). The increase in the chlorophyll-specific absorption cross-section ($\sigma_{PSII_{440}}$) may be due to a repackaging effect associated with the decrease in the Fuco, Chl_a and Chl_c concentrations. We observed some modifications in valve morphology for a fraction of the population of the cells grown at 21 psu (see below). Altogether, our results demonstrate that acclimation to salinity induces physiological trade-offs in diatoms even when *T. weissflogii* is able to adapt to the polyhaline to euhaline salinity regimens tested.

RNA-seq analyses revealed a deep genomic reprogramming of the *T. weissflogii* transcriptome compared to the short-term conditions. Indeed, we found a deep modification in the expression levels with 245 (including 10 genes that belonged to the *Thalassiosira* Core Gene or TCG) and 953 (including 48 genes that belonged to the TCG) differentially expressed genes at 28 and 21 psu, respectively. No specific GO-term enrichment was detected for these gene sets. Interestingly, only a minor fraction of these genes was shared between the short and long-term conditions (4.4% at 21 psu and 1.6% at 28 psu), revealing a switch in the genes required for acclimation. To gain further information, we also compared the expression between short- and long-term cultures at a given salinity level. Among the 813 and 180 significant genes identified at 21 and 28 psu, 157 and 91 were specific to the time-dependence analysis. GO term enrichment demonstrated the enrichment of GO terms involved in the management of energy metabolism within the chloroplast during the acclimation process. An overall decrease in the transcription cost of both the nuclear and chloroplastic genes argues that *T. weissflogii* is a generalist diatom with regards to salinity. Generalist *Daphnia* species were shown to display a lower cost of transcription compared to more specialist species when exposed to salinity outside of their tolerance range (Latta et al 2012).

One difference between short- and long-term acclimation in response to salinity might be the modification in carbon acquisition and the regulation of energetic processes. Two of the four genes encoding CDCAs in *T. weissflogii* presented a sharp decrease in the 21-L cultures. Interestingly, lower expression and decreased activity of the extracellular carbonic anhydrase was found in the green algae *Dunaliella salina* in response to a 2 year acclimation period to hypo salt stress (Liu et al 2012). Although CAs plays an important role in ensuring the supply of inorganic carbon (Ci), external CAs may provide only a small energetic benefit (Hopkinson et al 2013) and are not the only enzymes involved in supplying Ci. Interestingly, the SLC4 genes were recently shown to be involved in dissolved inorganic carbon (DIC) transport in the diatom *P. tricornutum*, and its transport capability was shown to be activated by the sodium concentration (Nakajima et al 2013). *T. weissflogii* contains several homologues (10 putative genes) of the SLC4 HCO₃⁻ transporter family. One possibility is that the increase in the expression of a putative SLC4 transporter in *T. weissflogii* may contribute to the cellular response to compensate for the decrease in salinity and potentially in DIC. During carbohydrate metabolism, chrysolaminaran represents a pool of polysaccharides used for carbon energy storage that can represent 10 to 20% of the total cellular carbon in the cell (Kroth et al 2008). We found that acclimation to low salinity induced a strong down-regulation of a putative exo-1,3-β-glucanase that could be used to supply the cell as a

source of organic carbon. Glycolytic enzymes, such as fructose biphosphate aldolase, glucose-6-phosphate isomerase and phosphoglycerate mutase, were also found to be down-regulated in the 21-L cultures, thereby strengthening the hypothesis that acclimation might induce several alternative pathways to supply both inorganic and organic carbon. Further studies are still needed to better characterize the metabolic pathways used by diatoms under salinity stress and during the acclimation process.

An increase in osmotic pressure was proposed to act as microtubule poison and cause aberrancy of the diatom's thecae (Schmid 1994). Lowering salinity was previously shown to induce modifications in the valve morphology in *T. weissflogii* (Mcmillan and Johansen 1988, Vrieling et al 2007). We specifically investigated the expression of cytoskeleton genes (*i.e.* actin, tubulin, microtubule, dynein, kinesin, and centrin) in our experiments, and found that a β -tubulin and an actin encoding-gene were down-regulated in the 21-L cultures. This modification in the expression of cytoskeleton-related genes could help explain the modifications of the valve morphology found from cells acclimated for 2 years at 21 psu. Indeed we found that the accuracy that corresponds to the localization of the fultoportulae from the center of the valve is impacted at 21 psu. More precisely, the central fultoportulae was found to be decentered in approximately 37% of the cells. We propose that the changes in actin and tubulin expression levels may alter the position of the silica deposition vesicle within the cell and/or its expansion, leading to modification of the valve morphology.

One possible explanation for the transcriptional changes observed during the acclimation process is the evolution of the expression of signaling pathways and/or transcription factors. The long-term acclimated cells exhibit down-regulation of two genes at 21 psu: a calcineurin demonstrated to function as a calcium sensor in land plants and some chlorophyte green algae (Kleist et al 2014) and a calcium-dependent protein kinase from a family of proteins demonstrated to contribute to salt and drought tolerance in plants (Valmonte et al 2014). Acclimation also induces a decrease in the expression of several stress-related genes (*e.g.*, 5 heat shock factors (HSF), 1 cold shock proteins, 1 heat shock proteins 70, and 2 chaperones), although we found that 2 HSF genes were upregulated. HSF is the most abundant class of transcriptional factors in diatoms (Rayko et al 2010); these transcription factors are likely to be involved in the maintenance of the integrity of the metabolic state of the cells (Akerfelt et al 2010). Both induction and repression of HSF-encoding genes were observed in the diatom *Nitzschia sp.* in response to hyper-salt stress (Cheng et al 2014). The activation of only some HSFs in response to acclimation to salt tolerance was shown in other brown algae (Collen and Davison 1999, Dittami et al

2009). Plastid genes are transcribed by two different RNA polymerases: the nuclear-encoded RNA polymerase (NEP) and cyanobacterium-derived plastid-encoded RNA polymerase (PEP). The activity/specificity of the PEP core enzyme is regulated by sigma-like transcription factors that are encoded by the nuclear genome. Several sigma factors have been identified in *Arabidopsis*, and their expression has been shown to be influenced by environmental factors (*i.e.* osmolarity, temperature, and high light) (Chi et al 2015). We identified 13 putative genes encoding Sigma factors in *T. weissflogii*. The expression of one of these genes was shown to be down-regulated under low salinity conditions and in long-term acclimated cultures. Further investigations into diatoms are required to understand the roles of chloroplastic transcriptional regulation in the response and acclimation to environmental factors and carbon assimilation.

D. Informations Supplémentaires

1. Supplementary Tables

Supplementary Table II-I. Functional classification of plastid related genes identified in *T. weissflogii*.

in bold, genes identified in *T. weissflogii de novo* transcriptome by using blastx search on *T. pseudonana*, *T. oceanica*, *P. tricornutum* and *O. mobiliensis* chloroplast genome with a minimum *E*-value of $1e^{-5}$.

^a genes only present in *P. tricornutum*

^b genes only present in *P. tricornutum* and *O. sinensis*

Supplementary Table II-II. Functional classification of mitochondrial related genes identified in *T. weissflogii*.

RNAs	
Ribosomal	<i>ms, ml</i>
Transfer	<i>trnA(ugc), trnC(gca), trnD(guc), trnE(uuc), trnF(gaa), trnG(gcc), trnH(gug), trnI(gau), trnI(cau), trnK(uuu), trnL(uag), trnL(uaa), trnM(cau)f, trnM(cau)e, trnN(guu), trnP(ugg), trnQ(uug), trnR(ucu), trnR(ucg), trnS(gcu), trnS(uga), trnV(uac), trnW(cca), trnW(uca)^a, trnY(gua)</i>
Ribosomal proteins	
Small subunit	<i>rps2^b, rps3^b, rps4, rps7^b, rps8, rps10, rps11, rps12, rps13, rps14, rps19,</i>
Large subunit	<i>rpl2, rpl5, rpl6, rpl14, rpl16</i>
NADH dehydrogenase	<i>nad1, nad2, nad3, nad4, nad5, nad6, nad7, nad4L, nad9, nad11</i>
ATP synthase	<i>atp6, atp8, atp9</i>
Cytochrome oxidase	<i>cox1, cox2, cox3</i>
Apocytochrome B	<i>cob</i>
Assembly, membrane insertion	<i>tatC</i>
ORF	<i>orf 718^a orf100^c, orf182^c, orf168^c</i>

in bold, genes identified in *T. weissflogii* *de novo* transcriptome by using blastx search on *T. pseudonana*, *P. tricornutum* and *S. acus* mitochondrial genomes with a minimum *E*-value of $1e^{-5}$

^a genes only present in *T. pseudonana*

^b genes only present in both *T. pseudonana* and *P. tricornutum*

^c genes only present in *S. acus*

Supplementary Table II-III. Listing of transposable element related genes identified in *T. weissflogii*.

Class	Family	Number of gene
Retrotransposon		
- LTR	<i>Copia</i>	121
	<i>Gypsy</i>	11
- LINE	<i>LINE</i>	1
Transposon		
	<i>Crypton</i>	3
	<i>Harbinger</i>	1
	<i>Mariner</i>	1
	<i>PiggyBac</i>	5
	<i>Tase</i>	15

Supplementary Table II-IV. Details of GO enrichment analysis of *Diatom Core Genes* (DCG) and *Thalassiosira Core Genes* (TCG). GO id, terms and name are detailed in the table with *p*-value and FDR associated for each GO. To be accurate, the cut-off *p*-value was put at $1e^{-5}$.

	GO id	GO terms	GO Name	pvalue	FDR
DCG	GO:0043436	BP	oxoacid metabolic process	5,40E-17	4,10E-14
	GO:0042180	BP	cellular ketone metabolic process	4,60E-17	4,10E-14
	GO:0019752	BP	carboxylic acid metabolic process	5,40E-17	4,10E-14
	GO:0006082	BP	organic acid metabolic process	8,40E-17	4,70E-14
	GO:0044281	BP	small molecule metabolic process	2,00E-16	9,00E-14
	GO:0006412	BP	translation	1,50E-14	5,70E-12
	GO:0034641	BP	cellular nitrogen compound metabolic process	2,30E-13	7,40E-11
	GO:0006519	BP	cellular amino acid and derivative metabolic process	1,20E-12	3,30E-10
	GO:0044106	BP	cellular amine metabolic process	3,60E-12	8,90E-10
	GO:0006520	BP	cellular amino acid metabolic process	4,00E-12	9,00E-10
	GO:0044283	BP	small molecule biosynthetic process	5,40E-12	1,10E-09
	GO:0009058	BP	biosynthetic process	1,80E-09	3,30E-07
	GO:0016053	BP	organic acid biosynthetic process	2,80E-09	4,50E-07
	GO:0044271	BP	cellular nitrogen compound biosynthetic process	5,00E-09	7,40E-07
	GO:0008104	BP	protein localization	1,30E-08	1,70E-06
	GO:0033036	BP	macromolecule localization	1,30E-08	1,70E-06
	GO:0045184	BP	establishment of protein localization	1,80E-08	2,10E-06
	GO:0015031	BP	protein transport	1,80E-08	2,10E-06
	GO:0044249	BP	cellular biosynthetic process	3,20E-08	3,60E-06
	GO:0051641	BP	cellular localization	4,20E-08	4,50E-06
	GO:0051649	BP	establishment of localization in cell	5,90E-08	6,00E-06
	GO:0009309	BP	amine biosynthetic process	1,10E-07	1,10E-05
	GO:0009308	BP	amine metabolic process	1,40E-07	1,30E-05
	GO:0008652	BP	cellular amino acid biosynthetic process	4,40E-07	4,00E-05
	GO:0046907	BP	intracellular transport	7,30E-07	6,30E-05
	GO:0051234	BP	establishment of localization	8,30E-07	6,60E-05
	GO:0006810	BP	transport	8,30E-07	6,60E-05
	GO:0034613	BP	cellular protein localization	1,20E-06	8,50E-05
	GO:0051179	BP	localization	1,20E-06	8,50E-05
	GO:0070727	BP	cellular macromolecule localization	1,20E-06	8,50E-05
	GO:0005737	CC	cytoplasm	2,30E-21	9,10E-19
	GO:0044444	CC	cytoplasmic part	3,30E-16	6,60E-14
	GO:0030529	CC	ribonucleoprotein complex	6,00E-09	7,90E-07
GO:0005840	CC	ribosome	1,60E-07	1,60E-05	
TCG	GO:0006022	BP	aminoglycan metabolic process	9,80E-06	0,0039
	GO:0006030	BP	chitin metabolic process	9,80E-06	0,0039
	GO:0005976	BP	polysaccharide metabolic process	2,60E-05	0,0069
	GO:0004553	MF	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	2,80E-06	0,0016
	GO:0016798	MF	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	4,50E-06	0,0016
	GO:0004568	MF	chitinase activity	8,20E-05	0,02
	GO:0005576	CC	extracellular region	1,70E-05	0,0017

2. Supplementary Figures

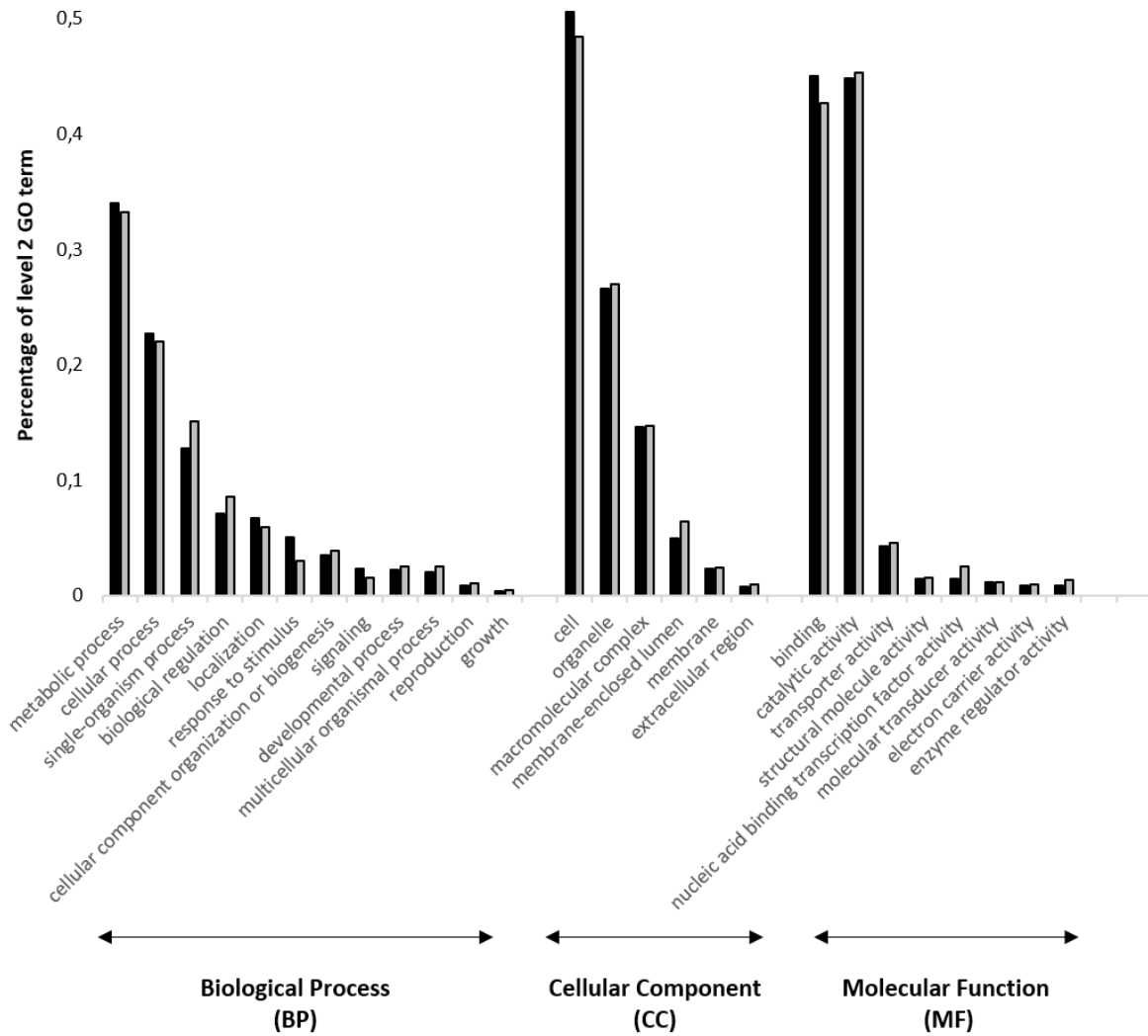


Figure II-S1. Distribution of GO terms level 2 in *T. weissflogii* transcriptome (*black*) and in 1718 differentially expressed genes in response to salinity (*gray*). A Fisher exact test, with a p -value cut-off of 0.05, didn't reveal any specific GO term enrichment between the whole transcriptome *de novo* and significant genes.

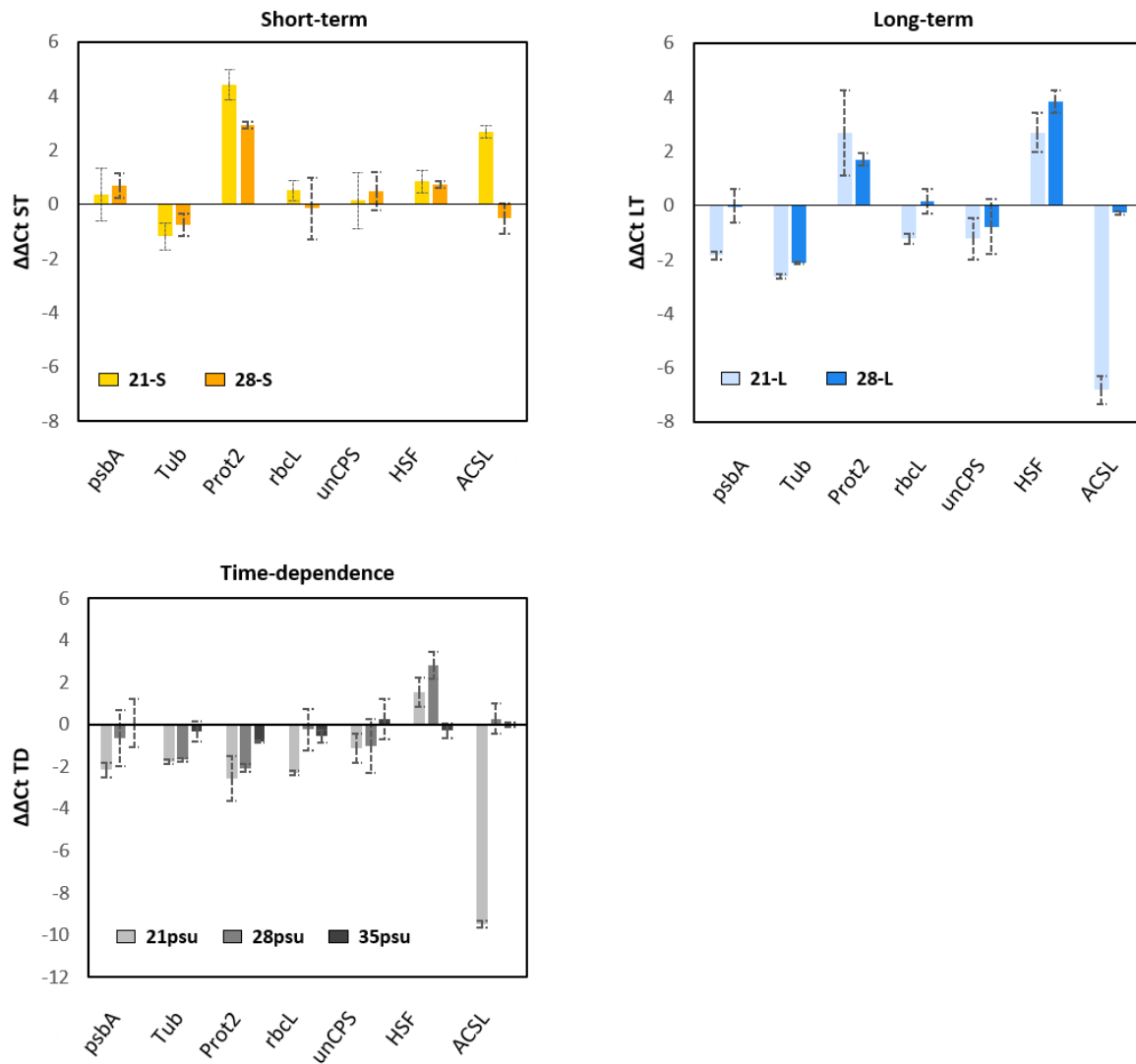


Figure II-S2. Validation of relative expression of genes expression obtained from RNA-seq by qRT-PCR. Differential expression analysis was performed using the DDcT method, with the geometric average of histone H2A2 as the endogenous control. The average and \pm SD of three biological replicates is plotted for each genes.

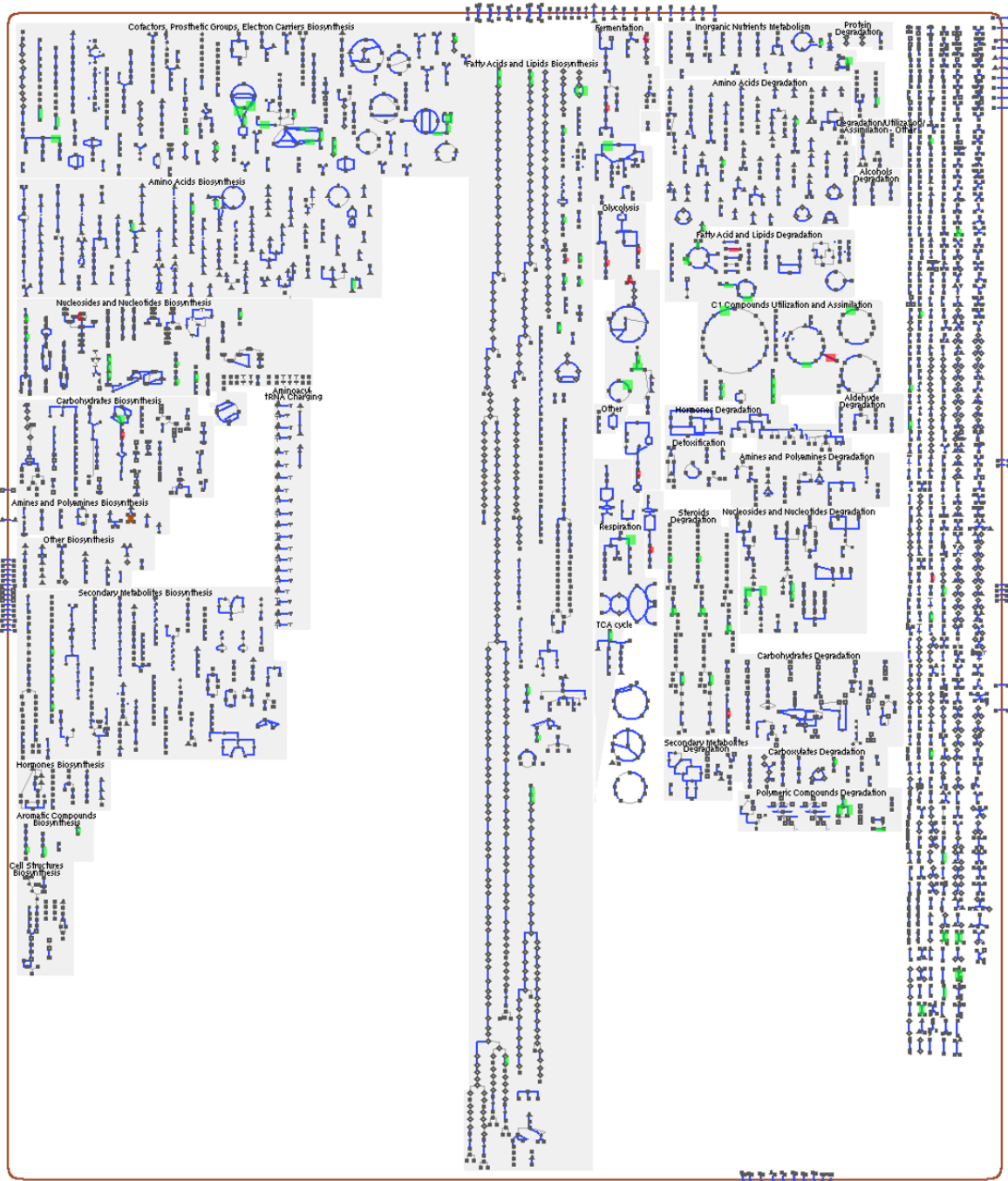


Figure II-S3. Cellular overview, using MetaCyc and *T. pseudonana* database, of the differentially expressed genes for 21-S culture. The over-expressed genes are in *green* and the down-regulated genes are in *red*.

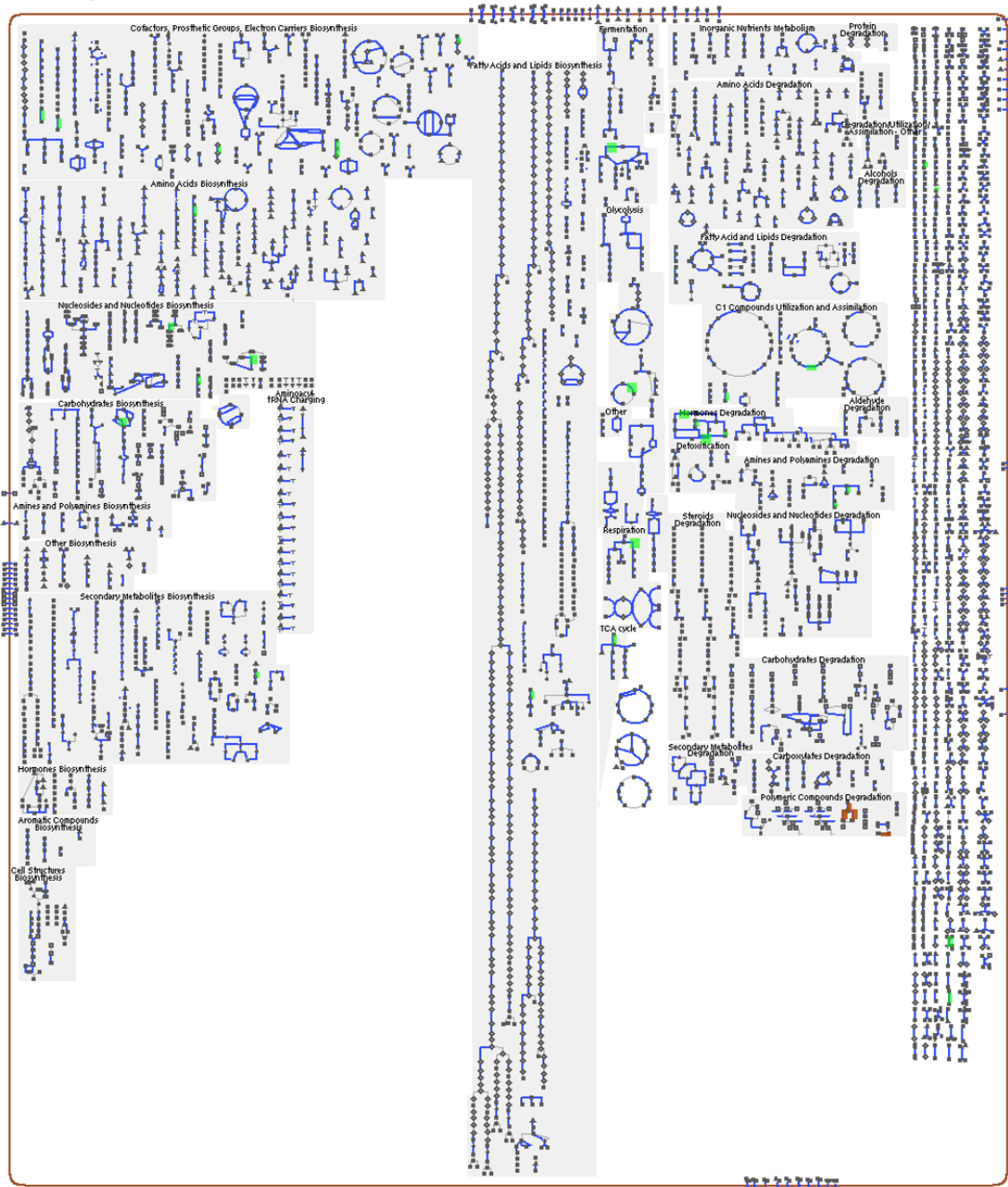


Figure II-S4. Cellular overview, using MetaCyc and *T. pseudonana* database, of the differentially expressed genes for 28-S culture. The over-expressed genes are in *green* and the down-regulated genes are in *red*.

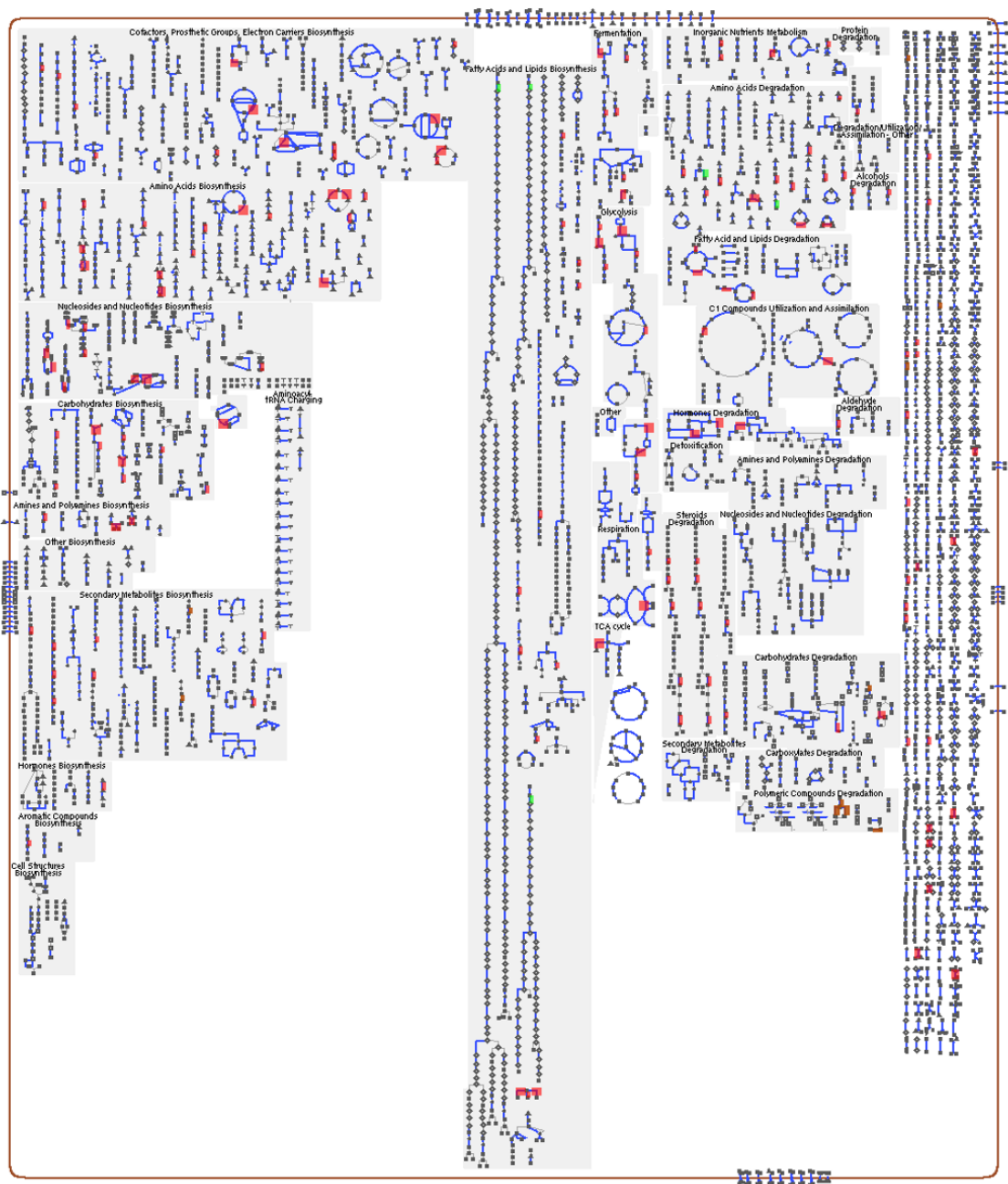


Figure II-S5. Cellular overview, using MetaCyc and *T. pseudonana* database, of the differentially expressed genes for 21-L culture. The over-expressed genes are in *green* and the down-regulated genes are in *red*.

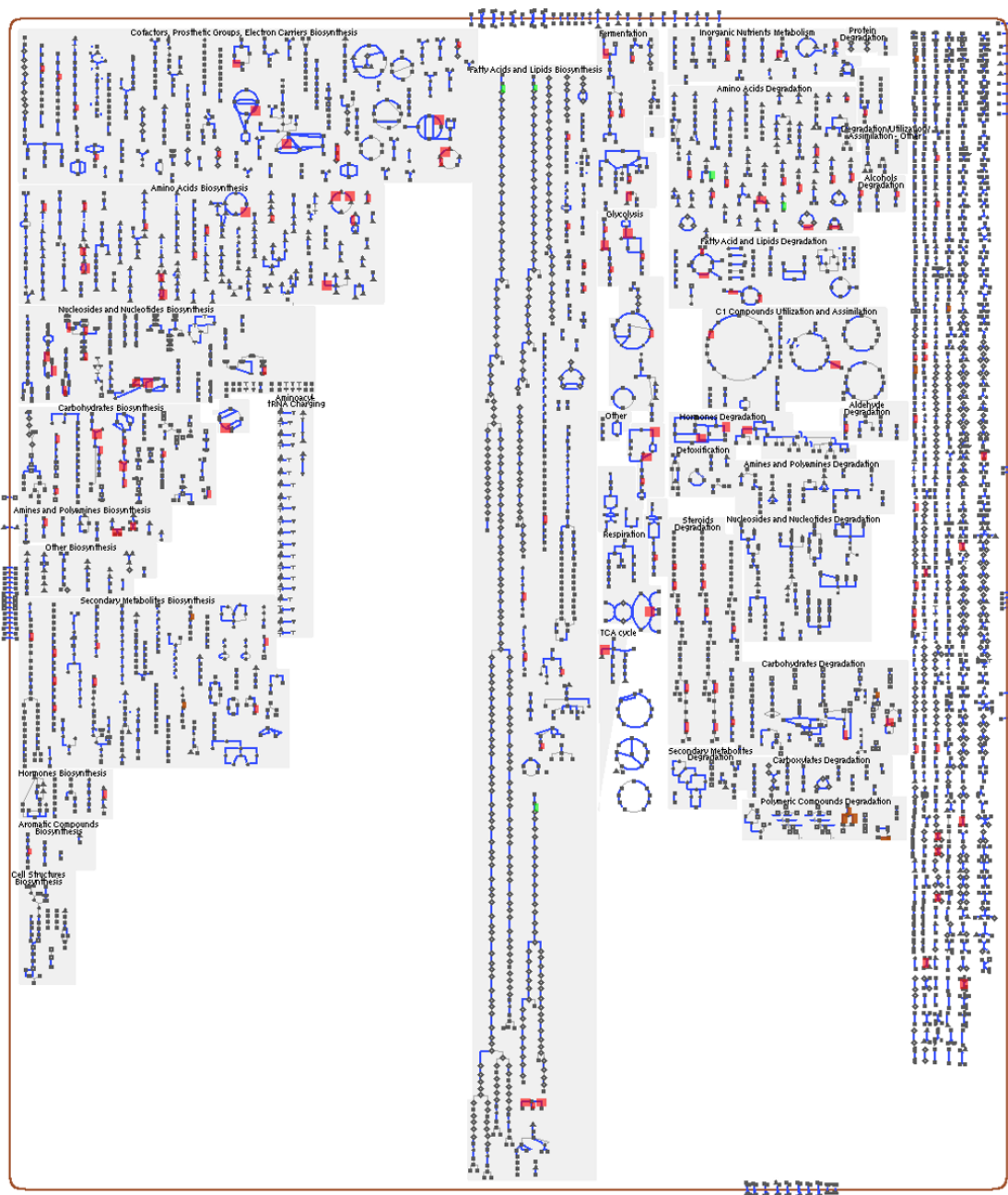


Figure II-S6. Cellular overview, using MetaCyc and *T. pseudonana* database, of the differentially expressed genes for 28-L culture. The over-expressed genes are in *green* and the down-regulated genes are in *red*.

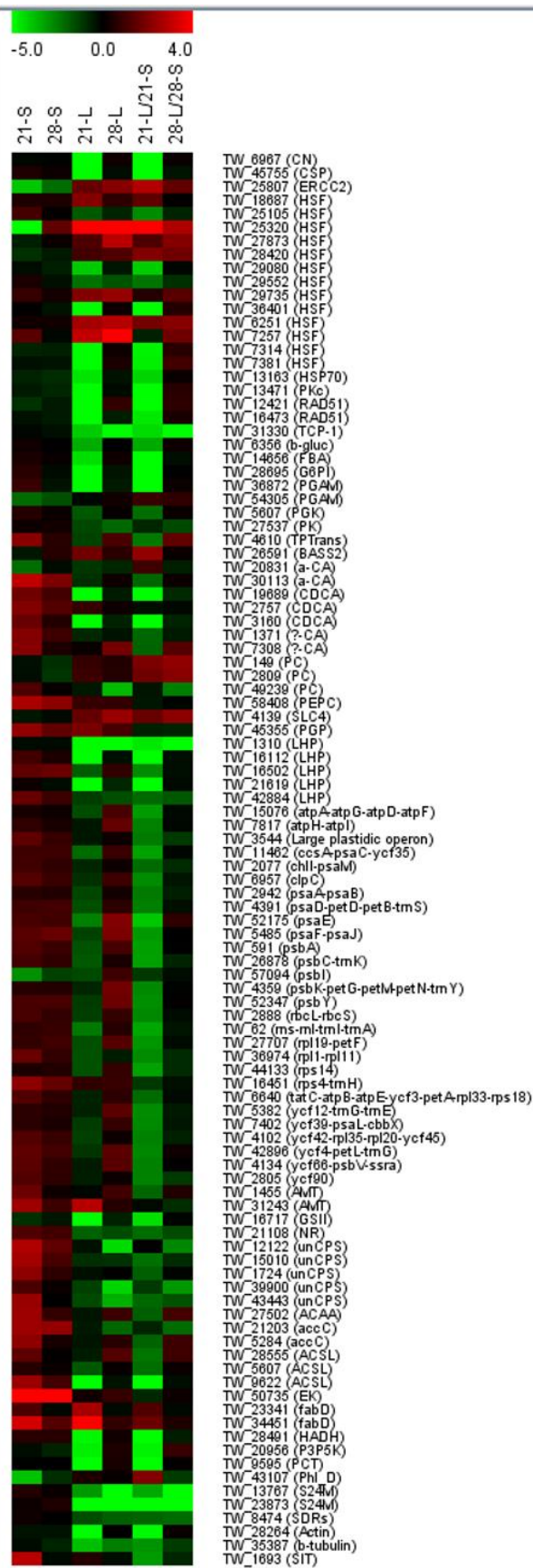


Figure II-S7. Heatmap of 103 significant genes of interest. The columns correspond to log2 fold change for each comparisons each. The *T. weissflogii* gene IDs are presented and the putative annotation is given in the bracket.

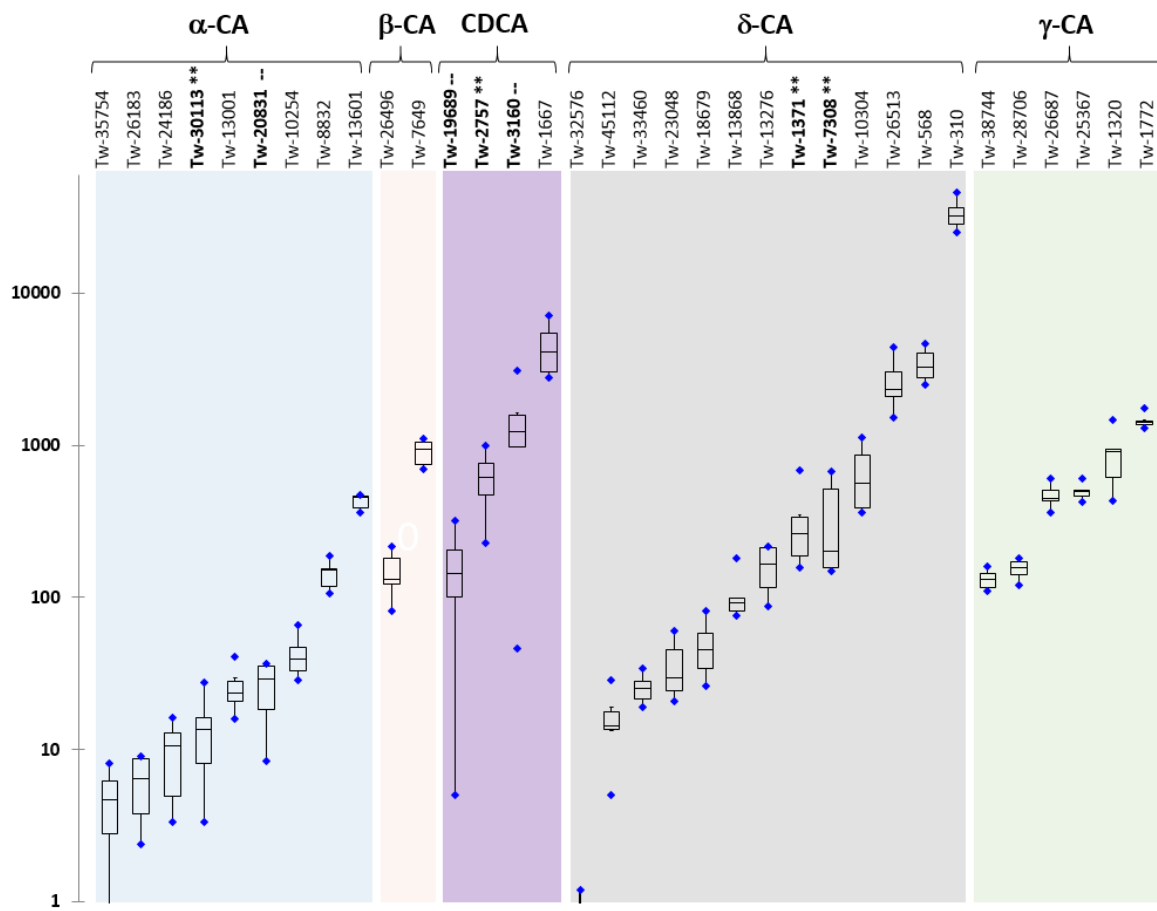


Figure II-S8. Expression levels of all the carbonic anhydrases found in *T. weissflogii*. The Boxplot correspond to the expression in the six different culture conditions, the asterisks and the hyphens indicate the genes that are differentially expressed, and the blue dots correspond to the minimum and maximum.

3. Supplementary Methods

Photosynthetic pigments analysis and photosynthetic parameters

The concentration of the pigments was determined by HPLC after methanol extraction. Pigments were identified by their absorption spectra and relative retention times. Quantification was performed by repeated injections of standards over a range of dilutions to determine the relationship between peak area and standard concentrations. Pigment extraction and quantification were realized from three independent experiments and triplicates cultures for each experiment (Supplementary Methods). The photosynthetic parameters were measured at five different wavelengths using a Multicolor– PAM fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) and complete by ^{13}C incubation analysis (Supplementary Methods).

Carbohydrate analysis

The intern carbohydrate (IC), soluble (sEPS) and bound exopolysaccharides (bEPS) fractions were extracted using the protocol described by Pierre et al. (Pierre et al 2010), but without separation of the Low Molecular Weight (LMW) and High Molecular Weight (HMW). The concentration of carbohydrate fractions was determined using the phenol-sulphuric acid method according to Dubois et al. (Dubois et al 1956), and with D(+)-Anhydrous glucose (Sigma Aldrich) as standard. The IC, sEPS and bEPS concentrations are expressed in $\text{fg C}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$. The transparent exopolysaccharides (TEP) were extracted and measured using the protocol described by (Claquin et al 2008), using A xanthan (Sigma Aldrich) as standard. The TEP concentration are expressed in $\text{pg C X eq}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$ using the conversion equation described by (Engel and Passow 2001). Every carbohydrate fractions were extracted and measured with 3 independent replicates each time (Supplementary Methods).

Measurements of Si-pools and valve morphology

The intracellular silicon (*Si*) and biogenic silica (*BSi*) pools per cell were measured following the protocol described in (Herve et al 2012). The silicon incorporation rate (IncR) was measured by dividing BSi by the cell generation time. The silicic acid concentrations were determined using the molybdenum-blue method (Iler 1979).

Valve morphological traits were measured from TEM images of purified frustule. We also developed R-scripts to determine the accuracy and the precision of the distribution of the central fultoportulae.

Frustule purification and morphometric measurements

A diatom cell wall, also called frustule, purification step is inescapable to remove all the salts and organic matter bound in frustule which is absolutely necessary for visualizing frustule ornamentation. For purification step, 10 mL of cell was harvested and washed with 10 mL of distilled water and centrifugation (2000 rpm, 19°C, and 10min) which permits to eliminate salts. Then an adding in the same time of 5 mL of sulfuric acid 96% and 1 mL of nitric acid 80% during 30 minutes allows to remove all organic matter. After several washing steps with 10 mL of sterile distilled water and centrifugation (2000rpm, 19°C, 10min), 1 mL of sterile distilled water was add to the pellet. One drop of purified frustule was drop off on 200 mesh Copper Grid and, after drying, observed with a Hitashi H-7100 electron microscope equipped with a Hamamatsu camera with a unique magnification of 8000X.

For every pictures, the cell diameter, the number of axial and central fultoportulae and the x and y positions of each fultoportulae were got using *ImageJ*. Accuracy (*Acc*) correspond to the measure of the degree of closeness between the gravity centers of the valve and the one of the central fultoportulae. Precision (*Pr*) refers to the closeness of the central fultoportulae between each other (*i.e.*, the width of the circle overlaps the cental futoportulaes). A R-script using x and y fultoportulae coordinates was written to determinate the distance between every axial fultoportulae, distance between every central fultoportulae and the accuracy and precision of central fultoportulae.

Photosynthetic pigments extraction and HPLC analysis

To determinate nature and concentration of every pigments present in each culture, we filtered 15 mL of each culture through a 0.2 µm glass microfiber filters GF/F (Whatman) using six independent replicates per conditions. Quickly after each filtration, the filter was dropped into liquid nitrogen in order to fix the cell and avoid pigment composition alteration before being conserved in glass tube at -20°C until extraction. Pigment extraction was performed by adding 3 mL of 95% buffered methanol (2% ammonium acetate final concentration). The filter was then crushed with a clean glass stick. After 1 hour of incubation at 4°C in the dark, glass tubes were centrifuged and the supernatant was transferred in vials after a filtration step (0.2 µm).

Pigment extracts were analyzed using an Agilent 1260 Infinity HPLC composed of a quaternary pump (VL 400bar), a UV-VIS photodiode array detector (DAD 1260 VL, 190 to 950 nm), and a 100 μ L sample injection loop (overfilled with 250 μ L). Chromatographic separation was carried out using a C18 column for reverse phase chromatography (Supelcosil, 25 cm long, 4.6 mm inner diameter). The solvents used were A: 0.5 M ammonium acetate in methanol and water (85:15, v:v), B: acetonitrile and water (90:10, v:v), and C: 100 % ethyl acetate. The solvent gradient followed Brotas and Plante-Cuny method (2003) with a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. Identification and calibration of the HPLC peaks was performed with chlorophyll a, astaxanthin, β -carotene, chlorophyll c and fucoxanthine standards.

Multicolor PAM fluorometry

The maximum energy conversion efficiency, or quantum efficiency of PSII charge separation ($Y(II)_{max}$) was measured using a Multicolor– PAM fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) (Schreiber et al 2012). The measurements were performed at five different wavelengths (440-, 480-, 540-, 590-, and 625-nm). A new sub-sample was used for each wavelengths. After 10 min of dark acclimation, a 3 mL sub-sample was transferred into the measuring chamber. The sample was excited by a weak light at each wavelengths (λ) to record minimum fluorescence ($F_{0\lambda}$). Maximum fluorescence ($F_{m\lambda}$) was obtained during a saturating light pulse (around 2 500 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$, for each λ), allowing the quinone A (Q_A), quinone B (Q_B) and part of plastoquinone (PQ) pools to be reduced. $F_v/F_{m(\lambda)}$ was calculated according to the following equation after subtraction of the blank fluorescence, measured on seawater filtered through a GF/F glass-fibre filter (Schreiber et al 2012) :

$$F_v/F_{m(\lambda)} = (F_{m\lambda} - F_{0\lambda}) / F_{m\lambda}$$

For each tested λ , the samples were exposed to nine irradiances (E) for 55 s at each step. Steady state fluorescence ($F_s\lambda$) and maximum fluorescence ($F_{m'\lambda}$) were measured. The effective quantum efficiency of PSII for each irradiance and each λ was determined as follows:

$$F_v'/F_{m'(\lambda)} = (F_{m'\lambda} - F_s\lambda) / F_{m'\lambda}$$

The $ETR(\lambda)$ which corresponds to the absolute electrons transport rate from the PSII, was calculated as exposed by Schreiber et al 2012 (see Schreiber et al 2012 for detailed explanations). In order to estimate the $ETR(\lambda)$, functional absorption cross section of the PSII ($\sigma_{PSII\lambda}$) was measured at the 6 wavelengths (Schreiber et al 2012). $ETR(\lambda)$ (electrons.(PSII.s)⁻¹) was calculated as followed :

$$ETR(\lambda) = \sigma_{PSII\lambda} \times L \times PAR\lambda \times \frac{Fv'/Fm'\lambda}{Fv/Fm\lambda}$$

where $\sigma_{PSII\lambda}$ is the functional cross section of PS II (nm²), L is Avogadro's constant (mol⁻¹), PAR is quantum flux density $\mu\text{mol quanta} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$.

The $ETR(\lambda)$ was plotted against PAR . In order to estimate photosynthetic parameters, the mechanistic model of *Eilers and Peeter* (Eilers and Peeters 1988) was applied to the data.

$$ETR(\lambda) (PAR) = PAR(\lambda) / (aPAR(\lambda)^2 + bPAR(\lambda) + c)$$

The maximal photosynthetic capacity $ETR(\lambda)_{\text{max}}$ (electrons.(PSII.s)⁻¹) the initial slope of the $ETR(\lambda)$ vs $PAR(\lambda)$ curve or maximal light utilization efficiency $\alpha(\lambda)$ ((electrons.(PSII.s)⁻¹) ($\mu\text{mol quanta} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$)⁻¹) (i.e. photosynthetic efficiency), the light saturation parameter $Ek(\lambda)$ ($\mu\text{mol quanta} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$) and the optimal light intensity $E_{\text{opt}}(\lambda)$ ($\mu\text{mol quanta} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$) were calculated as follows:

$$ETR(\lambda)_{\text{max}} = 1 / (b + 2\sqrt{ac})$$

$$\alpha(\lambda) = 1/c$$

$$Ek(\lambda) = ETR(\lambda)_{\text{max}} / \alpha(\lambda)$$

$$E_{\text{opt}}(\lambda) = \sqrt{c/a}$$

¹³C Incubation

Culture replicates were inoculated with NaH¹³CO₃ (98 atom %, Sigma-Aldrich) corresponding to an enrichment of about 15% of the dissolved inorganic carbon already present in 25 mL culture flasks. The inoculated cultures were incubated at 19°C under growth irradiance of 100 μEinstein m⁻² s⁻¹. Light intensity was measured using a micro-spherical quantum sensor (US-SQS; Walz) connected to a LI-COR 1400 data logger, and one flask was maintained in the dark to estimate non-photosynthetic inorganic carbon incorporation. After three hours of incubation, each flask was filtered onto 25 mm pre-combusted (450°C, 12 h) GF/F filters and stored at -22°C until analysis. To remove carbonates, filters were exposed to fuming HCl for four hours and then dried at 50°C for 12 hours (Napoleon et al 2013). The concentration of particulate organic carbon (POC) and the isotopic ratio of ¹³C to ¹²C were determined using an EA 3000 elemental analyzer (Eurovector, Milan, Italy) combined with a mass spectrophotometer (IsoPrime, Elementar). The value for incorporation in the dark was subtracted from all data. The carbon fixation rate (P^{chl}) at growth irradiance, which correspond to photosynthetic activity, was calculated according to (Hama et al 1983) and expressed in mmol C mg Chl a⁻¹ h⁻¹.

RT-qPCR

The RNA used for RNASeq and transcriptome *de novo* analysis were used for RT-qPCR validation step. After a First-Strand cDNA Synthesis (RT) with random primer using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) following manufacturer's protocol, we tested the specificity of each primer by PCR followed by electrophoresis analysis. The histone H2 was choose as reference as proposed by (Boissonneault et al 2013). The specific primers designed for each of the 7 genes tested are present in the Supplementary Table S5. qPCR were performed according to conditions described by the manufacturer for the Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent), and using a Stratagene Mx3000p (Agilent). The differential regulation between every conditions and the calculated ΔΔCT barplot are presented in Figure S7.

Acclimatation de *T. weissflogii* à un gradient hyposalin

Avec une croissance constante à court (5 générations) et à long-terme (> 700 générations), *T. weissflogii* est une diatomée euryhaline capable de s'acclimater efficacement et durablement à un gradient hyposalin (35, 28 et 21 psu). Indépendamment de la salinité et du temps d'adaptation, cette diatomée est capable de maintenir une fitness et un état physiologique qui semblent relativement homogènes. Cependant, le transcriptome semble différent en fonction de la salinité et surtout du temps d'acclimatation. En effet, à long-terme la grande majorité des gènes différentiellement exprimés (85,9 %) ont une expression diminuée alors qu'une tendance inverse est observée à court-terme. Même si l'analyse du transcriptome révèle un effet largement pleiotropique de la salinité, les mécanismes de concentration du carbone (CCM), le métabolisme énergétique et celui de la photosynthèse semblent s'ajuster finement en fonction de la durée d'acclimatation. Cette reprogrammation transcriptomique, qui ne serait pas sans conséquences sur la morphogénèse des valves, pourrait constituer une évolution de la tolérance à la salinité de *T. weissflogii* impliquant une modification de la stratégie d'acclimatation initiale.

Chapitre III

Les pompes à protons vacuolaires chez les diatomées

A. Contexte

L'équilibre acido-basique, ou homéostasie du pH, est une fonction essentielle pour tous les organismes eucaryotes. En effet, l'homéostasie du pHi est primordiale dans le maintien de la cinétique des réactions chimiques, biochimiques et biologiques ainsi que dans la création des gradients électrochimiques nécessaire au métabolisme énergétique (Taylor et al 2012). La régulation du pHi passe notamment par des tampons chimiques ou encore par le transport actif de protons. Ces protons jouent aussi des rôles primordiaux dans la signalisation ou encore le développement. Chez les plantes, les algues vertes et les diatomées, la présence d'une vacuole permet de créer un environnement cellulaire propre participant activement au maintien des paramètres cytosolique et du gradient électrochimique. Chez la microalgue verte *Eremosphaera viridis*, une acidification du cytoplasme est accompagnée d'une acidification vacuolaire suggérant un rôle direct de la vacuole dans l'homéostasie du pHi. Ainsi, pour contrer une acidification cytosolique, *Eremosphaera viridis* utiliserait la vacuole comme réservoir d'échange et de stockage de proton afin de maintenir un pH cytosolique optimal (Bethmann and Schonknecht 2009). Ce stockage de protons se ferait grâce à des transporteurs spécifiques de protons.

A ce jour, parmi l'ensemble des transporteurs de protons vacuolaires décrit on peut citer les ATPases vacuolaires (V-ATPases) hydrolysant de l'ATP (Forgac 2007) et les pyrophosphatase vacuolaire (H⁺-PPases) hydrolysant elles du pyrophosphate (PPi) (Luoto et al 2011). Ces transporteurs vacuolaires auraient des rôles physiologiques divers, comme dans la signalisation ou encore dans le développement, et seraient des acteurs clés dans la régulation fine du pHi (Bethmann and Schonknecht 2009, Taylor et al 2012). Des variations de leurs niveaux d'expression ont été observées chez *P. tricornutum* en fonction de différents stress environnementaux. A ce jour aucune étude ne traite spécifiquement de la régulation du pHi chez les diatomées. De plus, sachant que la SDV est un compartiment acide (pH ~5) nous avons pensé qu'une analyse de l'évolution et la régulation de ces transporteurs à protons vacuolaires permettrait de mieux comprendre la régulation du pHi et les liens potentiellement existant avec le processus de biominéralisation. En effet, très peu d'éléments relatifs à la physico-chimie et de la SDV sont connus à ce jour. Une première étude du laboratoire avait permis de montrer qu'une inhibition de l'activité d'une des sous-unités des V-ATPase pouvait affecter le processus de biominéralisation chez la diatomée *P. tricornutum* (Vartanian et al 2009). Une autre étude, toujours du laboratoire, a permis de relier des variations du pHi à des variations de processus de biominéralisation (Herve et al 2012) L'ensemble de ces résultats suggère que la régulation du pHi pourrait avoir un rôle important dans le

processus de biominéralisation chez les diatomées et que les V-ATPases et les H⁺-PPases seraient vraisemblablement des protéines privilégiées dans la régulation de ces équilibres acido-basiques.

Les principaux objectifs de cette partie sont donc :

(1) Etudier l'évolution phylogénétique des V-ATPases et H⁺-PPases chez l'ensemble des Straménopiles dans le but de comprendre leurs origines évolutives et leurs spécificités chez les diatomées ;

(2) Analyser l'expression des H⁺-PPases en fonction de différentes conditions environnementales à partir de banques d'ESTs disponibles de *Phaedactylum tricornutum* pour mettre en évidence des variations de leurs expressions en fonction des conditions environnementales ;

(3) Localiser une sous-unité du complexe V-ATPases afin d'initier les études fonctionnelles de ces protéines chez les diatomées *P. tricornutum*.

Ce chapitre de thèse est présenté sous forme d'article intitulé "*Evolution of vacuolar pyrophosphatases and vacuolar H⁺-ATPases in diatoms*" et publié en 2014 dans le journal "*Journal of Marine Science and Technology*" (Bussard and Lopez 2014). Les gènes de *T. weissflogii* ne sont pas présentés car l'obtention du transcriptome *de novo* s'est fait après la fin de cette étude.

B. Protocole experimental

Pour réaliser cette étude, il a été nécessaire de collecter un grand nombre d'informations génétiques (séquences nucléotidiques et protéiques) relatives aux H⁺-PPases et aux V-ATPases en utilisant les bases de données du *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) et de l'*European Bioinformatics Institute* (EBI). Une fois ces informations rapatriées, nous nous sommes servis majoritairement du *Join Genome Institute* (JGI) pour trouver chez 24 algues disposant d'un génome les protéines correspondantes. Une fois la liste de H⁺-PPases et de V-ATPases complète, des alignements puis des analyses phylogénétiques ont été réalisés en utilisant le *maximum likelihood* avec 1 000 itérations en utilisant le logiciel Mega 5.2. L'arbre consensus obtenu présente les bootstrap et sa topologie nous renseigne sur l'évolution des différents transporteurs à protons vacuolaires. Pour comprendre le rôle de ces transporteurs, nous avons analysés l'expression différentielle des H⁺-PPases d'une banque d'EST de *P. tricornutum* en fonction de différents paramètres environnementaux. Par des transformations nucléaires de *P. tricornutum*, nous avons localisé une sous-unité V₀-c pour initier les premières étapes de caractérisation des V-ATPases.

L'ensemble des protocoles est détaillé dans l'article ci-après.

Evolution of vacuolar pyrophosphatases and vacuolar H⁺-ATPases in diatoms

Adrien Bussard and Pascal Jean Lopez

Article publié dans la revue *Journal of Marine Science And Technology* (2014) – 22 : 50-59

Abstract

To cope with changing environments and maintain optimal metabolic conditions, the control of the intracellular proton gradients have to be tightly regulated. Among the important proton pumps, vacuolar H⁺-ATPases (V-ATPases) and H⁺-translocating pyrophosphatases (H⁺-PPases) were found to be involved in a number of physiological processes, and shown to be regulated at the expression level and to present specific sub-cellular localizations. Studies of the role of these transporters are relatively scarce in algae and nearly absent in diatoms. Phylogenetic analyses disclose that diatoms, present both K⁺-dependent and K⁺-independent membrane integral pyrophosphatases, including proteins with high homology with a novel class of Na⁺,H⁺-PPases. Analyses of *Phaeodactylum tricorutum* EST libraries show that the gene putatively encoding a Na⁺,H⁺-PPase is over-expressed in urea adapted condition. Genome-wide investigations of the reservoir of V-ATPases encoding subunits demonstrate that diatoms present an expanded number of genes encoding for the proteolipid subunits c of the V₀ subcomplex. Preliminary localization studies show that of one V₀-c subunit is associated to the endoplasmic reticulum membrane in *P. tricorutum*. Altogether our data highlight that the combination of comparative and functional genomic approaches reach promises to provide new information into the roles of membrane proton pumps in diatoms.

Introduction

Eukaryotic cells have acquired specialized functions by creating a number of specialized membrane-bound organelles (vacuoles, endosomes, Golgi apparatus, mitochondria, plastid ...). The creation of specific membrane-bound compartments, which is part of the consequences of endosymbiotic events, might also have evolved from the need of creating distinct subcellular environments to maintain appropriate conditions for specific metabolic pathways.

In eukaryotes several proton pumps that generate H^+ electrochemical gradients in organelles create electrochemical gradients to power ATP production and to transport substances across membranes. For example, vacuolar H^+ -ATPases (V-ATPases) use ATP as energy source to translocate protons inside the organellar lumen (Forgac 2007, Fukuda and Tanaka 2006, Gaxiola et al 2007). V-ATPase comprises two domains: a cytosolic V_1 domain and a membrane V_0 domain. The large cytosolic V_1 domain, which has eight different subunits (A through H), is involved in ATP hydrolysis that is coupled to the pumping of protons into a compartment via the membrane-bound V_0 complex (common V_0 subunits are: a, c, c'', d and e) (Figure III-1).

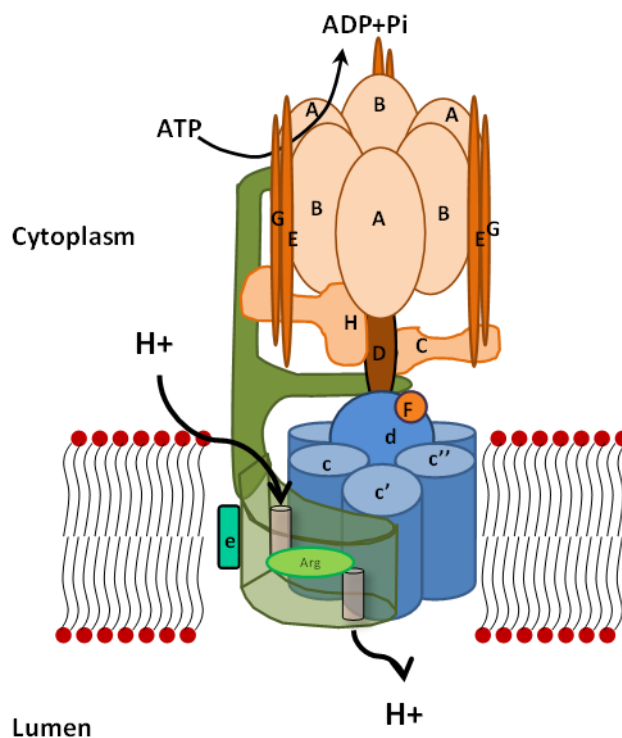


Figure III-1: Structure of the V-ATPase complex. In most organisms, the V-ATPase complex is composed by two subcomplexes: V_1 which is composed by 8 subunits from A to H localized in the cytoplasm, and V_0 which is integrated in the plasmic membrane. The V_0 complex contains a hexameric ring of the proteolytic subunits (V_0 -c, V_0 -c' and V_0 -c'') completed by the proteins V_0 -a, V_0 -d and V_0 -e.

Intracellular V-ATPases play important roles in normal physiological processes such as receptor-mediated endocytosis, intracellular membrane trafficking, pro-hormone processing, protein degradation, and to couple uptake and release of ions and metabolites (Toei et al 2010). V-ATPases also pump protons across the plasma membrane into the extracellular space in a variety of specialized cells, including some kidney cells, specific epididymis cells or osteoclasts (Jefferies et al 2008). The identification of V-ATPases in cells presenting an invasive phenotype, is thought to be important for the development of novel therapeutic approaches to treat cancer metastasis (Nishisho et al 2011). A related family to these proton transporters has been found on the membrane of bacteria (Yokoyama and Imamura 2005). Even if prokaryotic V-ATPases are made up of a simpler subunit composition than the eukaryotic enzymes, each subunit shows significant sequence similarity to its eukaryotic counterpart (Yokoyama and Imamura 2005).

In addition to the V-ATPase, a second type of endomembrane proton pumps, the H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase), use the energy of hydrolysis PPI to translocate H⁺ across membranes. H⁺-PPases are divided into two subfamilies, the type I corresponds to the K⁺-dependent and the type II to the K⁺-independent. The K⁺-dependent proton pumps were also shown to transport sodium (Luoto et al 2011). More recently, a subclade of prokaryotic type I, were shown to simultaneously transport both sodium and proton (H⁺,Na⁺-PPases) (Luoto et al 2013). In *Arabidopsis thaliana*, a K⁺-dependent isoforms were shown to be localized at the vacuolar membrane and therefore be involved in lumen acidification, and K⁺-independent isoforms to the Golgi apparatus and the trans-Golgi network (Segami et al 2010). Vacuolar H⁺-PPase also appears to be involved in auxin-dependent organ development (Fukuda and Tanaka 2006, Li et al 2005), and in resistance against stresses (Gaxiola et al 2007, Zhang et al 2011). It was also suggested that H⁺-PPase activity contribute to the regulation of the internal pH of acidocalcisomes that are electron dense organelles conserved in eukaryotes, and involved in the storage of cations and phosphorus (Docampo and Moreno 2011). Membrane embedded PPases might also contribute to the regulation of the cellular pH of both Bacteria and Archaea (Serrano et al 2004).

Despite the multiple physiological roles played by V-ATPases and H⁺-PPase detailed studies in algae have been limited. In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* both pyrophosphatases and V-ATPases have been shown to be localized at the plasma membrane (Robinson et al 1998) and in polyphosphate vacuoles fractions of the vacuole (Ruiz et al 2001). V-ATPase activity was found to be associated to the function of the contractile vacuoles in the green alga *Scherffelia dubia* (Becker and Hickisch 2005). The role of vacuolar proton pumps was investigated in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis* (Meng et al 2011). In the red alga *Cyanidioschyzon merolae* V-ATPases and H⁺-PPase were identified among the 32 proteins from a fraction largely enriched in vacuoles (Yagisawa et al 2009). However, the role of these transporters has been rarely investigated in brown microalgae or macroalgae. It was only recently that

a first role for a V-ATPase in copper detoxification was proposed in the macroalgae *Fucus vesiculosus* (Morris et al 2014).

Diatoms are unicellular photoautotrophic eukaryotes that can dominate marine and freshwater microalgal communities, and believed to be responsible for 20% of global carbon fixation on Earth, and thus play important roles as primary producers (Falkowski et al 2004, Field et al 1998, Riebesell 2000, Smetacek 1999). Diatoms that are members of the supergroup of Chromalveolates (including Heterokonts, Cryptophytes, Haptophytes and Alveolates), are secondary symbionts, thought to derive from the engulfment by a heterotrophic eukaryote host cell of a red alga (Cavalier-Smith 2002, Keeling 2010). The sequencing of a number of diatom genomes, including the centrics (cell with radial symmetry) *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al 2004, Koester et al 2013) and *T. oceanica* (Lommer et al 2012), and the pennates (cell with bi-lateral symmetry) *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler et al 2008), *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *Fragilariopsis cylindrus*, is revealing the chimeric nature of their genomes, with a number of genes found from green or red algal origin but also from prokaryotic origin. In complement to the genome information, gene transformation techniques have been developed for several species (Miyahara et al 2013, Muto et al 2013, Zaslavskaja et al 2000) and gene silencing using RNA interference is becoming an important techniques for functional analyses (Allen et al 2011, De Riso et al 2009, Huysman et al 2013, Lavaud et al 2012), opening up the possibilities to perform functional studies in diatoms.

To better understand the role of membrane proton transporters, we report a genome-wide survey of the V-ATPase and H⁺-PPase gene families in diatoms, and compare the gene reservoir to other algae and Stramenopiles. We also analyzed EST databases in *P. tricornutum* and found that membrane-integral pyrophosphatases present differential expression pattern depending on growth conditions. In this diatom species we also report the first localization of a member of the V0-c subunit to the ER-membrane.

Material and methods

Cell culture

Culture of *Phaeodactylum tricornutum* strain used corresponds mainly to the oval morphotype, and is available at the Algae Culture Collection of Göttingen University (strain 1090-1a). Cells were grown at 19°C in an enriched artificial sea water media (Vartanian et al 2009), 75 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity, and under a light:dark regime of 12h:12h.

Plasmid construction and diatoms transformation

To clone the gene encoding for a V0-c subunit, total RNAs were extracted using Trizol (Invitrogen), treated with DNase I (Biolabs), and then reverse amplified using Superscript III (Invitrogen), according to the protocols from the manufacturer. The cDNA was amplified using high fidelity pfx DNA polymerase (Invitrogen). The specific primers used for the V₀-c gene are: (5'-CCGGAATTCAACATGAGTGTGCGAAATGGAACTTGCCCGG-3') and (5'-GCTCTAGAGCCGTTGTTCCCCTCGCACACGAACGAGTTC-3'). The amplified DNA fragment was first purified and then cloned in frame with EGFP gene into a pPTEGfp plasmid (Zaslavskaja et al 2000). In the resulting construct the transgenic gene is under the control of a *fcpA* promoter, and the resistant gene *sh ble* used for selection is under *fcpB*. After transformation by tungsten microparticle bombardment at 1550 psi (Bio-Rad Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System) the desired transgenic diatoms were replated with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of phleomycin, following described protocols (Apt et al 1996). Since the integration of plasmid was stable over time, the cultures of transgenic cell lines were maintained without selection. The transgenic strain expressing the BiP:EGFP chimeric protein was kindly provided by Dr. P. Kroth (Apt et al 2002), and was maintained in appropriate condition to favor the transition from fusiform to oval morphotype.

Image acquisition

Images were obtained with a Leica DM-IRB microscope as previously described (Descles et al 2008). The set of filters used for GFP were 485 \pm 25 nm excitation (Ex) and 535 \pm 30 nm emission (Em), and for the chlorophyll fluorescence signal we used 485 \pm 25 nm (Ex) and 675 \pm 50 nm (Em). Image analyses were

performed using a combination of software including Metamorph software 7.5 (Molecular Devices), Fiji, and Amira 5.1. All the presented images correspond to Z-D projections.

Collection of sequences and *in silico* analyses

Cyberscreening for pyrophosphatase and V-ATPases was performed using National Center of Biotechnology Information and European Bioinformatics Institute databases with basic local alignment search tools (tblastn, blastp, blastn). For the 24 algae and Stramenopiles species studied in more details, the gene/protein searches were performed at the specific genome browsers from DOE Joint Genome Institute (genome.jgi-psf.org) or the Phytozome 7.0 (www.phytozome.net). The proteins identification number (ID) were retrieved from *Aureococcus anophagefferens* (V1.0), *Phytophthora capsici* (V11), *Phytophthora ramorum* (V1.1), *Phytophthora sojae* (V1.1), *Aplanochytrium kerguelense* PBS07 (v1.0), *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381 (v1.0), *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209 (v1.0), *Guillardia theta* CCMP2712 (V1.0), *Volvox carteri* (V1), *Ostreococcus lucimarinus* (V2.0), *Ostreococcus* RCC809 (V2.0), *Ostreococcus tauri* (V2.0), *Bigeloviella natans* CCMP2755 (V1.0), *Micromonas pusilla* CCMP1545 (V2.0), *Chlorella* sp. NC64C (V2.0), *Coccomyxa* sp. C-169 (V2.0), *Micromonas* sp. RCC299 (V3.0), *Emiliana huxleyi* CCMP1516 (V1.0), and the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* (V2.0), *Thalassiosira pseudonana* (V3.0), *Pseudo-nitzschia multiseriata* (v1.0), and the haploid models of *Fragilariopsis cylindrus* (V1.0). The search for genes in the unicellular red algae *Cyanidioschyzon merolae* was performed at merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp, and for the diatom *Thalassiosira oceanica* at bose.geomar.de/cgi-bin/gbrowse/Toceanica. For proteins, for which the gene models were considered to be incomplete, manual editing of the models were performed. When no model was present, the search was repeated as tblastn search against the entire genomes, using a low stringent *E*-value $>1e^{-3}$; if no gene model could be predicted we refer to a missing gene in Table I. For phylogenetic analyses the maximum likelihood (ML) topology was computed using Mega 5.2 (Tamura et al 2011) based on the JTT matrix-based model (Jones et al 1992). Non-parametric bootstrap support was estimated from 1,000 iterations. In addition, the tree topology was compared to the ones obtained from Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987).

Detailed data for over 130,000 ESTs from *P. tricornutum* and the description of the conditions used to derive the 16 libraries are available at diatomics.biologie.ens.fr/EST3/est3.php (Maheswari et al 2010).

Results and Discussion

Evolution of membrane-integral pyrophosphatases in diatoms

Membrane embedded H⁺-PPase uses PPI as its energy source in the generation of proton gradients, and corresponds to a single highly hydrophobic polypeptide believed to function as homodimers (Gaxiola et al 2007, Kellosalo et al 2012, Lin et al 2012, Martinoia et al 2007). Based on phylogenetic analyses and biochemical evidences, H⁺-transporting pyrophosphatase were divided into K⁺-dependent and K⁺-independent subfamilies (Belogurov and Lahti 2002, Gaxiola et al 2007, Luoto et al 2011, Malinen et al 2007, Perez-Castineira et al 2001), but both types require Mg₂⁺ as a cofactor. Site direct mutagenesis experiments revealed that modification of single residue, a change of an Ala residue in position 460 of the bacterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* into Lys, abolish the potassium dependence (Belogurov and Lahti 2002). Some K⁺-dependent PPases were shown to function as Na⁺-pumps (Luoto et al 2011, Malinen et al 2007), and the specificity to work as a H⁺- or as a Na⁺-pump involved specific Glu residues in the trans-membrane domains 5 and 6 (Luoto et al 2011). More recently it was shown that a subfamily of PPases, named Na⁺-H⁺-PPases, are capable of transporting both Na⁺ and H⁺ ions in a non-competitive manner (Luoto et al 2013).

Table III-I: Overview of Pyrophosphatases and V-ATPases gene families in green, red and brown algae in other Stramenopiles.

Phylum	Species	Genome (Mb)	V-PPases		V-ATPases												
			K ⁺ -dep.	K ⁺ -ind.	V ₀ -subunits					V ₁ -subunits							
					a	c	c''	d	e	A	B	C	D	E	F	G	H
Stramenopiles/ Diatoms	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	26	1+1	1	1	8	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	<i>Fragilariopsis cylindrus</i>	81	1+1	0	6	6	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	4
	<i>Pseudo-nitzschia multiseriata</i>	219	1+1	0	4	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	31	1+1	0	1	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	<i>Thalassiosira oceanica</i>	82	1	0	1	2	1	1	NF	1	1	2	2	1	1	1	3
Stramenopiles/ Pelagophytes	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	57	1+1	1	1	1	1	1	1*	1	1	1	1	1	1	1*	2
Stramenopiles/ Labyrinthulomycetes	<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	35.8	3+0	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	60.9	3+0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	41	3+0	1	1	2	NF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Stramenopiles/ Oomycetes	<i>Phytophthora capsici</i>	56	1+0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Phytophthora ramorum</i>	65	1+0	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Phytophthora sojae</i>	95	1+0	1	1	2*	1	1	1	2 [#]	1	1	1	1	1	1	1
Rhizaria/ Cercozoa	<i>Bigeloviella natans</i>	95	3+1	1	4	2	1	1	1*	1	1	1	1	1	1	NF	1
Haptophyceae/ Isochrysidales	<i>Emiliana huxleyi</i>	168	5+1	0	4	6	2	1	2*	1	1	1	2	1	1	2	1
Cryptophyta/ Pyrenomonadales	<i>Guillardia theta</i>	87.2	3	2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Viridiplantae/ Chlorophytes	<i>Chlorella variabilis</i> NC64A	46	1+0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	49	1+0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Micromonas pusilla</i>	22	2+0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NF	1
	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	21	2+0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	13	1+1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Ostreococcus</i> sp. RCC809	13	1+1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Ostreococcus tauri</i>	12	1+1	1	1	2	1	2 [#]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Volvox carteri</i>	138	1+0	0	2	1	1	1	NF	1	1	1	1	1	1	1	1
Rhodophytes	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	17	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

The # refers to incomplete gene sequence information, * to a gene(s) that was not annotated, and NF to a gene that could not be found using blastp or to blastn search engine and a set of proteins from different phylum.

To gain more information on the evolution of the membrane pyrophosphatases family in diatoms, we conducted a genome-wide survey from five species for which the complete genome is available: *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler et al 2008), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al 2004), *Fragilariopsis cylindrus*, *Pseudo-nitzschia multiseriata*, and *T. oceanica* (Lommer et al 2012). The results are compared with data obtained from green or red unicellular algae and Chromalveolate species for which the full-genome sequence is available. The full dataset comprised 9 Chlorophytes algae (3 fresh water species: *Chlorella* NC64A, *Coccomyxa* sp.C-169, and *Volvox carteri*, 5 marine species: *Micromonas pusilla*, *Micromonas* sp. RCC299, *Ostreococcus speciosus*, *Ostreococcus lucimarinus* and *Ostreococcus* RCC809, and the coastal lagoon *Ostreococcus tauri*), 10 Stramenopiles (the 5 above-mentioned Diatoms, the three Oomycetes *Phytophthora capsici*, *P. ramorum*, and *P. sojae*, the Labyrinthulomycetes *Aplanochytrium kerguelense*, *Aurantiochytrium limacinum*, *Schizochytrium aggregatum*, and the small marine non-motile Pelagophyte *Aureococcus anophagefferens*), one Rhodophyte (the hot-spring alga *Cyanidioschyzon merolae*), one Haptophyte (the Coccolith *Emiliania huxleyi*), one Cryptophyte (the small marine alga *Guillardia theta*), and one Rhizaria (the marine Chlorarachniophyte flagellate *Bigelowiella natans*). The number of gene encoding for membrane-integral pyrophosphatases was found to be small all species, with a maximum of 6 genes in the haploid genome of *E. huxleyi*, and a single gene in *C. merolae* (Table III-I).

Interestingly, all the analyzed organisms contain at least one gene encoding for a putative enzyme of each types of pyrophosphatases, with the exception of the unicellular red alga *C. merolae*, that presents a single gene that encodes a K⁺-independent enzyme. To understand whether all red algae present only one type of pyrophosphatase or whether this is a consequence of the highly reduced genome of *C. merolae*, we search for putative K⁺-dependent candidates using available ESTs information. Sequences that present the determinants of K⁺-independent enzymes could be found in the unicellular red alga *Galdieria sulphuraria* (contig_849_Oct13_2005:g33.t1 ; <http://dbdata.rutgers.edu/dragon/>) or *Porphyridium cruentum* (GenBank: HS789509.1). However, ESTs corresponding to K⁺-dependent enzymes could be found in the unicellular alga *Porphyridium purpureum* (HS853118.1), *Cyanidium caldarium* (CAH58649.1), and from the foliose red alga *Porphyra yezoensis* (CAD24772.1). Our data reveal that the two subfamilies of H⁺-PPases are likely to be present in all algae lineages.

To further understand the evolution of PPases in diatoms, we constructed a Bayesian phylogeny of the protein superfamily using a subset of 65 proteins that includes most of the genes found in the diatoms lineage (Figure III-2). The phylogeny reveals the existence of several clades within the K⁺-dependent subfamily, and demonstrates that putative proteins from several diatoms and other algae fall into a separate clade, that correspond to the Na⁺,H⁺-PPase subfamily (Figure III-2, and data not shown). Na⁺,H⁺-

PPase subfamily has been proposed to have evolved from bacterial Na^+ -PPases (Luoto et al 2013). In such scenario, the presence of prokaryotic-like Na^+ , H^+ -PPases in the genome of several microalgae from different lineages suggests independent acquisition of genes from bacterial origin.

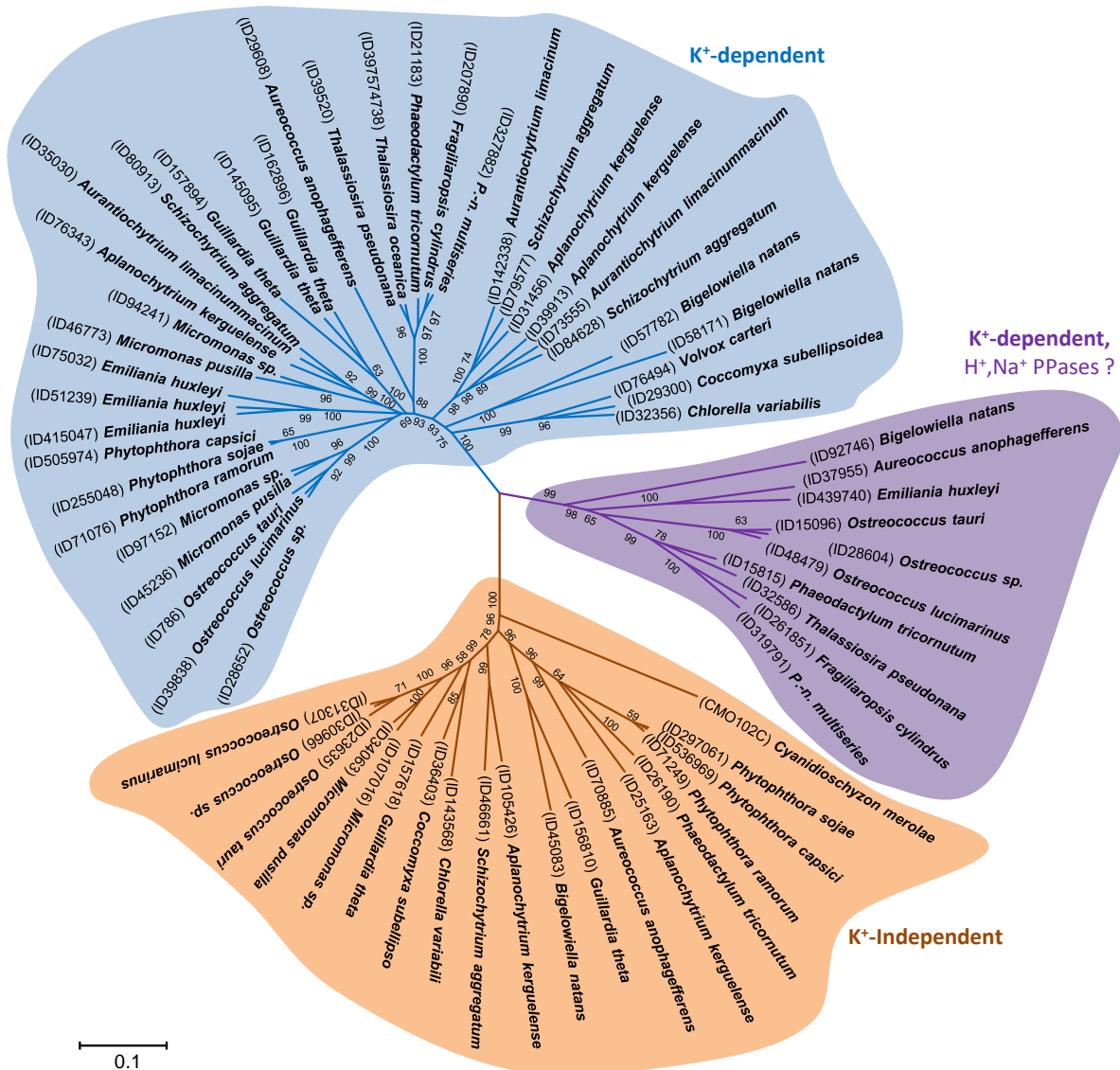


Figure III-2: Maximum Likelihood best tree of K⁺-dependent and K⁺-independent pyrophosphatases. The presented data correspond to a subset of 65 proteins sequences (24 taxa), and the phylogeny corresponds to 474 amino acid aligned residues. For clarity reason only the bootstrap values above 50 % (1000 replicates) are presented. The protein reference (JGI protein IDs or GenBank accession number) follows the name of the organisms. The scale bar shows the correspondence between branch length and rate of amino acid substitution per site.

Alternatively, it can be proposed that this subfamily of K⁺-dependent PPases might have an ancient green algae origin and have been transferred into the genome of Chromalveolates. This latest hypothesis also implies that Na⁺, H⁺-PPase encoding genes have been independently lost in several green algae and Chromalveolates (for discussion of green algae genes in the Chromalveolates see (Dorrell and Smith 2011, Keeling 2010, Nosenko and Bhattacharya 2007) and references therein). In future, it will be important to perform biochemical studies to test the intriguing possibility that diatoms, and several microalgae species, present membrane-integral pyrophosphatases capable of transporting sodium and

proton ions.

Expression pattern of membrane-integral pyrophosphatases under different physiological conditions in *P. tricornutum*

The expression of H⁺-PPases genes in the pennate diatom *P. tricornutum*, was analyzed using available ESTs information that were generated to explore the responses to a range of growth conditions including several nutrient regimes of Si, N, Fe, and dissolved inorganic carbon (DIC), stresses (hyposalinity or low temperature), blue light, cells exposed to aldehyde decadienal, and from different morphotypes (Maheswari et al 2010).

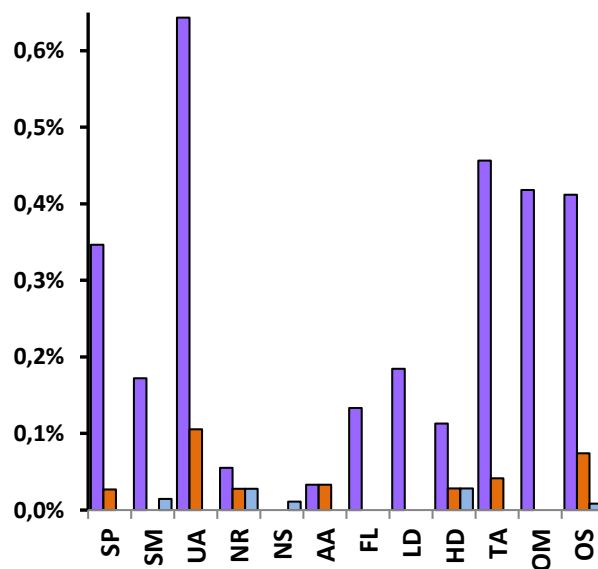


Figure III-3: Expression levels of the genes encoding for membrane pyrophosphatases in *P. tricornutum*. Histograms showing the expression levels of the K-dependent (ID 26190) in blue, K-dependent Na⁺/H⁺ (ID 15815) in purple and K-independent (ID 21183) in orange. The expression levels of each gene in the different libraries were normalized by the libraries size. Abbreviations for library conditions are: Silica plus (SP), Silica minus (SM), Urea adapted (UA), Nitrate repleted (NR), Nitrate starved (NS), Ammonium adapted (AA), Iron limitation (FL), Low decadienal (LD), High decadienal (HD), Tropical accession (TA), Oval morphotype (OM) and Old library (OS).

Analysis of the expression levels over the 16 libraries reveals that compared to the K⁺-independent PPases (ID 26190) the two genes encoding K⁺-dependent PPases, ID 21183 and ID 15815, were 6 times and 56 times more expressed, respectively. The highest expression of these two latest genes was found to be in the urea adapted condition, with 55 and 9 ESTs for the genes ID 21183 and ID 15815, respectively (Figure III-3). The existence of a functional ornithine-urea cycle (OUC) in Stramenopiles was first deduced from genomes analysis (Armbrust et al 2004, Bowler et al 2008). Later it was demonstrated that the OUC serves as a distribution and repackaging hub for inorganic carbon and nitrogen in *P. tricornutum* (Allen et al 2011). Even if the ion selectivity and the physiological roles of membrane pyrophosphatases still have to be investigated in diatoms, it will be particularly interesting to test for their contribution in nutrient-use efficiency and in adaptation to abiotic stresses such as salinity or acidification.

Evolution of V-ATPases

The V-ATPase is a large multi-subunit complex, composed by two functional domains, V_1 and V_0 . V_1 is composed of eight different subunits in a stoichiometry of $A_3B_3CDE_3FG_3H$ and is located on the cytoplasmic side of the membrane (Kitagawa et al 2008) (Figure III-1). The V_1 domain corresponds to the rotary domain that houses the catalytic ATP binding sites, whereas proton translocation occurs through the membrane integral V_0 domain (Figure III-1). The V_0 domain is composed of six different subunits, with a stoichiometry of $ac_4c'c''de$ in the yeast (Graham et al 2000). Detailed expression analyses have shown that subunit isoforms might result from alternatively spliced. Completion of several genome projects also revealed that they can be encoded by multiple genes. Genome-wide survey of V-ATPase genes identified 15 genes in *Saccharomyces cerevisiae* (Kane 2006), 33 genes in *Drosophila melanogaster* (Allan et al 2005), and 26 genes in *Arabidopsis thaliana* (Sze et al 2002). More recently, the conservation of genes encoding V-ATPase subunits from 17 different higher plants and from the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* revealed that the total number of genes identified ranges from 54 in the soybean Glycine max (its genome size is estimated to be 1.1 Gb (Schmutz et al 2010)) to 14 in *C. reinhardtii* (Schumacher and Krebs 2010).

With a few exception of the V_1 subunit G (V_1 -G) subunit in *Micromonas pusilla* and *Bigelowiella natans*, the V_0 subunit e (V_0 -e) in *Volvox carteri* and *T. oenica*, and V_0 -c'' in *Schizochytrium aggregatum*, the 13 subunits were identified in the 24 genomes analyzed (Table III-I). The analyses of the chromosomal localization of the V-ATPase genes in different algae and Oomycetes reveal that several orthologous genes might have arisen by tandem or segmental duplication (not shown). In yeast the V-ATPase proteolipid subunits c, c' and c'' have been shown to be homologous to each other and to the F-ATPase subunit c, from which they appear to have been derived by gene duplication (Hirata et al 1997, Mandel et al 1988). Segmental duplication of regions of the chromosome encoding for V_0 subunits have been, for example, reported in *A. thaliana* (Sze et al 2002) or in *D. melanogaster* (Jefferies et al 2008). Evidence for duplication of genes in the same chromosome segment were found for one V_0 -c gene in *P. sojae*, one gene in *E. huxleyi*, one in *T. pseudonana*, two in *P. tricornutum* and in *F. cylindrus*, and for one V_0 -a gene in *F. cylindrus*. For several of the V_0 -c genes from diatoms, we found evidences for recent tandem duplications; two genes were considered to be the result of a tandem duplication when the distance between the paralogous gene pairs was below 1 kb. For example, the calculated protein identity between duplicated V_0 -c was high and vary between 54% (106/195 aminoacids; comparing *P. tricornutum* proteins ID 15145/ID 22609), 98% (167/170; for *F. cylindrus* proteins ID 205176/ID 267224) and 100% (170/170; ID 21882/ID 29011, and 171/171; *T. pseudonana* proteins ID 39417/ID 2233). During evolution duplicate genes are retained because the redundancy conferred by the duplicate genes

might facilitate species adaptation, genetic robustness against null mutations, or to obtain subfunctionalization or new functions. We found that the V₀-c genes family was particularly enriched in diatoms, compared to the other genomes analyzed here (Table III-I). Bayesian phylogeny of the proteolipid subunit reveals that diatoms possess a single copy of the subunit V₀-c'' and several copies of the V₀-c type (Figure III-4).

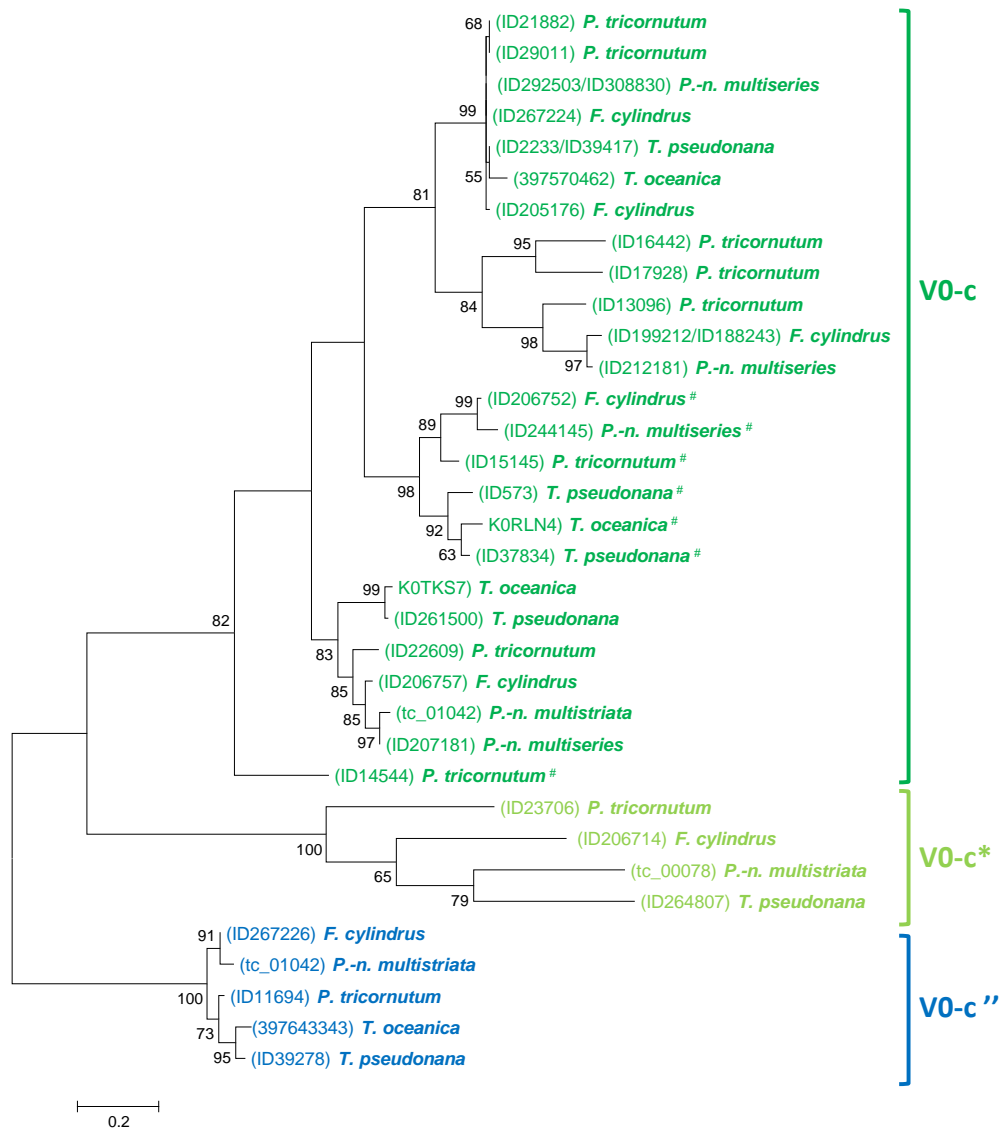
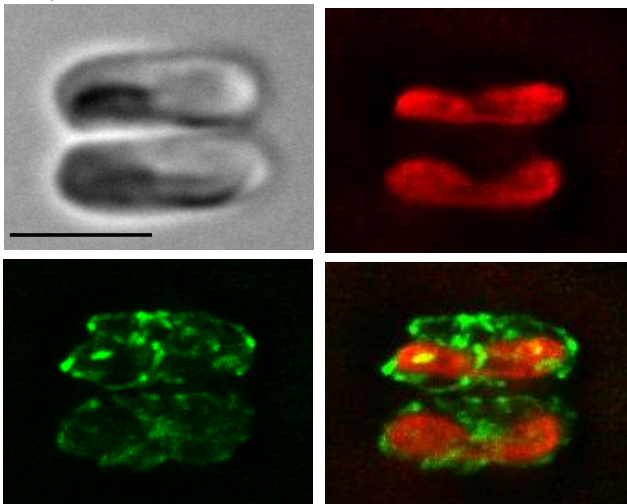


Figure III-4: Molecular phylogenetic analysis of V₀-c and V₀-c'' subunits families in diatoms. The Maximum Likelihood, based on the JTT matrix-based mod-el, analysis involved 34 sequences, with a total of 133 amino acid positions in the final dataset. Bootstrap values above 50% (1000 replicates) are indicated at the corresponding nodes. The # indicates protein sequences that present in the fourth trans-membrane domain a substitution of the glutamic residue shown to be important for H⁺ transport. The scale bar represents the branch length corresponding to 0.2 substitution/site.

Using the presented dataset we also found that diatoms proteolipid subunit can be phylogenetically classified into three major clades (Figure III-4) (such result was confirmed using a larger set of 485 sequences; not shown). Surprisingly, we also found that some V₀-c and V₀-c* subunits present

substitution of the conserved glutamic acid residue (*Saccharomyces cerevisiae*, VMA3 Glu137 or VMA11 Glu148) whose carboxyl side chain was shown to be important for proton transport activity (Hirata et al 1997) (Figure III-4); suggesting that some of the diatoms genes might be pseudogenes, or that new amino acid residues, yet unknown, contribute to protons transport. In future, comparative protein structure modeling might help to gain new information on the structure of the “divergent” V_0 -c* subunits found in diatoms.

V_0 -c:EGFP



Subcellular localization of a V_0 -c proteolipid subunit in *P. tricornutum*

Over the last decades, studies in a number of model organisms, from yeast to flies or higher plants, have shown that V-ATPases are important regulators in energizing secondary active transport and in membrane trafficking. It was also demonstrated that different V_0 et V_1 subunits can present specific subcellular localization, show tissue-specific expression, respond to environmental stresses or be expressed at different developmental stages (for reviews see: (Jefferies et al 2008, Lee et al 2010, Schumacher and Krebs 2010, Toei et al 2010)).

In a first attempt to characterize V-ATPases in *P. tricornutum*, one gene encoding for a V_0 -c subunit (ID 29011) was fused to EGFP and the corresponding transgenic line was analyzed for subcellular localization. Localization studies show that V_0 -c:EGFP accumulates in a network of membranes traversing the entire length of the cell (Figure III-5, upper panel); that was likely to

correspond to the endoplasmic reticulum. Indeed, the localization of V_0 -c was found to be very similar to the one of the ER-localized chaperone BiP (compare Figure III-5 upper and lower panels). We are

Figure III-5: Localization of the V_0 -c and BiP in the endoplasmic reticulum of *P. tricornutum*. Accumulation of a chimeric protein V_0 -c:EGFP (upper panel) or BiP:EGFP (lower panel) in the endoplasmic reticulum (ER). The images correspond to the Nomarski image, the chlorophyll auto-fluorescence (red), the GFP fluorescence (green), and the merged channel. The scale bars represent 5 μ m.

convinced that further localization studies coupled to functional analyses are becoming very important to decipher the role of the different V-ATPase paralogous genes in diatom.

Concluding remarks and future directions

V-ATPase and H⁺-PPases which are ubiquitous proton pumps were shown to be essential to acidify intracellular compartments, to transport protons across the plasma membrane, to be implicated in response to salt stress, to be required for full activation of the PKA pathway in response to glucose, and to be implicated in vesicular trafficking and membrane fusion. We believe that these important roles found in various organisms correspond to a vast source of inspiration to design informative experiments in algae.

Based on the results presented here, we propose that future researches should focus on three topics: (i) the expression of the different V-ATPase subunits and H⁺-PPases in response to stress, to nutrient availability or in adaptation to ocean acidification; (ii) for the membrane integral pyrophosphatases, biochemical characterization of their catalytic activity are required to understand whether these genes confer an advantage in acclimation and adaptation to the marine environments; (iii) more investigation should also be made in the elucidation of the localization of the different V-ATPases subunits in diatoms. Subcellular localization of V₀-c isoforms may demonstrate specific localization linked to the particular endomembrane system found in diatoms and in other Heterokonts. V-ATPases have been shown to be active at the Coccolith vesicle membrane of *Pleurochrysis*, and proposed to play a role in calcification (Araki and Gonzalez 1998, Corstjens et al 2001). It will therefore be very interesting to further localize V-ATPases subunits in diatoms, and to study their expression during the course of frustule formation.

Acknowledgements

This work would not have been possible without the central contribution of Mathieu Vartanian and the support of Michelle Quinet. This research was funded by the CNRS program “PEPS: Projets Exploratifs”, the Institut Ecologie et Environnement, and the ATMs “Formes possibles, formes réalisées”, “Biominéralisation” and “Microorganismes” from the MNHN.

Evolution des transporteurs à protons vacuolaires chez les diatomées

Les pompes à protons vacuolaires telles que les H⁺-PPases et les V-ATPases sont impliquées dans de nombreux métabolismes comme la régulation du pHi et pourraient avoir un rôle important dans le processus de biominéralisation chez les diatomées. Les diatomées possèderaient des H⁺-PPases dépendantes ou indépendantes au potassium dont certaines protéines auraient une forte homologie avec des H⁺,Na⁺-PPases procaryotiques qui seraient capables de transporter du sodium et des protons. Ces H⁺,Na⁺-ATPases seraient davantage surexprimées que les autres H⁺-PPases en fonction des conditions environnementales. Contrairement aux autres algues vertes, rouges et brunes étudiées ici, les diatomées tendent à présenter un nombre de sous-unité V_o-c des V-ATPases plus important pouvant être attribué à des événements de duplication. L'analyse phylogénétique des séquences de V_o-c tend à présenter trois sous-clades (V_o-c, V_o-c'' et V_o-c*) posant des hypothèses quant à leurs évolutions et leurs rôles fonctionnels.

Chapitre IV

Réponse couplée au pH et à la salinité de deux espèces de *Thalassiosira* écologiquement éloignées

A. Contexte

Toutes les microalgues possèdent des capacités d'acclimatation différentes en fonction de leur tolérance et de leurs prédispositions initiales. Ces différences doivent contribuer à la répartition différentielle de certaines microalgues dans les différents écosystèmes aquatiques (Brand 1984, Kirst 1990). Parmi ces organismes photosynthétiques, les diatomées possèdent des capacités d'adaptation et d'acclimatation remarquables qui leur ont permis de dominer toutes les autres microalgues au cours de l'évolution. La présence conjointe d'une vacuole, d'un frustule ou encore d'un double mécanisme de concentration du carbone n'est pas étrangère à ce succès (Kooistra et al 2007).

Cependant chaque espèce de diatomée possède des spécificités conditionnant sa répartition écologique. Différents écotypes d'une même espèce de diatomée peuvent également présenter des différences de tolérances à différents facteurs (Roubeix et al 2014). Par exemple, une étude a proposé que la diatomée côtière *T. weissflogii* et la diatomée océanique *T. oceanica* n'ont pas les mêmes capacités de réponses à une carence en fer. *T. oceanica*, vivant dans les grands gyres océaniques où la concentration en fer est très faible, possède une architecture photosynthétique particulière lui permettant de s'adapter à cette carence. Cette acquisition n'est pas retrouvée chez *T. weissflogii* (Strzepek and Harrison 2004). Même si les études comparatives de ce type sont relativement peu nombreuses, il existe à notre connaissance aucune étude comparative s'intéressant aux processus d'acclimations à plusieurs facteurs couplés à moyen-terme. Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, nous avons choisi d'étudier la réponse de *T. weissflogii* et *T. oceanica* à un couplage pH/salinité. La salinité et, dans une bien moindre mesure, le pH sont deux facteurs abiotiques pouvant varier dans les écosystèmes côtiers alors qu'ils sont plus stables dans les écosystèmes océaniques. Sachant que le processus de biominéralisation semble être dépendant du pH (Herve et al 2012) et que les transporteurs de silicium (SIT) sont des cotransporteurs SiOH_4 et Na^+ , nous avons porté une attention toute particulière sur le pH, le métabolisme du silicium et le processus de biominéralisation.

Les principaux objectifs de ce chapitre sont de :

(1) Mettre en évidence les effets du couplage pH/salinité sur la croissance et la physiologie de *T. weissflogii* et *T. oceanica* pour en dégager les capacités d'acclimatations de ces 2 souches ;

(2) Mesurer le pH cytosolique *in vivo* et relier ces variations à la cinétique de processus de biominéralisation ;

(3) Analyser la réponse transcriptomique de *T. weissflogii* et *T. oceanica* pour en déterminer les capacités de tolérance spécifique et commune.

Les premiers résultats de cette étude sont présentés sous la forme "Résultats puis Discussion".

B. Protocole experimental

Pour mettre en évidence les processus d'acclimatation de *T. weissflogii* (CCMP 1051) et *T. oceanica* (CCMP 1005), nous avons placé ces deux souches pendant 10 semaines dans un milieu artificiel stérile selon 3 combinaisons de pHe (7,7, 8,1 et 8,5) et 3 salinités (21, 28 et 35 psu). Chaque culture a été repiquée hebdomadairement en contrôlant systématiquement la valeur du pHe et de la salinité du milieu neuf. Cette étape de vérification a également été réalisée avant toutes expérimentations pour bien s'assurer de la stabilité des paramètres étudiés.

A partir de *T. weissflogii* et *T. oceanica*, nous avons analysés la réponse physiologique (croissance, métabolisme du silicium et l'homéostasie du pHi), la morphologie des valves, la cinétique du processus de biominéralisation et le transcriptome. Tous les protocoles utilisés sont décrits de manière exhaustive dans les **Méthode d'analyses**. Les informations ci-dessous permettent de recentrer les différents protocoles sur cette étude et comprendre la démarche expérimentale.

1. Mesure du métabolisme du silicium, purification des valves et extraction ARN

Afin de palier à tout biais expérimentaux, nous réalisons la quantification des différentes fractions du métabolisme du silicium, la purification des valves et l'extraction ARN au même moment et à partir d'une même culture de 150 mL en phase exponentielle. Les mesures journalières de la densité cellulaire pour estimer le taux de croissance sont réalisées à partir de ces cultures. Ces analyses sont toutes réalisées en triplicat biologique.

Pour l'étude du métabolisme du silicium, 10 mL sont prélevés et les fractions de Sii et BSi sont extraites et quantifiés. Deux répliques techniques sont réalisés par réplikat biologique.

La purification des valves a été réalisée à partir de 10 mL de culture. Une fois purifiées, les valves sont observées au MET (8 000X ou 10 000X). Les différentes images sont analysées grâce au logiciel ImageJ et des scripts R. Au total 324 images de valves ont été analysées. Pour les analyses nanoscopiques des valves de *T. weissflogii*, 180 images de valves supplémentaires, acquises à plus gros

grossissement (60 000X), sont analysées par un script Matlab développé en collaboration avec le docteur Julien Derr (Université Paris-Diderot).

Les ARN totaux de chaque condition sont extraits simultanément en double et rassemblés une fois l'étape de purification terminée. Sur ces ARN, des études RNA-Seq sont réalisées après séquençage par la technologie Solexia/Illumina en single-end 50 pb.

2. Mesure du pH cytosolique

Même si les mesures du pHi restent assez difficiles techniquement et fastidieuses, elles sont réalisées en duplicat grâce à la sonde fluorescente BCECF-AM. Au total entre 30 et 45 cellules ont été analysées par condition. Les gammes *in situ*, qui permettent de relier les variations d'intensité de fluorescence à une valeur de pH, sont obtenues pour *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Ces deux gammes présentent des caractéristiques différentes car les temps d'acquisition de la fluorescence sont différents pour les deux espèces (Annexe A-2, page 244).

3. Tentative de mesure du pH vacuolaire

Pour relier les variations de pHi avec celle du pH vacuolaire (pHv), nous avons tenté d'appliquer aux diatomées un protocole de mesure *in vivo* du pHv emprunté aux levures et qui utilise la sonde fluorescente 6-CFDA. Pour s'assurer de notre maîtrise de ce protocole, nous l'avons d'abord testé sur une souche de levure (BY 4742) comme contrôle positif. La diatomée *P. tricornutum* ayant une organisation intracellulaire beaucoup plus simple que *T. oceanica* et *T. weissflogii*, notamment avec deux larges vacuoles positionnées de part et d'autre du noyau, nous l'utilisons pour tester la spécificité du marquage du 6-CFDA.

4. Cinétique de formation du frustule

Pour déterminer l'impact du couplage pH/salinité sur le processus de biominéralisation, nous avons adapté une technique permettant de quantifier la cinétique de formation de la valve *in vivo* décrite par Herve *et coll.* (Herve et al 2012) mais avec un nouveau fluorophore : le NBD-N2 (Annenkov et al 2010). En réalité plusieurs sondes fluorescentes ont été testées et comparées avant de faire un choix. Différents contrôles ont été effectués sur le NBD-N2 pour vérifier sa bonne adéquation avec cette analyse comme l'indépendance de l'intensité de fluorescence au pH et sa spécificité pour la SDV et le marquage du silicium biominéralisé. Nous avons aussi optimisé le système d'acquisition et l'analyse des signaux de fluorescence obtenus.

5. Analyses statistiques

Afin de tester les différences observées en réponse au couplage pH/salinité, nous réalisons des tests statistiques multivariés. Des analyses paramétriques de variance (two-ways ANOVA's) ou non paramétriques (Kruskal-Wallis) sont appliquées après avoir vérifié la normalité (test de Shapiro) et l'homoscédasticité des variances (test de Bartlett). Le seuil de significativité est fixé à 0,05.

Pour comprendre les corrélations existantes entre les paramètres et les variables, des tests de corrélation de Pearson sont réalisés (noté σ) et testés statistiquement.

Toutes ces analyses statistiques sont faites en utilisant le logiciel R et les bibliothèques *ade4*, *vegan* et *agricolae*.

6. Analyse du transcriptome

Pour l'étape de remapping, les reads 50 pb obtenus par séquençage Illumina/Solexa sont remappés respectivement sur le transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* et le génome de *T. oceanica* (Bussard et al Submitted, Lommer et al 2012). Pour avoir une vue d'ensemble, les résultats de RNA-Seq sont analysés indépendamment pour chaque souche (AFC et clustering). La clusterisation nécessite un

package de R "MBCluster.Seq" spécialement développé pour les données RNA-Seq (Si et al 2014). Brièvement, après une standardisation des données, une étape de clusterisation des niveaux d'expressions standardisés est réalisée en se basant sur un modèle de Poisson.

Pour chaque souche, en partant des informations génomiques, le protéome potentiel de ces souches est obtenu en utilisant le logiciel Transdecoder avec une taille minimale des peptides fixée à 50 acide-aminés. Ces protéomes putatifs sont utilisés pour des analyses d'orthologies en utilisant *Inparanoid*. L'expression des gènes appartenant à ces groupes d'orthologues sont spécifiquement analysés pour déterminer si les "même" gènes sont impliqués dans la réponse au pH et à la salinité chez ces deux diatomées écologiquement éloignées.

La définition de l'ensemble des transporteurs, appelé perméome, chez *T. oceanica* et *T. weissflogii* est obtenue à partir des perméomes publiés de *T. pseudonana* et *P. tricornutum* qui sont largement complétés par la base de données *Transporter Classification Database* (Saier et al 2006, Saier et al 2009, Saier et al 2014). Pour identifier ces transporteurs, nous partons d'une banque de près de 11 000 séquences protéiques, contenant sûrement quelques redondances, que nous utilisons pour des recherches d'homologie (tblasn ; $p\text{-value} < 10^{-10}$) avec le transcriptome de *T. weissflogii* et le génome de *T. oceanica*.

C. Résultats

1. *T. weissflogii* et *T. oceanica* tolèrent les variations de salinités et pHe

Pour comprendre la tolérance de la diatomée côtière *T. weissflogii* et la diatomée océanique *T. oceanica*, nous avons tout d'abord mesuré leurs croissances dans les différents milieux de salinité (21, 28 et 35 psu) et de pHe (7,7, 8,1 et 8,5).

D'une manière générale, nous avons pu constater que *T. oceanica* présentait un temps de division plus rapide que *T. weissflogii*. De plus, nous avons pu montrer que la fréquence de division journalière (μ_{\max}) n'est que légèrement affectée chez ces 2 diatomées (Tableau IV-1). De façon surprenante, le μ_{\max} maximal est observé pour la salinité la plus faible (21 psu) et le pHe actuel de l'eau de mer (8,1) avec respectivement un μ_{\max} de 1,46 et 1,10 pour *T. oceanica* et *T. weissflogii* ce qui correspond à un temps de génération de 16,5 h et 21,8 h. Le μ_{\max} minimal est observé à la salinité moyenne de l'eau de mer (35 psu) et à un pHe de 8,5 pour *T. oceanica* et de 8,1 pour *T. weissflogii*. Chez cette dernière une diminution de salinité tend à augmenter le temps de génération de manière plus importante qu'avec le pHe (test de corrélation $\sigma_{\text{salinité}} = -0,70$ et $\sigma_{\text{pHe}} = -0,21$; $p\text{-val} < 0,05$). De manière opposée, *T. oceanica* ne semble pas présenter de modification de croissance en fonction de la salinité et du pHe. Même si ces paramètres influencent légèrement sa croissance aucune tendance ne semble se dégager (test de corrélation $\sigma_{\text{salinité}} = -0,25$ et $\sigma_{\text{pHe}} = -0,27$; $p\text{-val} < 0,05$) (Tableau I).

Tableau IV-1 : Paramètres physiologiques et morphologiques mesurés chez *T. weissflogii* et *T. oceanica* en réponse au couplage pHe/salinité.

Salinité (psu)	pHe	j _{max}		BSI		D		NFm		DFm		NFC		DFc		Acc		Pr		PPS	
		(j ⁻¹)	(pmol Si ₂ cell ⁻¹)	(µm)	(µm)	(µm)	(µm)	(µm)	(µm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)			
		Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd
<i>T. weissflogii</i>																					
21	7,7	1,03	0,04	0,60	0,06	10,59	1,30	31,65	4,32	0,94	0,05	3,50	1,10	1,18	0,49	0,07	0,04	0,16	0,05	-	-
	8,1	1,09	0,01	0,61	0,04	11,69	1,22	32,00	3,79	1,02	0,04	4,11	1,05	1,19	0,29	0,07	0,04	0,17	0,05	-	-
	8,5	1,02	0,05	0,55	0,11	12,03	1,08	32,40	4,38	1,05	0,09	5,95	1,82	1,66	0,66	0,20	0,22	0,28	0,12	-	-
	7,7	0,95	0,03	0,65	0,08	11,30	1,45	33,00	4,40	0,94	0,05	3,65	1,18	1,05	0,34	0,06	0,04	0,14	0,04	-	-
	8,1	1,00	0,02	0,54	0,11	10,58	1,20	29,80	4,38	0,99	0,10	4,05	0,94	1,23	0,31	0,10	0,07	0,19	0,04	-	-
	8,5	0,93	0,01	0,61	0,10	10,41	0,90	30,68	2,16	0,94	0,05	4,58	1,17	1,23	0,30	0,11	0,09	0,24	0,17	-	-
28	7,7	0,92	0,02	0,76	0,11	8,72	1,88	25,10	5,72	0,98	0,09	3,40	1,64	1,28	0,67	0,21	0,21	0,22	0,12	-	-
	8,1	0,91	0,00	0,58	0,04	10,71	1,38	29,80	4,03	1,00	0,09	3,75	1,07	1,30	0,56	0,13	0,09	0,20	0,07	-	-
	8,5	0,92	0,03	0,82	0,21	13,42	1,69	34,53	5,06	1,10	0,08	4,37	1,21	1,68	0,84	0,17	0,19	0,22	0,11	-	-
	7,7	1,27	0,06	0,09	0,02	5,93	0,62	7,79	1,03	2,28	0,36	0,95	0,23	-	-	-	-	-	-	47,74	14,76
	8,1	1,46	0,04	0,09	0,01	5,39	0,49	5,70	0,73	2,47	0,33	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	42,37	8,86
	8,5	1,30	0,02	0,09	0,03	5,02	0,61	5,63	0,83	2,36	0,27	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	66,30	14,68
<i>T. oceanica</i>																					
28	7,7	1,26	0,01	0,06	0,02	5,75	0,50	5,65	0,88	2,65	0,41	1,00	0,32	-	-	-	-	-	-	54,28	15,56
	8,1	1,19	0,03	0,07	0,01	5,97	0,93	8,18	1,01	2,20	0,27	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	53,16	13,88
	8,5	1,22	0,00	0,08	0,01	5,72	0,68	5,75	0,79	2,57	0,36	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	78,02	17,22
	7,7	1,32	0,05	0,07	0,00	5,54	0,57	5,45	0,69	2,75	0,37	1,05	0,22	-	-	-	-	-	-	58,22	16,12
	8,1	1,39	0,05	0,06	0,01	6,09	0,85	6,25	0,97	2,54	0,23	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	57,55	19,08
	8,5	1,13	0,04	0,08	0,03	6,20	1,23	6,25	1,12	2,61	0,33	1,00	0,00	-	-	-	-	-	-	71,17	17,93

2. Homéostasie du pH cytosolique

Pour mieux comprendre l'impact d'une variation couplée de pHe et de salinité à moyen-terme sur la régulation du pHi, nous l'avons mesuré *in vivo* grâce à une sonde fluorescente BCECF-AM.

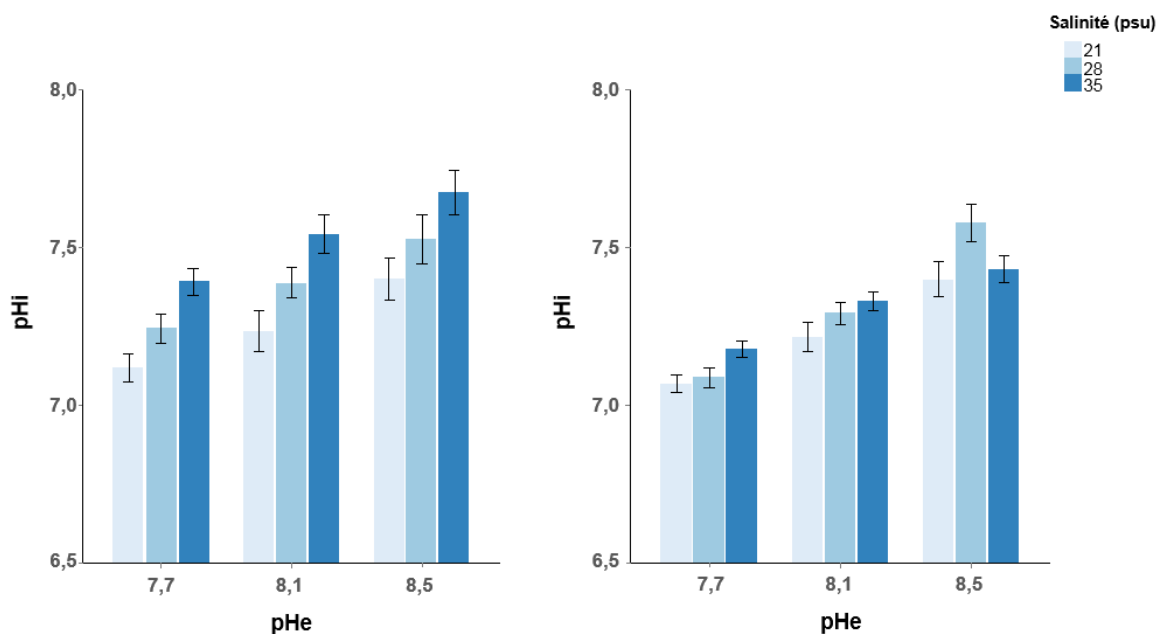


Figure IV-1 : Influence du pHe et de la salinité sur le pH cytosolique (pHi) chez *T. weissflogii* (gauche) et *T. oceanica* (droite). Le dégradé de bleu correspond aux différentes salinités. Les histogrammes représentent la moyenne avec l'erreur type.

Nous avons pu montrer qu'une variation simultanée de la salinité et du pHe entraîne une variation du pHi chez les deux diatomées ($p\text{-val} < 0,01$). Plus la salinité et le pHe diminuent et plus le pHi tend à s'acidifier. Entre les valeurs de pHi les plus extrêmes, on retrouve une différence de pHi de respectivement 0,51 et 0,55 unité chez *T. oceanica* et *T. weissflogii* (Figure IV-1). Une analyse de corrélation de Pearson montre que le pHi est davantage influencé par le pHe que la salinité chez *T. oceanica* ($\sigma_{\text{salinité}} = 0,12$ et $\sigma_{\text{pHe}} = 0,50$; $p\text{-val} < 0,05$) alors que le pHi de *T. weissflogii* est influencé selon une même proportion par ces deux facteurs ($\sigma_{\text{salinité}} = 0,30$ et $\sigma_{\text{pHe}} = 0,31$; $p\text{-val} < 0,05$). Cette homogénéité surprenante fait que nous pouvons mesurer une même valeur de pHi alors que les conditions environnementales sont différentes. Par exemple, dans des conditions de salinité de 21, 28 et 35 psu couplées à un pHe de 8,5, 8,1 et 7,7, le pHi de *T. weissflogii* est identique à savoir $7,39 \pm 0,01$ ($p\text{-val}_{\text{Tukey HSD}} = 1,00$) (Figure VI-1). Cette étude montre, pour la première fois chez les microalgues, que le pHi est influencé directement par la salinité et le pHe et que différentes espèces de diatomées peuvent présenter des régulations différentes de pHi face à des contraintes environnementales

identiques. Le pH_i ne semble cependant pas affecté de la même façon par le pH_e et la salinité chez ces deux diatomées.

3. Tentative de mesure *in vivo* du pH vacuolaire chez les diatomées

La vacuole est une organelle proposée comme active dans la régulation de l'homéostasie du pH_i . Pour essayer de relier les variations de pH_i aux variations de pH_v , nous avons tenté de mesurer le pH_v *in vivo*. A partir du protocole décrit par Preston *et coll.* qui permet de mesurer le pH_v chez la levure, nous avons utilisé la sonde fluorescente 6-CFDA pour tenter de marquer la vacuole et mesurer son pH (Preston et al 1989). Le marquage au 6-CFDA des levures BY 4742 utilisé comme contrôle positif, a permis de visualiser les vacuoles chez cette espèce (Figure IV-2). Etant donné que les diatomées du genre *Thalassiosira* présentent une grande complexité de leur organisation cellulaire, les premiers essais

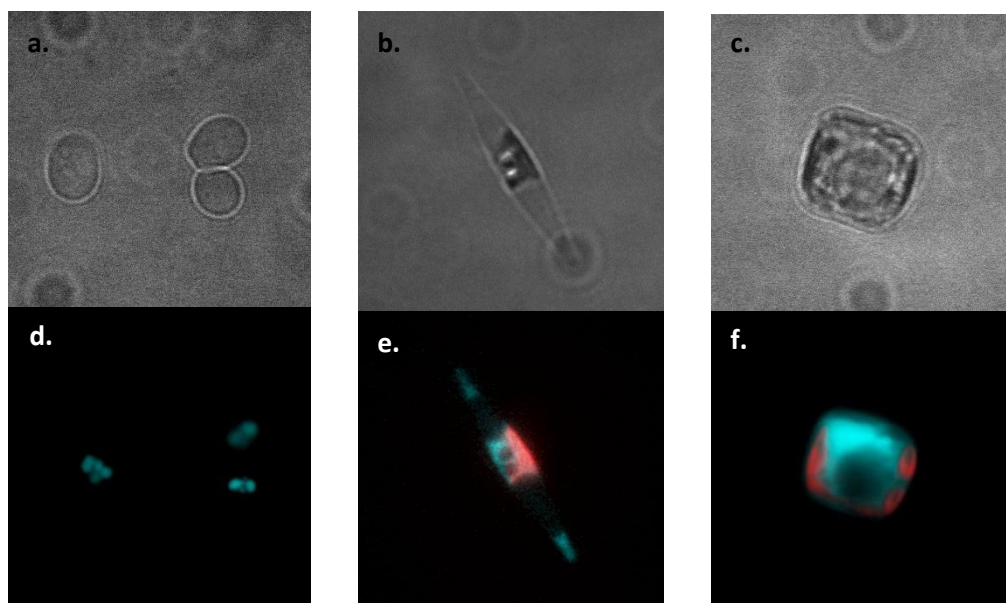


Figure IV-2 : Marquage au 6-CFDA de diatomées et d'une levure. En haut, images en lumière transmise. En bas les fluorescences correspondent au marquage au 6-CFDA (bleu) et à l'autofluorescence des chloroplastes (rouge). De gauche à droite est représenté : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (a et d), *P. tricornutum* (b et e) et *T. weissflogii* (c et f).

de marquage ont été réalisés sur *P. tricornutum*. On remarque sur la Figure IV-2e que 6-CFDA s'accumule dans le cytoplasme et non dans la vacuole comparé à la localisation des vacuoles décrite par Nymark *et coll.* (Nymark et al 2013). Les cellules de *T. weissflogii* marquées présentent également un marquage cytoplasmique et non vacuolaire (Figure IV-2c et f). Au centre de la cellule on remarque une

zone ronde non marquée (Figure IV-2f) qui correspond à la position de la vacuole comme observable en lumière blanche (Figure IV-2c).

4. Impact différentiel sur le métabolisme du silicium

Les résultats des dosages montrent que les variations de la concentration en Sii sont différentes entre les deux diatomées en fonction des conditions de pHe et de salinité. Pour *T. weissflogii*, une très légère augmentation ($p\text{-val} > 0,05$) est observée lors du passage d'un pHe de 7,7 et 8,1. Pour cette même souche à un pHe de 8,5, on constate une augmentation du Sii en fonction de la salinité. Pour une salinité de 35 psu, une augmentation du pHe de 7,7 à 8,5 entraîne une diminution d'un facteur 3,4 de la concentration en Sii. Le pHe est donc le facteur influençant très majoritairement la Sii chez *T. weissflogii* ($\sigma_{\text{salinité}} = -0,01$ et $\sigma_{\text{pHe}} = 0,88$; $p\text{-val} < 0,05$) (Figure IV-3). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans notre précédente étude (Bussard et al Submitted) et celle de Hervé *et coll.* (Herve et al 2012). Chez *T. oceanica*, on remarque un effet de la salinité beaucoup plus important que chez *T. weissflogii*. Ainsi, une augmentation du pHe entraîne une augmentation de la concentration en Sii qui est d'autant plus marquée que la salinité est faible. Le pHe est donc le facteur influençant le plus la Sii chez *T. oceanica* même si, contrairement à *T. weissflogii*, un effet de la salinité ne peut être exclu ($\sigma_{\text{salinité}} = -0,36$ et $\sigma_{\text{pHe}} = 0,79$; $p\text{-val} < 0,05$) (Figure IV-3).

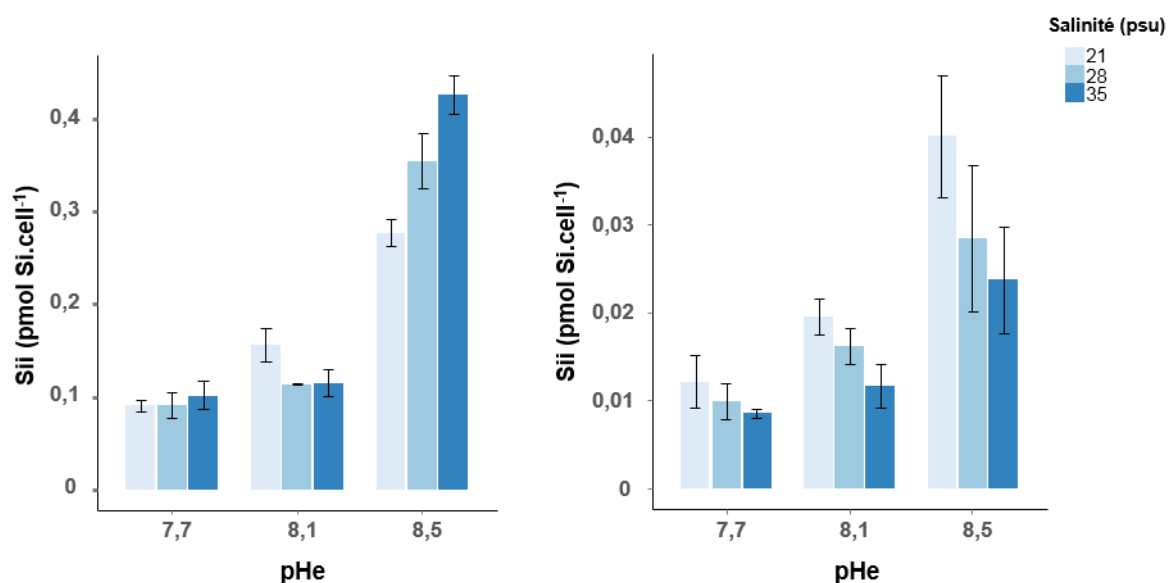


Figure IV-3 : Influence du pHe et de la salinité sur la concentration silicium intracellulaire (Sii) chez *T. weissflogii* (gauche) et *T. oceanica* (droite). Le dégradé de bleu correspond aux différentes salinités. Les histogrammes représentent la moyenne avec l'écart-type.

La concentration BSi des deux diatomées est influencée par le couplage salinité/pHe mais de manière beaucoup plus discrète que celle de la Sii. La concentration en BSi chez *T. oceanica* ne présente que peu de variations en fonction du pHe mais si elle est un peu modifiée par la salinité. De 21 psu à 28 et 35 psu, on observe une augmentation de 10 % à 35 % de cette fraction. Chez *T. weissflogii* cultivée à des pHe de 7,7 et 8,5, on observe une augmentation de la BSi avec la salinité de respectivement 33 % et 21 % (Tableau IV-I). Même si le pHe et la salinité ont un effet moindre sur la BSi que sur la Sii, ces deux facteurs affectent le métabolisme du silicium chez ces deux diatomées et probablement au niveau des mécanismes de transport de l'ion silicium.

5. Morphologie du frustule

Pour quantifier l'effet du couplage pH/salinité sur la morphologie des valves, les frustules des 2 espèces de diatomées ont été purifiés et observés au MET. Plusieurs traits morphologiques ont été analysés comme le diamètre (*D*), le nombre de fuloportulae centraux (*NFc*) et marginaux (*NFm*), leur distance respective entre eux (*DFc* et *DFm*), le regroupement et la distribution des fuloportulae centraux (*Pr* et *Acc*). Ces deux derniers paramètres morphologiques sont présentés et discutés dans mon deuxième article (Bussard et al Submitted).

Du fait que *T. oceanica* ne possède généralement qu'un fuloportulae central, il n'a pas été possible de quantifier les traits appelés *DFc*, l'*Acc* et la *Pr*. Cependant, nous avons pu quantifier pour cette espèce le pourcentage de plaques siliceuses (*PPS*) à la surface des valves.

Les traits morphologiques de ces deux espèces présentent des légères différences en fonction du couplage pH/salinité. Chez *T. oceanica*, le *PPS* semble le trait morphologique le plus affecté. Indépendamment du pHe, à 35 psu, le *PPS* est plus important que pour les autres salinités avec des valeurs comprises entre 66,3 et 78,0 %. Pour des salinités de 21 et 28 psu, nous observons une augmentation légère du *PPS*, lorsque les valeurs de pHe augmentent, de 10 et 15 %. La densité de ces plaques siliceuses sont eux aussi affectés par le couplage pH/salinité (Figure IV-4 et Tableau IV-I).

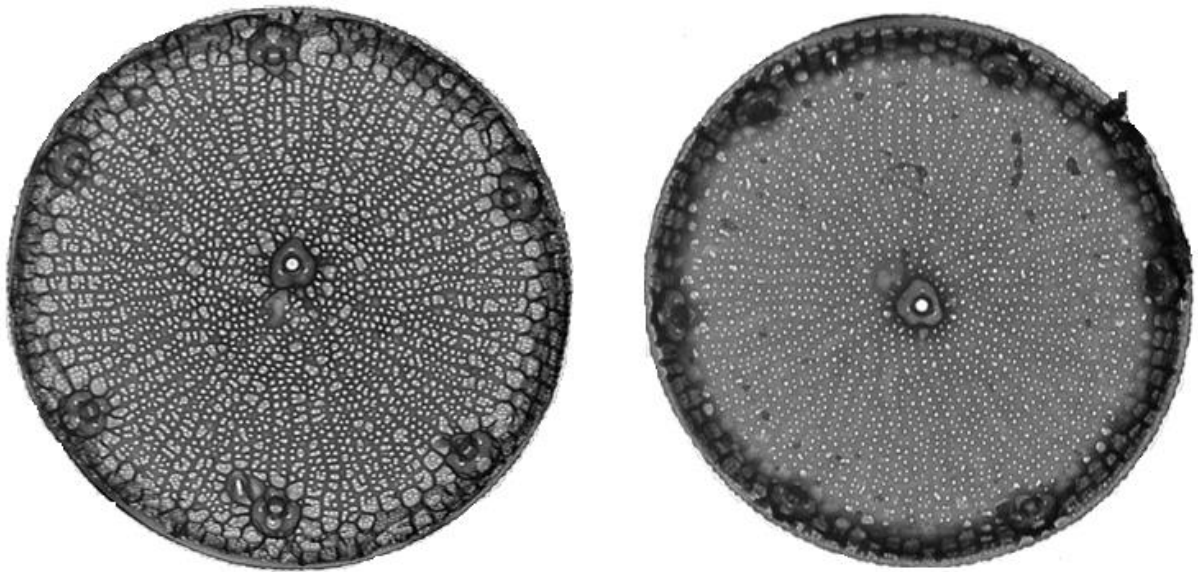


Figure IV-4 : Images MET de valves de *T. oceanica* en fonction des valeurs de pHe et de salinité. A gauche la valve observée présente un taux de plaques siliceuses (PPS) de 78 % alors que celui de droite est de 20 %.

Chez *T. weissflogii*, et pour un pHe de 8,5, le diamètre augmente avec la salinité. A ce pHe, pour une évolution de salinité de 21 à 35 psu, le diamètre moyen est augmenté d'un facteur 1,54 ($D_{21 \text{ moyenne}} = 8,72 \mu\text{m}$ et $D_{35 \text{ moyenne}} = 13,43 \mu\text{m}$; Tableau IV-I). Le *NFc* semble augmenter légèrement avec une augmentation de salinité. Cet effet est d'autant plus marqué à pHe 7,7 avec un facteur 1,7 de différence entre 21 et 35 psu ($NFc_{21 \text{ moyenne}} = 3,5$ et $NFc_{35 \text{ moyenne}} = 5,95$; Tableau IV-I). La valeur de *Pr*, qui est corrélée avec le *NFc* ($\sigma = 0,48$; $p\text{-val} < 0,05$), suit la même tendance. L'*Acc*, qui quantifie la position des fuloportulae centraux par rapport au barycentre de la cellule, montre que 11 %, 15 % et 15 % des valves présentent des fuloportulae centraux plus proche des fuloportulae marginaux que du barycentre de la cellule. Pour respectivement 35 psu/pHe = 8,5, 35 psu/pHe = 7,7 et 21 psu/pHe = 8,5 ce décentrage des fuloportulae centraux est observé. Pour tester si la valve de *T. weissflogii* pouvaient être affectée à l'échelle nanométrique, nous avons analysé avec des scripts Matlab permettant de calculer le rayon des nanopores (*R*), leurs densités (δ) la distance entre 2 pores adjacents (*d1*), la largeur des *semi-continuous cribrum* présentant les nanopores (*L*) et la distance les séparant (*d2*). Tous ces traits restent relativement homogènes en fonction du couplage pH/salinité à moyen-terme (Annexe A-3, page 245).

6. Description de la cinétique du processus de biominéralisation

Nous avons pu mettre au point un protocole permettant, pour la première fois, de quantifier la cinétique du processus de biominéralisation *in vivo* de l'initiation de la SDV jusqu'à la séparation des cellules filles. Cette étude s'est inspirée de celle décrite par Herve *et coll.* (Herve et al 2012) et a nécessité différentes modifications et optimisations tant sur les conditions de culture que sur l'imagerie ou le traitement des signaux. A partir de cellules synchronisées, nous avons réalisé un marquage avec la sonde fluorescente NBD-N2 (0,3 μM finale). Cette sonde présente toutes les spécificités requises pour suivre de manière efficace le processus de biominéralisation : elle s'accumule spécifiquement dans la SDV, elle est non toxique pour des concentrations inférieures à 1 μM et ses variations de fluorescence sont indépendantes du pH (Annenkov et al 2010). De plus son signal de fluorescence est plus important pour des concentrations moindres que le HCK-123 anciennement utilisé pour cette analyse. Même si des mesures réelles n'ont pas été réalisées, il est très probable que son rendement quantique soit plus important que celui du HCK-123. Etant donné qu'il est essentiel, pour réaliser des études quantitatives de suivi au cours du temps, que la fluorescence soit indépendante du pH, nous avons effectué certains tests au fluorimètre qui ont confirmé les résultats obtenus par Annenkov *et coll.* (Annenkov et al 2010). Les expériences consistent à placer des cellules bloquées à un même stade cellulaire dans un système microfluidique en présence du fluorophore. Ensuite, des acquisitions au microscope à épifluorescence sont réalisées toutes les 5 minutes et ce pendant 16 heures. Trois types d'images sont séquentiellement acquis en lumière transmise, à la fluorescence du NBD-N2 et à celle du chloroplaste. L'analyse du signal de fluorescence du NBD-N2 révèle que la cinétique du processus de biominéralisation est très comparable entre les deux diatomées étudiées du genre *Thalassiosira* (Figure IV-5).

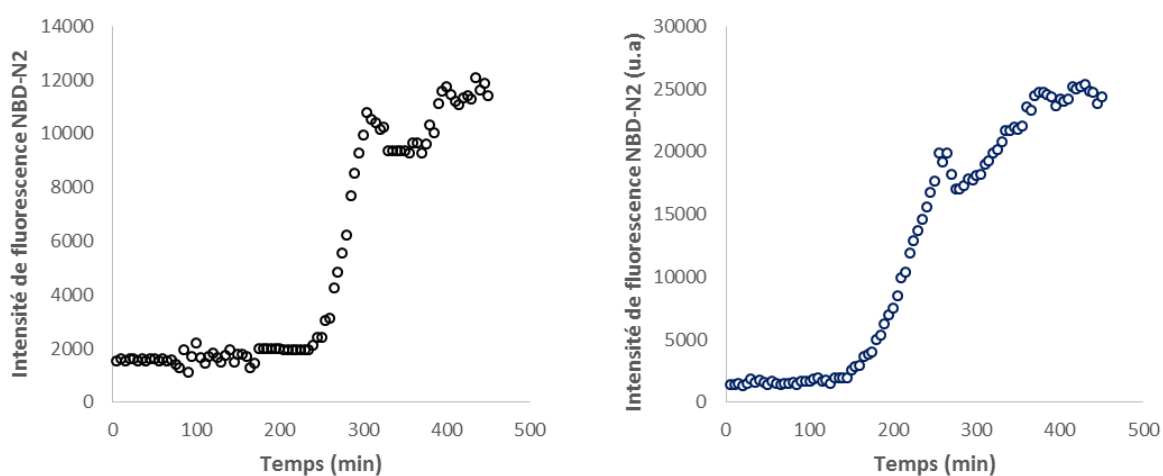


Figure IV-5 : Cinétique du processus de biominéralisation chez *T. weissflogii* (gauche) et *T. oceanica* (droite).

Cette cinétique peut se diviser en trois phases:

- (1) une phase d'augmentation exponentielle du signal de fluorescence ;
- (2) une phase de décroissance transitoire du signal ;
- (3) une remontée progressive du signal de fluorescence.

Durant cette dernière phase, la remontée du signal pourrait suivre une exponentielle avant de se stabiliser. D'après Herve *et coll.* (Herve et al 2012), la décroissance pourrait correspondre soit à une modification du volume de la SDV soit plus probablement à une variation du pH intra-SDV. La dernière phase n'ayant pas toujours été acquise dans son intégralité (< 30 % des cellules étudiées), nous ne l'avons donc pas prise en compte dans cette étude.

Sans tenir compte des différentes conditions de milieu dans lesquelles se trouvaient les cellules, la durée moyenne de la première phase exponentielle est de 134 et 91 min pour respectivement *T. oceanica* et *T. weissflogii*, soit 2,5 et 4,1 fois plus longue que la phase de décroissance respectivement pour *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Les variations d'intensité de fluorescence ne peuvent pas être directement comparées entre ces deux espèces étant donné que les acquisitions des signaux ont été réalisées avec deux objectifs (10X et 20X) présentant des ouvertures numériques différentes (0,7 et 0,4 respectivement). A partir de l'ensemble des cinétiques, qui correspond à 450 cellules, nous avons calculé la vitesse (k), la durée (t_{12}) et la différence absolue d'intensité (I_{12}) de la phase première phase exponentielle ainsi que la durée (t_{23}) et la différence absolue d'intensité (I_{23}) de la phase de décroissance. Pour les deux espèces, les ACP montrent que les paramètres étudiés sont influencés entre eux relativement de la même façon (Figure IV-6).

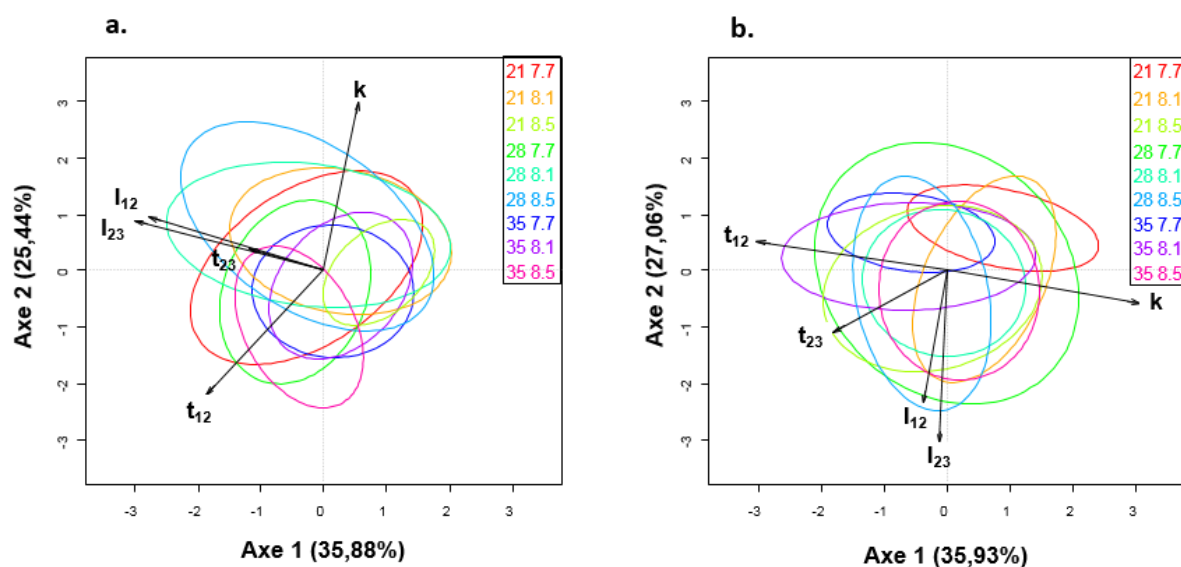


Figure IV-6 : Influence du couplage pH/salinité sur la cinétique de biominéralisation chez *T. weissflogii* (a) et *T. oceanica* (b). L'ACP présente les 5 paramètres étudiés : la vitesse (k), la durée (t_{12}) et la différence absolue d'intensité (I_{12}) de la phase première phase exponentielle ainsi que la durée (t_{23}) et la différence absolue d'intensité (I_{23}) de la phase de décroissance. Chaque ellipse représente une condition particulière et correspond à 75 % du niveau de confiance de l'écart-type.

Pour les deux espèces, la valeur du k est inversement corrélée à celle du t_{12} . Les différences absolues d'intensité des deux phases (I_{12} et I_{23}) varient de manière similaire. Cependant, le temps de la phase de décroissance semble suivre une dynamique propre à chaque espèce. Globalement, les ACP ne révèlent pas de différences marquées en fonction du couplage pH/salinité pour *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Les différentes ellipses colorées, représentant chacune une condition particulière, se chevauchent très largement (Figure IV-6). Même si aucune tendance ne se dégage quelques variations légères sont observables pour *T. oceanica*. Pour cette dernière, la valeur du k tendrait à diminuer lorsque la salinité augmente. Une tendance inverse serait observée pour t_{12} . Au niveau de la différence d'intensité de fluorescence de la phase initiale (I_{12}) celle-ci augmenterait plus le pH augmente. Ces analyses, encore préliminaires, suggèrent que le couplage pH/salinité entraîne des modifications très légères de la cinétique de formation des valves pour ces 2 espèces et plus particulièrement pour *T. oceanica*.

7. L'effort de transcription des deux souches est différent en fonction des facteurs étudiés

Afin de comprendre ces études physiologiques, morphologiques et de la dynamique du processus de biominéralisation, nous avons réalisé des études transcriptomiques chez *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Ces études visent à comprendre les régulations géniques associées aux effets du couplage pH/salinité. Une analyse factorielle des correspondances (AFC ; Figure IV-7) a permis d'identifier une structuration différentielle entre les deux souches en fonction de ces deux paramètres abiotiques. En suivant l'axe expliquant la plus grande variance du jeu de données (Axe 1), l'expression des gènes semble se structurer majoritairement en fonction du pHe pour *T. weissflogii* et de la salinité pour *T. oceanica*. En prenant le second axe (Axe 2), l'expression des gènes semble se structurer en fonction de la salinité de *T. weissflogii* et du pHe pour *T. oceanica*. Cette seconde structuration est plus facilement visible à pHe 8,1 chez *T. weissflogii* et relativement nette pour *T. oceanica* (Figure IV-7).

Cependant pour se rapprocher au plus près de la réalité biologique, il est nécessaire de considérer uniquement les gènes significatifs. Un gène est considéré comme significatif si son expression dans au moins l'une des conditions est statistiquement différente des autres ($p_{adj} \leq 0,05$; déterminée avec le package DESeq).

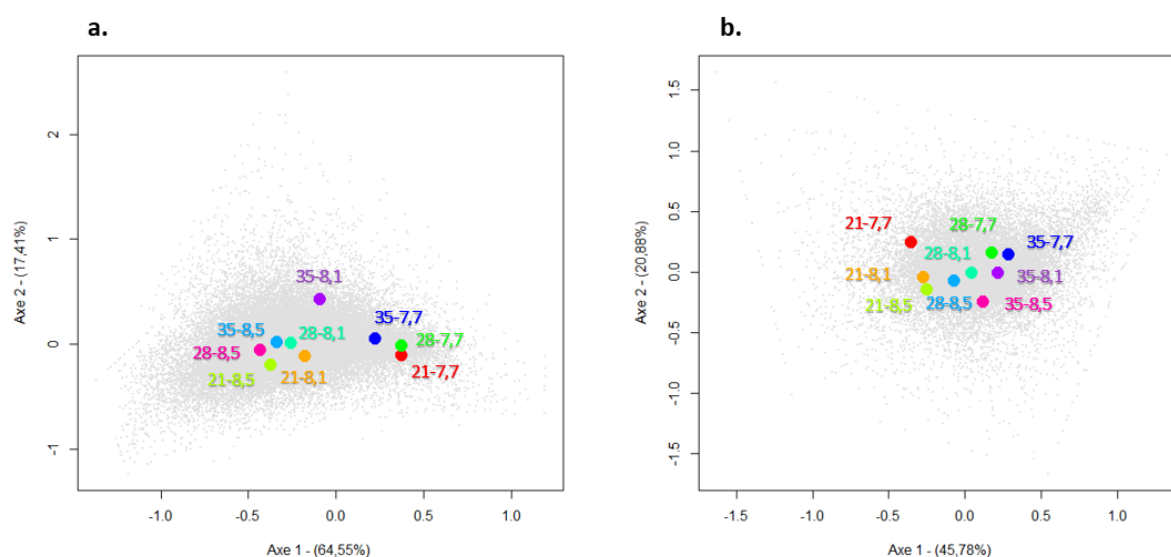


Figure IV-7 : Analyse globale de l'expression des gènes du transcriptome de *T. weissflogii* (a) et *T. oceanica* (b). L'AFC présente les expressions des 58 322 et 27 802 gènes pour respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica* dans les 9 différentes conditions. Les points gris représentent les gènes et les points colorés correspondent aux barycentres des différentes conditions de cultures. La variance totale expliquée pour *T. weissflogii* et *T. oceanica* est respectivement de 82,0 % et 66,7 %.

Cette analyse a permis d'établir que 1 882 et 784 sont différentiellement exprimés chez respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Pour aller plus loin dans l'analyse de ces gènes différentiels, nous avons réalisé des analyses de clustering à partir des niveaux d'expression standardisés (package de R "MBCluster.Seq" (Si et al 2014)). Cette approche permet de mettre en évidence des clusters de gènes ayant des profils d'expression relativement semblables. Ce type d'analyse tend à montrer que *T. weissflogii* présente une proportion importante de gènes différentiels qui ont une expression qui varie principalement en fonction du gradient pHe (521 gènes ; cluster 1, 2, 3 et 4) plutôt qu'en fonction du gradient salin (potentiellement 221 gènes ; cluster 10) (Figure IV-8a). A l'inverse chez *T. oceanica*, les gènes différentiels se structurent principalement selon le gradient salin (531 gènes ; cluster 2, 3, 4, 7 et 8) et minoritairement selon le pHe (44 gènes ; cluster 5) (Figure IV-8b). Cette clusterisation tend à confirmer la structuration générale observée avec les AFC et démontre une réponse génomique différentielle pour ces deux souches de diatomées en fonction des facteurs abiotiques.

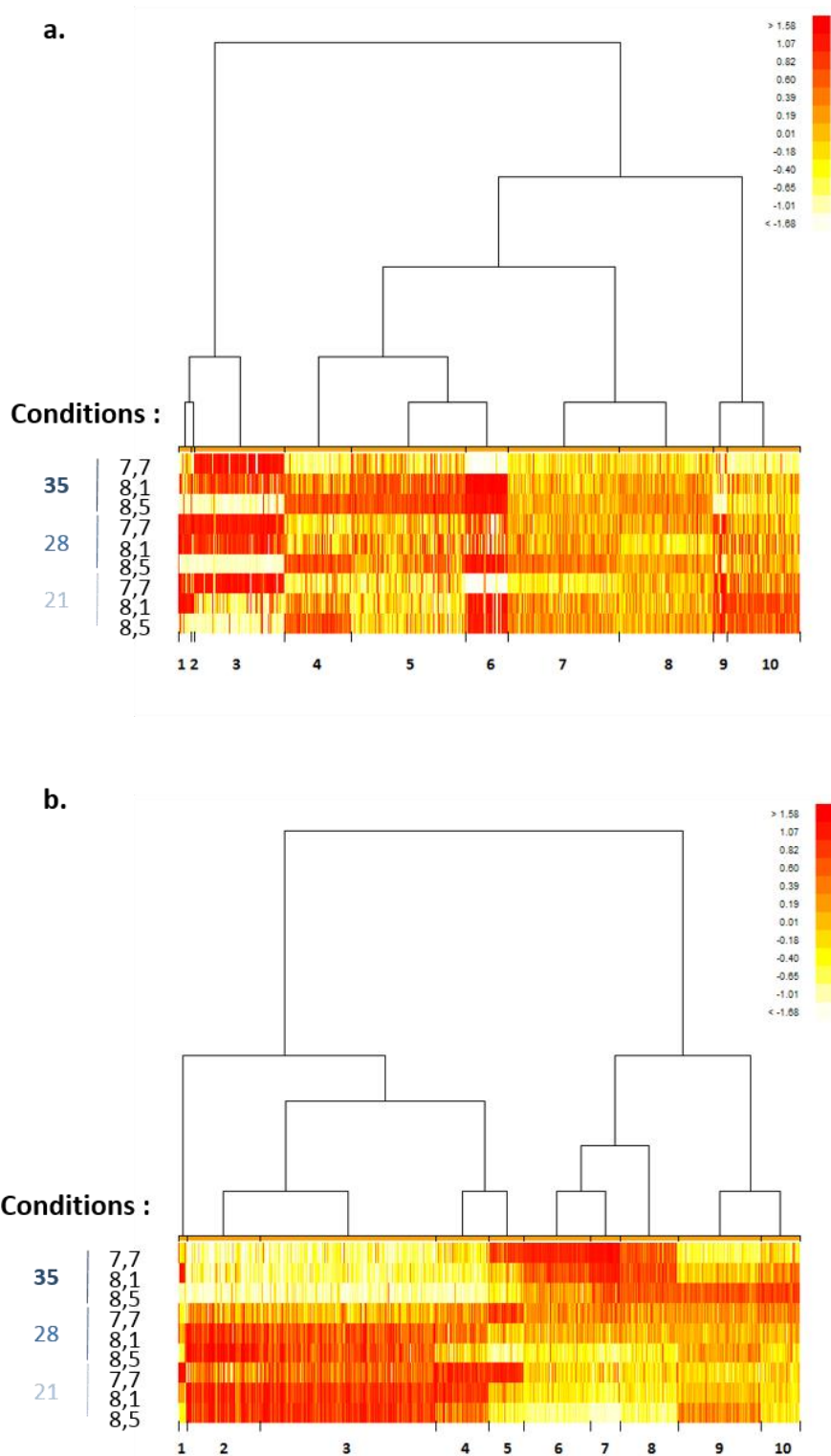


Figure IV-8 : Clustering hiérarchique de l'ensemble des gènes significatifs de *T. weissflogii* (a) et *T. oceanica* (b). Chaque ligne représente une condition et chaque barre représente l'expression standardisée de chaque gène. Le numéro de chaque cluster est indiqué sous les clustering. Pour les deux diatomées étudiées, seuls les gènes significatifs ($p_{adj} \leq 0,05$) ont été analysés ce qui correspond à 1 882 et 784 gènes respectivement pour *T. weissflogii* et *T. oceanica*.

8. Analyse fonctionnelle

Pour comparer la réponse du couplage pH/salinité chez *T. weissflogii* et *T. oceanica*, une analyse d'orthologie, effectuée à partir des peptides prédits et du logiciel Inparanoid, a permis d'identifier 5 562 groupes d'orthologues entre ces deux souches. Ces groupes d'orthologues correspondent respectivement à 9 417 et 11 395 gènes uniques chez *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Si nous considérons uniquement les gènes significatifs, 391 et 358 gènes présentent au moins une relation d'orthologie pour respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica*. L'ensemble de ces gènes significatifs sont répartis dans 338 et 413 groupes d'orthologues pour *T. weissflogii* et *T. oceanica*. L'analyse par clustering de ces gènes montre les mêmes types de structuration que ceux observés précédemment (Figure IV-9a et b). Ainsi, les gènes de *T. weissflogii* répondent davantage au gradient pHe (273 gènes ; cluster 1, 3, 4, et 7) qu'au gradient salin (65 gènes ; cluster 8 et 10). A l'inverse chez *T. oceanica*, ils répondent préférentiellement au gradient salin (253 gènes ; cluster 1, 2, 3, 4, 7, 9 et 10) et secondairement au gradient de pHe (19 gènes ; cluster 6). De manière intéressante, seulement 32 groupes d'orthologues présentent au moins un gène significatif chez *T. weissflogii* et *T. oceanica* (Figure IV-9c), suggérant que les mécanismes de réponse mis en place chez ces deux espèces sont très différents ou qu'ils n'impliquent pas les mêmes gènes.

Pour tenter d'aller un peu plus loin, il nous a semblé évident de porter notre attention sur les transporteurs membranaires (MTs). Ainsi en se basant sur la base de données *Transporter Classification Database* (Saier et al 2006, Saier et al 2009, Saier et al 2014) et les MTs décrits chez *P. tricornutum* et *T. pseudonana* (Chan et al 2011), nous proposons que le perméome de *T. weissflogii* et *T. oceanica* correspondrait respectivement à 3 499 et 2 218 MTs répartis en 7 classes et 200 familles différentes (Tableau IV-II).

Tableau IV-II : Composition du perméome de *T. weissflogii* et *T. oceanica*

Classes	Nombre de gènes codant pour un MT		Nombre de famille par classe de MT	
	<i>T. weissflogii</i>	<i>T. oceanica</i>	<i>T. weissflogii</i>	<i>T. oceanica</i>
Channels	541	311	42	37
Secondary carriers	1476	1081	61	59
Primary active transporters	1124	632	23	22
Group translocators	43	20	4	4
Transmembrane electron carriers	22	18	4	4
Accessory proteins	47	27	11	7
Incompletely characterized proteins	246	129	43	44

Sur l'ensemble des gènes identifiés au sein de ces perméomes, 112 chez *T. weissflogii* et 52 chez *T. oceanica* présentent une expression différentielle. Evidemment, même si ces études sont encore préliminaires, elles nous ont permis d'apporter des informations nouvelles et d'orienter nos réflexions sur les mécanismes de réponse et d'acclimatation des diatomées aux pHe et à la salinité.

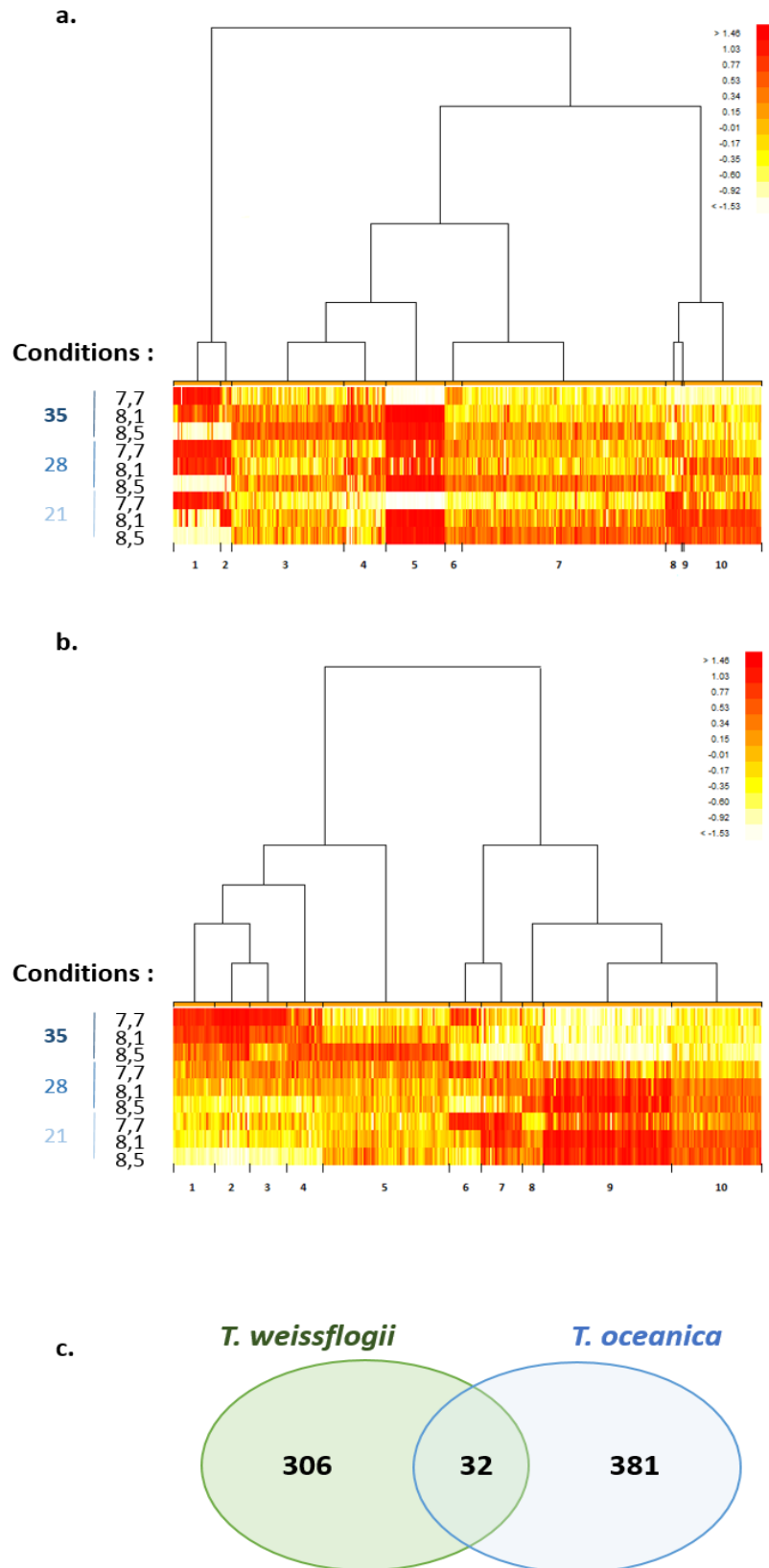


Figure IV-9 : Analyse des gènes significatifs présentant au moins une relation d'orthologie entre *T. weissflogii* et *T. oceanica*. Les figures a et b correspondent à une clusterisation hiérarchique des 391 et 358 gènes significatifs et orthologues chez respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica*. La figure c présente la distribution des groupes d'orthologues entre *T. weissflogii* et *T. oceanica* pour les gènes significatifs. Au total 338 et 413 groupes d'orthologues présentent au moins un gène significatifs chez *T. weissflogii* et *T. oceanica* mais seulement 32 sont communs aux 2 diatomées.

D. Discussion

Dans le but de comprendre les stratégies d'acclimatation des diatomées à différents facteurs environnementaux, nous avons étudié la capacité d'acclimatation de *T. weissflogii* (CCMP 1051) et *T. oceanica* (CCMP 1005) à un couplage pH/salinité après 10 semaines d'incubation. Les salinités (21, 28 et 35 psu) étudiées correspondent à des variations comparables à celles observées au niveau des écosystèmes côtiers (Brand 1984, Wootton et al 2008). Par ailleurs, la condition de pHe = 7,7 correspond à l'une des hypothèses quant aux possibilités d'évolution du pH océanique pour les années 2100 (Caldeira and Wickett 2003). Dans cette étude, nous avons intégré des analyses physiologiques, morphologiques et transcriptomiques centrées autour de la régulation du pHi pour tenter de dégager les stratégies d'acclimatation de ces deux diatomées du genre *Thalassiosira* qui vivent dans des écosystèmes contrastés (Alverson et al 2011, Brand 1984 , Lommer et al 2012 , Strzepek and Harrison 2004). De plus, la diatomée côtière *T. weissflogii* et la diatomée océanique *T. oceanica* nous ont semblé particulièrement intéressantes pour cette étude dans la mesure où la phylogénie de ce genre est bien résolue (Alverson et al 2011) et que des informations génétiques existent (Bussard et al Submitted , Lommer et al 2012).

Même si *T. oceanica* est supposée vivre dans des environnements relativement stables au regard des facteurs abiotiques étudiés, ces deux espèces présentent une croissance relativement homogène dans les conditions testées.

1. Le couplage pH/salinité affecte le silicium intracellulaire

Il est connu que chez un grand nombre d'espèces de diatomées, les conditions de croissance peuvent à court-terme affecter les fractions de silicium, comme cela a été montré notamment pour des variations de pHe (Herve et al 2012 , Milligan et al 2004) ou de la salinité (Vrieling et al 1999 , Vrieling et al 2007). De manière cohérente aux résultats obtenus par Herve *et coll.* (Herve et al 2012), nous avons pu montrer qu'après 10 semaines d'acclimatation, la concentration en Sii était fortement modifiée en fonction du pHe tant chez *T. weissflogii* que chez *T. oceanica*. Cependant, contrairement à *T. weissflogii*, un effet de la salinité ne peut pas être exclu chez *T. oceanica*. La seconde fraction étudiée correspond à

la fraction de BSi, qui varie au maximum de près de 30 % pour les deux espèces. Même si de telles variations ne semblent pas très importantes à l'échelle cellulaire, elles pourraient avoir des conséquences importantes à l'échelle du cycle biogéochimique du silicium si ces résultats étaient vrais pour une majorité de diatomées (Nelson et al 1995 , Treguer and De La Rocha 2013). Une variation de 30 % de la BSi pourrait induire une variation de $72 \text{ Tmol Si an}^{-1}$, ce qui est loin d'être négligeable. Des paramètres simples pouvant influencer ces fractions pourraient être le transport du silicium dans la cellule et dans la SDV, le stockage de cet élément mais aussi les étapes de polycondensation du silicium dans la SDV.

2. Homéostasie du pH cytosolique

L'homéostasie du pHi est un processus de base commun à l'ensemble des organismes vivants allant de la bactérie aux grands mammifères. Malgré une différence d'habitat (terrestre, marine, eau douce, ...) et leur divergence évolutive, le pHi est toujours maintenu proche de 7,0-7,5 (Bethmann and Schonknecht 2009). Cette neutralité permet le bon fonctionnement des enzymes et des équilibres ioniques et donc le maintien de métabolisme de base comme la glycolyse, le cycle de Krebs, la synthèse de différentes molécules, ... (Sakano 2001). Pour la première fois chez les microalgues, une variation significative du pHi *in vivo* a été enregistrée en réponse à un effet couplé du pHe et de la salinité chez les deux diatomées étudiées : une diminution de la salinité et du pHe entraîne simultanément une acidification cytoplasmique. Une acidification cytoplasmique semblable, en réponse à une diminution du pHe, avait déjà été montrée pour la diatomée *T. weissflogii* (Herve et al 2012) mais, à notre connaissance, aucune étude n'a encore montré une variation du pHi en fonction de la salinité chez les microalgues. Il est intéressant de rappeler que des réponses similaires ont déjà été démontrées chez les plantes terrestres (Kader et al 2007 , Katsuhara et al 1989, Katsuhara et al 1997 , Zhang et al 2001). Par exemple, Kader *et coll.* montrent qu'une variation de la salinité des sols entraîne un stress osmotique au niveau des cellules racinaires se manifestant par une modification de l'activité d'antiport Na^+/H^+ de la membrane plasmique et de la vacuole ajustant ainsi le pHi (Kader et al 2007). De manière assez inattendue, nous avons pu observer chez *T. weissflogii* qu'une compensation du pHi était possible en modifiant simultanément les valeurs de pHe et de salinité (pHi = 7,39 pour 21 / 8,5, 28 / 8,1 et 35 / 7,7). L'homéostasie chez *T. weissflogii* semble donc autant influencée par des variations de pHe et de la salinité contrairement à celle de *T. oceanica*.

L'homéostasie de pH peut faire intervenir différentes voies dont le tamponnage chimique (comme les carbonates), la production ou la consommation métabolique de protons (photosynthèse, respiration,...), le transport transmembranaire (ATPases, pyrophosphatase, transporteurs,...) et la compartimentation des protons (vacuole, cytoplasme,...) (Bethmann and Schonknecht 2009). Par exemple, au regard de cette dernière voie de régulation, il a été montré chez plusieurs espèces de plantes et chez la microalgues verte *Eremosphaera viridisque* qu'une acidification cytoplasmique s'accompagne toujours d'une alcalinisation du pHv (Bethmann and Schonknecht 2009, Kader et al 2007, Katsuhara et al 1989). Comme indiqué ci-dessus, nos tentatives pour tester si ce type de régulation existe aussi chez les diatomées ce sont malheureusement avérées infructueuses.

3. Processus de biominéralisation et morphologie du frustule

Pour étudier le processus de biominéralisation chez les diatomées, nous avons réalisé une étude fine de la cinétique de la formation des valves allant de l'initiation de la SDV à la séparation des cellules. De manière assez intéressante, nous avons pu constater que la cinétique du processus de biominéralisation était similaire entre les deux espèces du genre *Thalassiosira* (Figure IV-5) et cohérente avec la seule étude existante à ce jour (Herve et al 2012). Même si une étape de modélisation pourrait être nécessaire pour mieux décrire cette cinétique, elle tend à confirmer les observations faites par Herve *et coll.*, et suggère que la phase de décroissance de la fluorescence pourrait être une phase remarquable pour le processus de morphogénèse chez les *Thalassiosira*. Comme mentionné précédemment, cette phase de décroissance pourrait correspondre à une variation du volume de la SDV (lorsque la SDV entre en contact avec les bords de la cellule ?) ou à une variation du pH intra-SDV (marquant une étape transitoire d'un processus initial de morphogénèse ?). Parmi les 5 paramètres étudiés, nous avons pu constater de très légères différences essentiellement visibles chez *T. oceanica*. Cette relative homogénéité, qui contraste par rapport à l'étude d'Hervé *et coll.* (Herve et al 2012), pourrait s'expliquer par le temps d'acclimatation beaucoup plus long qui aurait permis une régulation de ce processus. En effet, tout comme l'avait montré notre étude sur l'acclimatation à la salinité à court (5 jours) et long-terme (> 2 ans) chez *T. weissflogii* (Bussard et al Submitted), la durée du processus d'acclimatation aurait pu entraîner une profonde modification du transcriptome permettant d'ajuster finement ce processus. Même si ces analyses présentent un côté novateur, elles ne traduisent pas forcément tous les détails du mécanisme de synthèse des valves. En effet, nous avons vu que la morphologie semblait elle aussi peu affectée par des modifications du milieu de culture pour les deux

souches même si des variations de la quantité de BSi existent. Il est donc raisonnable de penser que des études plus fines de la silice incorporée dans les valves pourraient apporter des informations complémentaires à nos études.

En s'inspirant des résultats de Vrieling *et coll.* (Vrieling et al 2007), des analyses fines des nanostructures (< 100 nm) au microscope électronique à haute résolution (HR TEM) couplées au microscope de force atomique (AFM) permettraient de tester si ces facteurs abiotiques influencent la taille, la nature et le degré de compaction des particules de silice formant le frustule. De même, des études sur le degré de condensation de la silice ou de la dimension fractale du réseau de silice (techniques de diffusion des rayons X aux petits ou aux grands angles ; SAXS et WAXS) (Vrieling et al 2000) pourraient révéler si le pHe et la salinité affectent le processus de formation des valves à l'échelle nanométrique. En effet, il est probable que, même si la cellule régule son homéostasie, le pHe et la salinité puissent modifier les équilibres acido-basiques dans la SDV avec des conséquences possibles sur ses équilibres chimiques et notamment sur les interactions entre silicium/silice et molécules organiques (silaffines, polyamines, chitines, ...). Ces mêmes gènes impliqués dans le mécanisme de formation du frustule pourraient voir leurs expressions modulées en réponse aux facteurs environnementaux comme cela a déjà été montré chez *T. pseudonana* (Shrestha et al 2012).

4. Réponse différentielle du transcriptome

En utilisant le transcriptome *de novo* de *T. weissflogii* (Bussard et al Submitted) et le génome de *T. oceanica* (Lommer et al 2012), nous avons analysé l'ensemble du transcriptome pour comprendre comment le pH et la salinité influencent l'expression génique. De manière assez inattendue, chaque espèce tend à répondre préférentiellement pour l'un ou l'autre des deux facteurs (Figure IV-7). L'expression globale des 784 gènes significatifs de *T. oceanica* suit majoritairement le gradient salin alors que celle des 1 882 gènes significatifs de *T. weissflogii* suit plutôt le gradient de pH (Figure IV-8). Il semble donc que la réponse au couplage pHe/salinité nécessite un effort transcriptionnel comparable chez ces deux espèces étant donné que 3,2 % et 2,3 % des gènes totaux de *T. weissflogii* et *T. oceanica* sont différentiellement régulés. Des différences transcriptomiques ont également été montrées entre deux espèces de pins du genre *Populus* (*Populus euphratica* Oliv and *P. pruinosa* Schrenk) en réponse à un stress salin (ajout de 100 mM de NaCl) et ont été interprétées comme une divergence des mécanismes régulateurs au cours de l'évolution (Zhang et al 2014). Cependant, contrairement à l'étude précédente, qui présentait plus de 30 % de réponses communes entre les deux espèces de *Populus*, notre analyse

des groupes d'orthologues contenant des gènes significatifs révèle un très faible nombre de groupes d'orthologues partagés par les deux souches de *Thalassiosira*. Sur les 338 et 413 groupes d'orthologues possédant au moins un gène significatif respectivement chez *T. weissflogii* et *T. oceanica*, seulement 33 groupes d'orthologues sont communs entre ces 2 souches (Figure IV-9c). Une des hypothèses possible et déjà avancée dans l'étude de Zhang *et coll.* (Zhang et al 2014) pourrait être qu'au cours de l'évolution et des adaptations à des écosystèmes contrastés, il y aurait eu une divergence des mécanismes de régulation et de réponse. En lien avec cette divergence, il a été proposé que l'évolution des génomes de diatomées était particulièrement rapide (Bowler et al 2008).

Pour essayer de comprendre cette différence transcriptomique, nous avons, pour l'instant, focalisé notre étude sur les gènes codant pour les transporteurs membranaires (MTs). Ces MTs facilitent le mouvement des ions et molécules entre les différents compartiments cellulaires pour assurer une homéostasie et constituent ce que l'on appelle le perméome. Des études sur les plantes montrent que le perméome occupe un rôle important dans l'homéostasie ionique et du pH (Kader et al 2007). En s'appuyant sur cette hypothèse, nous avons identifié 3 499 et 2 218 MTs potentiels chez respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica* se répartissant en 7 classes et 200 familles différentes (Tableau IV-II). En considérant le nombre total de gènes de ces deux espèces, ces nombres semblent relativement cohérents avec le nombre de MTs identifiés chez *T. pseudonana* (500) et *P. tricornutum* (514) (Chan et al 2011). Parmi les différentes familles identifiées, la famille des symporteurs DAACS présente un nombre de gènes estimés presque 14 fois plus important chez *T. oceanica* (123) que *T. weissflogii* (9). Cette famille de transporteurs permet le symport d'acide dicarboxylique ou d'acide-aminé avec des cations (H^+ ou Na^+) (Jung 2001) et pourrait jouer un rôle spécifique dans les processus de réponses de *T. oceanica* à son milieu de vie. Cependant, seulement 2 gènes codant pour un DAACS sont significativement impactés chez *T. oceanica* et aucun chez *T. weissflogii*. Parmi les 112 et 52 gènes significatifs codant pour des MTs chez respectivement *T. weissflogii* et *T. oceanica*, nous avons focalisé de manière préliminaire notre étude sur les 16 différentes familles de transporteurs participant au déplacement des protons (ATPases, pyrphosphatases, transporteurs,...). Les protons jouent en effet un rôle majeur dans la signalisation, le développement et les différentes régulations métaboliques des eucaryotes et doivent donc être finement régulés pour assurer l'homéostasie du pH cytosolique (Taylor et al 2012) dans un temps relativement court (Guern et al 1991). *T. oceanica* présente 3 gènes codant pour des transporteurs à proton, répartis en 2 familles, qui possèdent des expressions faibles mais significatives bien que leur expression ne semble suivre ni le gradient de pHe ni le gradient salin (Annexe A-4, page 246). De manière assez contrastée, *T. weissflogii* présente 19 gènes (16,9 % des MTs significatifs) répartis dans 5 familles de transporteurs à protons affectés significativement par le couplage pH/salinité. Quatorze de ces gènes présentent une expression modifiée en fonction du

couplage pH/salinité (Annexe A-4, page 246). Les 5 gènes restants présentent un profil d'expression suivant strictement le gradient pH ou le gradient salin. Les gènes codant pour une pyrophosphatase vacuolaire (Tw_9011), un cytochrome c1 (Tw_4560) et 2 sous-unités du complexe V-ATPases (Tw_1813 ; Tw_26471) présentent des profils d'expression qui suivent strictement le gradient pHe. A l'inverse une H⁺-ATPase de la membrane plasmique (P-ATPases IIIA ; Tw_15978) présente un profil d'expression qui suit le gradient salin. Chez les champignons, les plantes et les levures, les V-ATPases ont été montrées comme des acteurs clés dans le contrôle du pHi, notamment à cause de leur activité de transfert de protons du cytosole vers le lumen de la vacuole. L'activité de ces transporteurs chez la levure seraient potentiellement pHe dépendant ce qui serait cohérent avec nos observations (Diakov and Kane 2010).

Même si ces résultats sont encore préliminaires, ils révèlent une stratégie différente de régulation du pHi chez ces deux souches. Toujours dans le but de continuer ces recherches sur la régulation du pHi, il serait aussi intéressant d'étudier les expressions des gènes présentant une expression corrélée avec les variations du pHi. L'étude de ces gènes pourrait permettre d'identifier des familles fonctionnelles (terme GO) et ainsi mieux comprendre la spécificité de régulation du pHi chez ces deux souches.

Gestion de l'acclimatation chez deux espèces de diatomées du genre *Thalassiosira*

La diatomée côtière *T. weissflogii* et la diatomée océanique *T. oceanica* sont retrouvées dans des écosystèmes contrastés grâce à certaines caractéristiques physiologiques et génétiques acquises au cours de l'évolution. En réponse à un gradient couplé de pH et de salinité, ces 2 espèces de *Thalassiosira* sont capables de maintenir une fitness, une morphologie du frustule et un processus de biominéralisation qui semblent relativement homogènes. Cependant l'effort transcriptionnel paraît différent en fonction des espèces et des 2 paramètres : une majorité de gènes différentiellement exprimés semble suivre le gradient pH chez *T. weissflogii* alors que celle de *T. oceanica* suivrait davantage le gradient salin. De plus, cette réponse transcriptomique semble relativement spécifique au regard de l'étude des gènes orthologues. Même si l'homéostasie de pH_i semble impactée de façon similaire par les 2 facteurs abiotiques étudiés, les analyses préliminaires tendent à suggérer une régulation différente et spécifique chez ces deux espèces.

Discussion et perspectives

Les diatomées sont des microalgues brunes unicellulaires présentant de nombreuses caractéristiques acquises au cours de leur évolution (frustule, vacuole, mécanismes d'acquisition du carbone en C3 et C4, cycle de l'urée ...). Avec une histoire évolutive faite d'au moins deux processus d'endosymbioses et de nombreux transferts horizontaux de gènes, le génome dit en "mosaïque" des diatomées aurait contribué à leur rapide diversification et à leur forte capacité d'acclimatation (Armbrust 2009, Chan et al 2012, Parker et al 2008). En effet, les diatomées sont retrouvées dans des écosystèmes aquatiques hétéroclites avec des modes de vie variés (Brand 1984, Kirst 1990). Ces microalgues sont des acteurs clés de notre biosphère puisqu'elles sont capables d'influencer de nombreux écosystèmes et de réguler certains grands cycles biogéochimiques. Malgré une littérature conséquente, il existe peu d'études s'intéressant précisément aux capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales alors que ces études pourraient aider à mieux comprendre leur évolution passée et à anticiper leurs réponses face aux changements environnementaux.

Cette étude avait pour but d'identifier les stratégies d'acclimatation des diatomées à différentes échelles de temps et de comprendre si ces modifications sont spécifiques au niveau de l'espèce. Pour ce faire, j'ai relié des études intégrant la physiologie, la morphologie et la transcriptomique afin de mieux définir les capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales.

A. Evolution des stratégies d'acclimatation

1. Acclimatation et fitness

Avant d'entamer cette discussion, j'aimerais revenir brièvement sur les termes "acclimatation" et "adaptation". Ces deux notions, bien que différentes et déjà définies dans l'analyse bibliographique, ne sont pas toujours utilisées et définies de la même façon suivant la discipline, les auteurs et les types d'organismes étudiés. D'après Lawlor et Keys, ces deux termes seraient synonymes pour les plantes face à une modification environnementale (Lawlor and Keys 1993). Pour les études zoologiques, leur utilisation dépendrait des stress étudiés. Chez les micro-organismes et les algues, l'acclimatation correspondrait à un état transitoire et réversible entre le début du stress et le processus de sélection

naturelle. En effet, la sélection naturelle permet de “fixer” définitivement les mécanismes (mutations, acquisitions, réorganisations, ...) mises en place lors des processus d’acclimatation si ils confèrent un avantage reproductif plus important que l’état initial (Seckbach 2013). Cependant, en dépit de cette dernière définition, il existe, chez les microalgues, de nombreux cas d’utilisation à même escient de ces deux notions. A titre d’exemple, deux études similaires au niveau du protocole expérimental utilisent le terme “adaptée” et “acclimatée” pour caractériser une souche de *T. weissflogii* placée dans une condition hyposaline pendant 1 ou 2 jours (Radchenko and Il'yash 2006, Vrieling et al 2007). Ainsi, même si différents points de vue existent, j’ai pris le parti de dissocier ces deux notions et j’utiliserai majoritairement le terme “acclimatation” plutôt que “adaptation” qui me semble plus juste. En effet, en considérant l’état actuel de mes résultats, il n’est pas encore possible de déterminer si les réponses observées sont fixées définitivement ou non dans les génotypes et plus particulièrement pour les expériences à long-terme.

Pour observer la capacité de réponses des organismes, le terme de “fitness” est généralement utilisée. Cette notion, introduite par les écologues, n’est pas mesurable directement mais peut être estimée au regard de la croissance cellulaire étant donné qu’elle intègre l’état physiologique global de la cellule (Bruning et al 2013).

2. Acclimatation en fonction du temps

Pour pouvoir s’acclimater efficacement à une modification environnementale, les microalgues doivent mettre en place des stratégies de réponses pour maintenir l’homéostasie cellulaire et optimiser leur fitness (Brand 1984 , Kirst 1990). Mon projet de recherche a permis de montrer (Chapitres II et IV) que *T. weissflogii* et *T. oceanica* étaient capables de s’acclimater efficacement aux différents stress imposés (salinité ou pHe/salinité) car leurs croissances, et donc leurs fitness, sont peu modifiées. Leur capacité d’acclimatation serait d’ailleurs assez rapide, dans la mesure où après 5 jours seulement passés en milieu hyposalin, *T. weissflogii* présente une fitness relativement identique à celle de la souche cultivée dans des conditions de salinité équivalent à la moyenne océanique. Des études similaires avaient déjà reporté le caractère euryhalin de cette souche du fait de sa présence dans des écosystèmes côtiers (Garcia et al 2012, Radchenko and Il'yash 2006). Cependant, d’après mes connaissances, il n’existe aucune étude rapportant que cette espèce ait été, suite par exemple à des modifications de la continuité entre les masses d’eaux, retrouvée enclavée dans des eaux où la salinité est constamment réduite (lagunes, lacs, ...). Des processus de modifications des écosystèmes ont dû se produire au cours

des temps géologiques puisque le genre *Thalassiosira* présente des espèces vivant dans des environnements tant marin que d'eau douce.

Sachant que, selon Darwin, l'adaptation résulte de la sélection naturelle, les organismes tendent à être mieux adaptés à des environnements déjà rencontrés par le passé qu'à des environnements nouveaux (Brand 1984). Mes résultats, présentés dans le Chapitre II, montrent que *T. weissflogii* acclimatée pendant plus de deux ans à des milieux hyposalins est capable de s'y acclimater efficacement même dans la durée. Cependant même si la croissance et la physiologie semblent relativement homogènes à court et long-terme, le profil transcriptomique observé est sensiblement différent en fonction du temps d'acclimatation (Figure D-1).

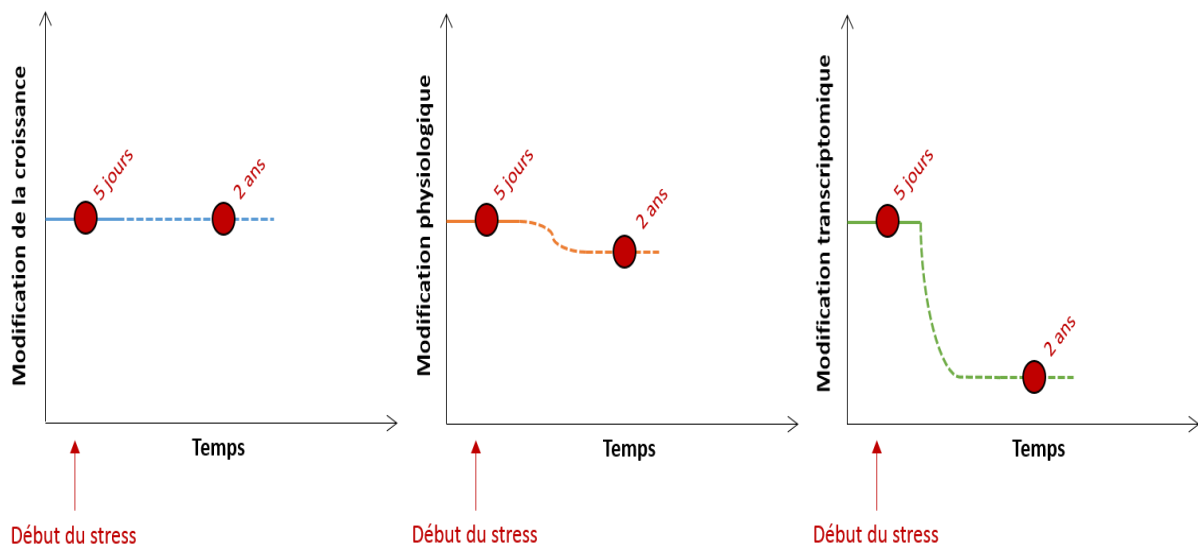


Figure D-1 : Représentation schématique des modifications de la croissance, de la physiologie et du transcriptome de *T. weissflogii* au cours de l'acclimatation au stress hyposalin. Les lignes en pointillées n'ont aucune réalité biologique.

Chez d'autres organismes euryhalins comme *Desulfovibrio vulgaris*, *Daphnia pulex* ou encore *Ectocarpus siliculosus*, une acclimatation à un stress hyposalin entraîne également une reprogrammation du transcriptome et des effets pleiotropiques interprétés comme des modifications de la stratégie d'acclimatation (Dittami et al 2009, Latta et al 2012, Zhou et al 2013). Ces stratégies feraient intervenir différents mécanismes comme les processus d'épigénétisme (Maumus et al 2011), les éléments transposables (Maumus et al 2009) ou encore différentes voies de signalisation comme celles impliquant le calcium ou les nucléotides cycliques comme l'adénosine monophosphate (AMPC) (Hennon et al 2015). Même si les mécanismes régulateurs n'ont pas été clairement identifiés dans notre étude, la reprogrammation transcriptomique observée chez *T. weissflogii* pourrait correspondre à un

élément majeur impliqué dans l'acclimatation chez les diatomées. Nous avons pu montrer que les gènes présentant une expression différentielle à court-terme sont globalement sur-exprimés (63,7 %) alors qu'à long-terme ils sont largement sous-exprimés (85,9 %). Latta *et coll.* proposent qu'une diminution globale de la transcription à long-terme correspondrait à une stratégie d'acclimatation permettant de diminuer le coût transcriptionnel tout en maintenant une fitness optimale (Latta et al 2012). En effet, ces auteurs ont pu montrer qu'une souche de *Daphnia pulex* tolérante à la salinité et placée dans des conditions hyposalines présente une grande majorité de gènes significativement sous-exprimés comparés à une autre souche moins tolérante. En se basant sur ce type de résultat et sachant qu'une augmentation des coûts de maintenance métabolique est généralement associée à une diminution de la fitness des organismes (Bruning et al 2013), nous pouvons proposer des arguments relatifs à l'évolution de la tolérance à la salinité chez *T. weissflogii*. Ainsi, si nous comparons les études à court et à long-terme, nous pouvons proposer que *T. weissflogii* aurait mis en place au moins deux stratégies faisant intervenir d'une part des économies transcriptionnelles et d'autre part des ajustements métaboliques. Cependant, mes résultats ne nous permettent pas de trancher sur l'existence d'autres stratégies de réponse ni même de proposer un mécanisme général de mise en place des processus d'acclimatation chez les diatomées. Dans ce but, il aurait été important d'accroître la résolution temporelle de la cinétique d'acclimatation à différents temps entre 5 jours et 2 années.

Cependant, même si à long-terme les cellules à 21 psu présentaient une fitness proche de celles à 35 psu, nous avons pu constater certaines "aberrations" morphologiques. En effet, contrairement aux cellules acclimatées pendant 5 jours et 10 semaines (Chapitres II et IV), les cellules ayant passé deux années dans un milieu hyposalin présentent des fulcra centraux décalés vers les bords de la valve. Etant donné que les premières étapes de la formation des valves chez les diatomées centriques consisteraient en un processus de biominéralisation radiale (des fulcra centraux vers les bords de la cellule) (Hildebrand et al 2006, Hildebrand et al 2009), ce décentrage pourrait s'expliquer par des altérations précoces de ce processus. En lien avec ces observations, nous proposons que l'activité du cytosquelette, l'adressage des vésicules vers la SDV et/ou la position du MTOC (Microtubule-Organizing Center) puissent expliquer ce décentrage. Cependant, il ne faut pas oublier que certaines modifications épigénétiques sont relativement stables dans le temps et que des modifications de la morphologie des valves n'étaient observées que pour 37 % des cellules à 21 psu suggérant peut-être l'existence d'une sous-population.

Même si l'état actuel des données ne permet pas de trancher réellement, il serait aussi très intéressant de replacer les cellules acclimatées à des faibles salinités (21 et 28 psu) dans la condition témoin (35 psu). Nous pourrions nous attendre à 2 grands types de réponses :

(1) Après un temps plus ou moins long, la physiologie, la morphologie et le profil transcriptomique reviennent vers l'état d'équilibre initial signifiant que les modifications observées résultaient d'un processus d'acclimatation et non pas d'un processus d'adaptation (Figure D-2a) ;

(2) Les cellules ne reviennent pas à l'état initial ce qui suggère qu'elles sont désormais adaptées à leur nouveau milieu de vie avec certaines modifications "fixées" dans le génome (Figure D-2b).

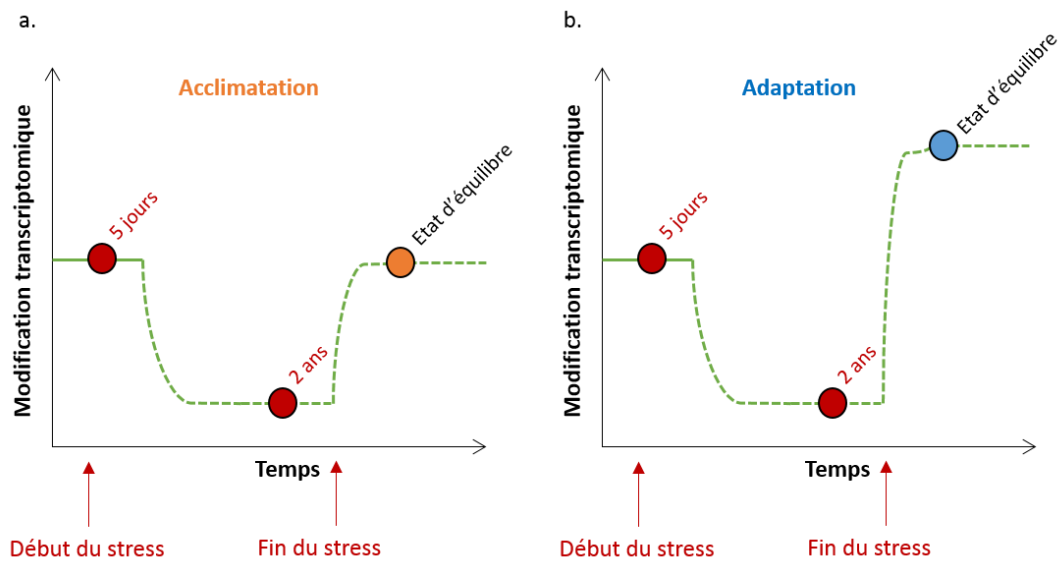


Figure D-2 : Représentation schématique des évolutions possibles du profil transcriptomique de *T. weissflogii*.

L'hypothèse qui me semble la plus probable serait qu'il s'agit d'un processus d'acclimatation. Après deux années passées dans des salinités réduites, environ 700 générations différentes se sont succédées ce qui me semble faible pour qu'un processus d'adaptation ait eu lieu. Si nous prenons l'exemple de *Chlamydomonas reinhardtii*, cette algue verte ne présente aucune adaptation phénotypique après avoir passé 1000 générations dans un milieu avec une valeur de pCO_2 élevée ($pCO_2 = 1\ 050$ ppm, soit plus de deux fois la valeur atmosphérique actuelle) (Collins and Bell 2004). Une analyse phylogénétique des génomes de bactéries a permis de montrer qu'une souche d'*Escherichia coli*, mise en culture dans un milieu appauvri en glucose, présente deux lignées différentes au bout de 30 000 générations et que ces deux lignées persistaient au-delà de 40 000 générations traduisant alors un processus d'adaptation (Wielgoss et al 2013).

3. Stratégies d'acclimatation selon les espèces

Des espèces de microalgues appartenant à un même genre peuvent présenter des types d'adaptations spécifiques en fonction de leurs milieux de vie (Brand 1984 , Kirst 1990 , Roubeix et al 2014). L'un des exemples les plus connus chez les diatomées correspond aux modifications acquises au niveau de l'architecture photosynthétique pour la diatomée océanique *T. oceanica* qui, contrairement à la diatomée côtière *T. weissflogii*, permettent d'utiliser une quantité plus faible de fer pour une même efficacité photosynthétique (Strzepek and Harrison 2004). Les conditions environnementales semblent être l'un des facteurs majoritaires contraignant la mise en place de processus spécifiques d'acclimatation et/ou de la sélection d'écotypes. Dans la chapitre IV, mes résultats suggèrent que *T. weissflogii* et *T. oceanica* présentent relativement peu de modifications de leur fitness, de leur morphologie et de la dynamique du processus de biominéralisation en fonction du couplage pH/salinité. Ces résultats sont assez surprenants pour l'espèce *T. oceanica* car nous pouvions imaginer que des variations de pH et surtout de la salinité sont rares dans les écosystèmes océaniques. Les études des profils transcriptomiques montrent des réponses différentes face à ces deux stress. L'effort de transcription en réponse à ces facteurs semble plus important en fonction du gradient pH chez *T. weissflogii* et en fonction du gradient salin chez *T. oceanica*. Chez les embryophytes, l'étude de Zhang *et coll.* sur deux espèces de pins (*Populus euphratica* Oliv and *P. pruinosa* Schrenk) a montré des différences importantes dans l'expression des gènes pouvant traduire la mise en place de divergences au cours de leur évolution quant aux réponses géniques (Zhang et al 2014). Cependant, contrairement à l'étude sur les pins, nous avons constaté que chez les deux espèces de *Thalassiosira* étudiées, les gènes orthologues présentaient des variations d'expression spécifiques en fonction de l'espèce considérée. Même si les gènes orthologues partagent une origine commune, l'évolution de ces deux espèces aurait permis de modifier la réponse des gènes orthologues face à un même stress. Ainsi, nous pouvons imaginer qu'outre des différences de leurs séquences régulatrices (promoteur, stabilité, présence d'introns, ...), l'activité et/ou la spécificité de certains gènes orthologues aient pu évoluer. La régulation du pHi me semble être un bon exemple pour illustrer cette divergence. Il serait donc intéressant d'étudier le degré de conservation des séquences mais aussi l'activité des protéines correspondantes aux gènes codant pour les pyrophosphatases et les ATPases vacuolaires, dont l'évolution a été traitée dans le Chapitre III. Ces gènes sont probablement des acteurs clés dans la régulation du pHi chez ces *Thalassiosira* et, par extension, à l'ensemble des diatomées.

En plus d'approfondir ces premiers résultats et interprétations, il serait intéressant d'intégrer une troisième espèce du genre *Thalassiosira* évoluant dans le même écosystème que *T. weissflogii* ou *T. oceanica*. La diatomée *Thalassiosira guillardii* me semble être un candidat intéressant dans la mesure où elle est considérée comme une diatomée côtière (Trigueros and Orive 2000) et qu'elle est très proche phylogénétiquement de *T. weissflogii* (Alverson et al 2011). Cette diatomée additionnelle pourrait nous permettre d'affiner nos études sur l'acclimatation des diatomées tout en considérant tant l'influence du milieu de vie des cellules que la durée depuis laquelle les souches ont divergé.

B. Cinétique du processus de biominéralisation

L'étude *in vivo* du processus de biominéralisation est une analyse originale développée au laboratoire. Cette étude consiste à analyser la cinétique de formation des valves. A partir du protocole initial décrit par Herve *et coll.* (Herve et al 2012), des étapes d'optimisation du protocole, de modifications techniques et l'utilisation d'un nouveau fluorophore (NBD-N2), marquant spécifiquement la biominéralisation du silicium dans la SDV, ont permis d'obtenir pour la première fois une cinétique complète du processus.

Etant donné que les cinétiques de *T. weissflogii* et *T. oceanica* présentent un profil très similaire, nous pouvons proposer que la dynamique du processus de biominéralisation serait conservée au sein des *Thalassiosira*. Après l'initiation de la SDV, le signal de fluorescence va augmenter de manière exponentielle (polymérisation du silicium en silice biogénique), décroître transitoirement avant d'augmenter de nouveau jusqu'à se stabiliser (exocytose des nouvelles valves synthétisées). Néanmoins, j'ai pu montrer que la dynamique diffère chez au moins une autre espèce de diatomées centrées. En effet, la cinétique de *Coscinodiscus sp.* ne présente pas exactement le même profil (Figure D-3). La différence majeure existante entre les cinétiques des 2 espèces de *Thalassiosira* et celle de *Coscinodiscus sp.* est marquée par l'absence, chez cette dernière, de la phase de décroissance transitoire du signal de fluorescence. Herve *et coll.*, interprètent cette décroissance comme une diminution du volume de la SDV et/ou une alcalinisation transitoire du pH intra-SDV (Herve et al 2012). Même si l'état actuel des connaissances ne permet pas de trancher entre ces deux hypothèses, une alcalinisation du pH intra-SDV me semble l'hypothèse la plus probable et serait une étape originale et importante dans le processus de biominéralisation chez les *Thalassiosira*. Chez le genre *Coscinodiscus*,

il a été proposé que la formation du pattern des valves ferait intervenir un processus dit de séparation de phase (Sumper 2002), alors que chez les *Thalassiosira* nous pourrions plutôt imaginer que le pattern résulterait à la fois d'un processus de type diffusion limitée et aggrégation (DLA) (Parkinson et al 1999) et d'un processus de séparation de phases. Si tel est le cas, nous pourrions imaginer que le passage d'un type de processus à l'autre serait peut-être permis par un changement de pH intra-SDV. Cette variation pourrait également faciliter la polycondensation du silicium ou modifier les interactions entre protéines/peptides et d'autres molécules impliquées dans sa polycondensation.

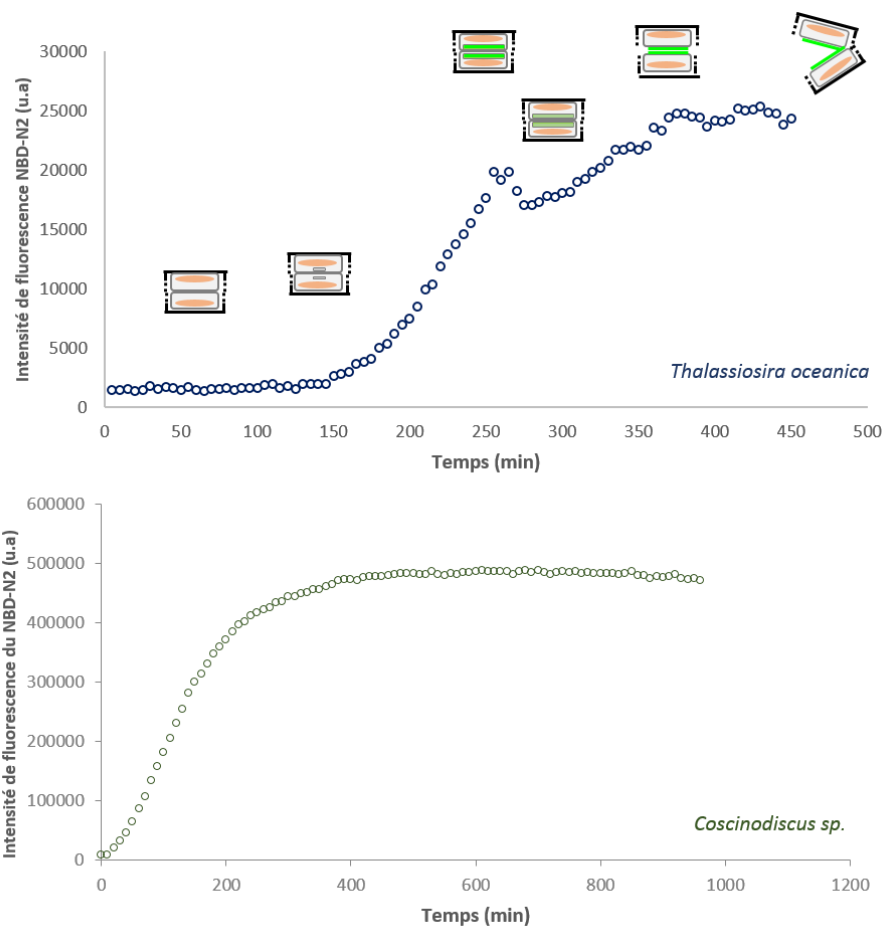


Figure D-3 : Cinétique du processus de biominéralisation observée chez les diatomées *T. oceanica* (en haut) et *Coscinodiscus sp.* (en bas).

Par ailleurs, l'étude de Vartanian *et coll.*, tend à montrer qu'il existe un contrôle qualitatif du processus de biominéralisation par les V-ATPases (Vartanian et al 2009). Même si cette étude ne permet pas de relier directement des modifications de pH intra SDV via les V-ATPases, elle suggère l'existence d'un lien potentiellement important entre la régulation du pH cellulaire et le processus de biominéralisation. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier la localisation des différentes sous-

unités des V-ATPases par transformation nucléaire (voir aussi Chapitre III) chez les *Thalassiosira*. Cependant, malgré les quelques tentatives de transformation nucléaire que j'ai réalisées, *T. weissflogii* ne serait pas une espèce facile à transformer et seules des transformations transitoires ont été reportées (Falciatore et al 1999). Une autre possibilité de tester l'existence de variations du pH intra SDV serait d'utiliser conjointement deux fluorophores marquant spécifiquement cette vésicule : le NBD-N2 et un autre fluorophore dont l'intensité de fluorescence dépend du pH comme le DND-160 (Descles et al 2008). La différence d'intensité des deux fluorophores au moment de la décroissance du signal pourrait nous renseigner sur une potentielle variation du pH intra-SDV.

Ces études en partie pionnières sur la régulation du pHi chez les diatomées et son implication sur le processus de biominéralisation du silicium ouvrent aussi de nouvelles questions sur le rôle de la vacuole et des différents transporteurs à protons chez les diatomées.

Annexes

Annexe 1 : Script correspondant à la macro ImageJ développée pour quantifier l'intensité du signal de fluorescence GFP et mesurer l'aire de chaque cellule. Cette macro fait appel à des piles d'images GFP et TRANS-OPEN et des positions x et y de chaque cellule pour tous les temps. Cette macro a été développée en collaboration avec Patricia Wills (MNHN).

```

1
2 directory = getDirectory("Choisir le dossier d'export des résultats ");
3 run("Set Measurements...", "area mean min integrated redirect=None decimal=3");
4
5 tablePath = File.openDialog("Choisir le tableur excel");
6 //print(tablePath);
7 open(tablePath);
8
9 //print(nResults);
10
11 nbLignes = nResults;
12
13 xpos = newArray(nResults);
14 ypos = newArray(nResults);
15 nr = newArray(nResults);
16
17 for(ligne=0; ligne<nResults; ligne++)
18 {
19
20
21     xpos[ligne]=getResult("x [pixel]", ligne);
22     ypos[ligne]=getResult("y [pixel]", ligne);
23     nr[ligne]=getResult("Nr", ligne);
24
25 }
26
27
28
29 //-----
30 // sur l'image TRANS-OPEN
31 stack_transPath = File.openDialog("Choisir le fichier TRANS-OPEN");
32 open(stack_transPath);
33 rename("Stack_trans.tif");
34 selectWindow("Stack_trans.tif");
35
36 compteur = 1;
37
38 for(ligne=0; ligne<nbLignes; ligne++)
39 {
40     selectWindow("Stack_trans.tif");
41
42     if(xpos[ligne]!=-1)
43     {
44         xposBoucle=xpos[ligne]-20;
45         yposBoucle=ypos[ligne]-20;
46         run("Specify...", "width=40 height=40 x="+xposBoucle+" y="+yposBoucle+" slice="+nr[ligne]);
47         run("Duplicate...", "title=roi_"+compteur);
48
49         setMinAndMax(280, 394);
50         run("8-bit");
51         setThreshold(0, 1);
52         setOption("BlackBackground", false);
53         run("Convert to Mask", "method=Default background=Light");
54         run("Analyze Particles...", "size=300-Infinity display include");
55
56     }
57
58     compteur = compteur+1;
59 }
60
61 run("Images to Stack", "name=Stack title=roi use");
62 saveAs("Tiff", directory+ "roi_stack_binary.tif");
63
64 selectWindow("Stack_trans.tif");
65 close();
66
67 saveAs("Results", directory + "MesureAire.xls");
68 selectWindow("Results");
69 run("Clear Results");
70 close();
71

```

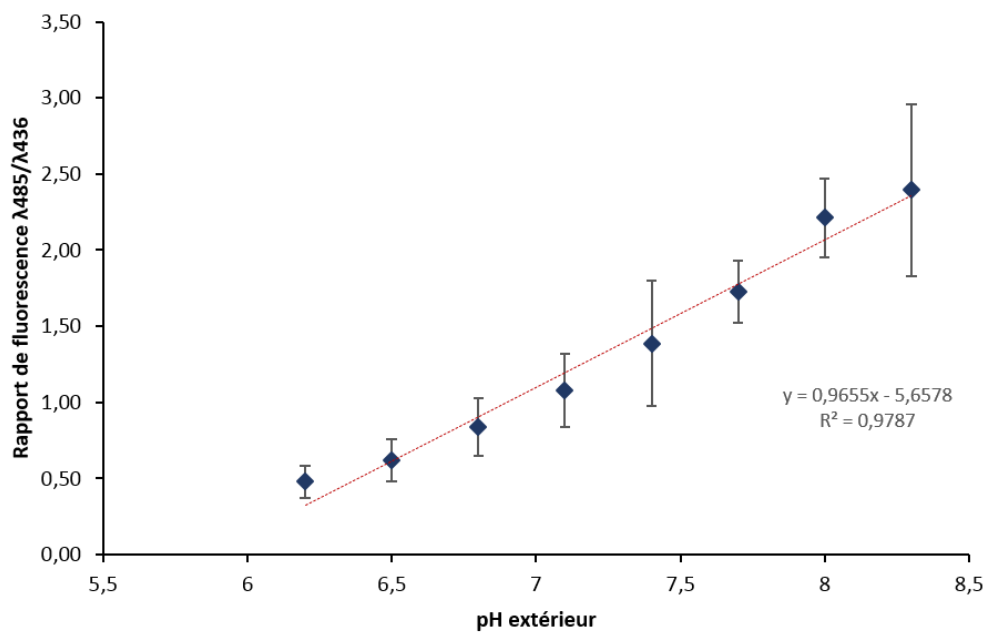
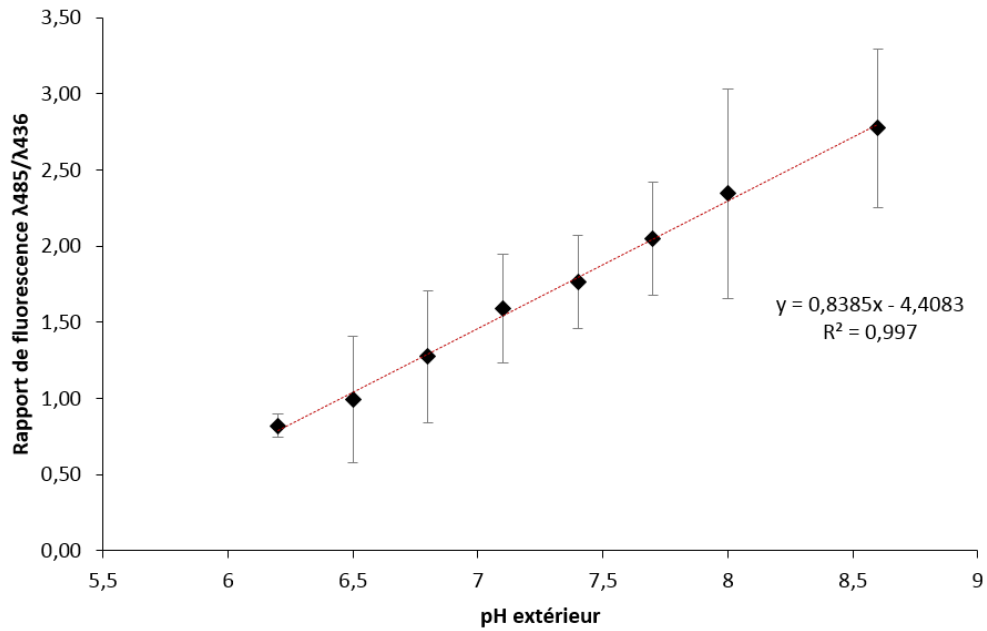


```

72 //-----
73 //sur l'image GFP
74 stack_GFPPath = File.openDialog("Choisir le fichier GFP");
75 open(stack_GFPPath);
76 rename("Stack_GFP.tif");
77
78 selectWindow("Stack_GFP.tif");
79
80 compteur=0;
81
82 for(ligne=0;ligne<nbLignes;ligne++)
83 {
84     selectWindow("Stack_GFP.tif");
85
86     if(xpos[ligne]!=-1)
87     {
88         xposBoucle=xpos[ligne]-20;
89         yposBoucle=ypos[ligne]-20;
90         run("Specify...", "width=40 height=40 x="+xposBoucle+" y="+yposBoucle+" slice="+nr[ligne]);
91         run("Measure");
92         run("Duplicate...", "title=roi_"+compteur);
93     }
94
95     compteur++;
96
97 }
98
99
100 saveAs("Results", directory + "MesureFluo.xls");
101 run("Images to Stack", "name=Stack title=roi use");
102 saveAs("Tiff", directory+ "roi_stack_fluo.tif");
103 close();
104

```

Annexe 2 : Gamme *in situ* des cellules marquées au BCECF-AM (5 μ M) ayant été traitée avec des ionophores permettant d'équilibrer le pH cytosolique avec le pH environnement. La gamme *in situ* du dessus correspond à celle de *T. weissflogii* et celle du dessous à celle de *T. oceanica*. Ces données correspondent à $15 \leq n \leq 20$ cellules analysées pour chacun des deux réplicats biologiques.



Annexe 3 : Ce tableau présente l'influence du pH_e et de la salinité sur la morphologie des valves de *T. weissflogii* au niveau nanoscopique. Les moyennes et les écart-types (Sd) sont représentés pour chaque paramètre étudié.

	Salinité (psu)	pH _e	L (μm)		R (μm)		d1 (μm)		d2 (μm)		δ (%)	
			Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd	Moyenne	Sd
			<i>T. weissflogii</i>									
	21	7,7	0,199	0,024	0,015	0,002	0,068	0,003	0,144	0,010	0,084	0,016
		8,1	0,184	0,020	0,015	0,001	0,067	0,003	0,122	0,015	0,092	0,015
		8,5	0,179	0,022	0,016	0,001	0,068	0,004	0,134	0,013	0,156	0,200
	28	7,7	0,194	0,021	0,016	0,001	0,070	0,003	0,127	0,016	0,103	0,015
		8,1	0,190	0,019	0,015	0,001	0,067	0,002	0,125	0,015	0,105	0,015
		8,5	0,176	0,015	0,015	0,001	0,069	0,006	0,126	0,013	0,149	0,226
	35	7,7	0,187	0,030	0,014	0,002	0,067	0,005	0,116	0,012	0,098	0,023
		8,1	0,189	0,027	0,014	0,002	0,072	0,008	0,140	0,020	0,075	0,023
		8,5	0,182	0,036	0,015	0,003	0,073	0,010	0,126	0,016	0,094	0,036

Annexe 4 : Tableau présentant l'expression des gènes codant pour des transporteurs à protons chez *T. weissflogii* et *T. oceanica* en réponse au couplage pH / salinité. Les différentes familles de transporteurs à protons significativement dérégulées sont : H⁺,Na⁺-translocating pyrophosphatase (M⁺-PPase), H⁺ or Na⁺ translocating F-type, V-type and A-type ATPase superfamily (F-ATPase), H⁺ or Na⁺ -translocating NADH dehydrogenase family (NDH) et H⁺-translocating quinol:cytochrome c reductase superfamily (QCR).

Espèces	Identité gène	Famille	Gene expression									p _{adj}
			35-7,7	35-8,1	35-8,5	28-7,7	28-8,1	28-8,5	21-7,7	21-8,1	21-8,5	
<i>T. weissflogii</i>	Tw_15076	F-ATPases	46,3	360,9	49,5	57,1	199,2	128,8	67,8	93,6	58,2	1,00E-03
	Tw_1813	F-ATPases	2853,3	1409,6	1155,1	3306,4	1265,4	704,4	2604,7	1091,6	567,6	4,10E-02
	Tw_26471	F-ATPases	3288,1	1893,4	843,0	4632,7	1406,3	1097,7	4093,1	1482,2	1022,2	1,80E-02
	Tw_26536	F-ATPases	1402,2	810,7	385,0	2243,3	453,4	524,7	1641,3	550,7	450,1	8,00E-03
	Tw_36724	F-ATPases	6542,8	3519,1	1227,3	11944,6	2374,2	2203,1	21206,8	5150,2	2114,9	0,00E+00
	Tw_6640	F-ATPases	181,4	775,6	235,8	167,4	664,2	333,1	210,6	266,8	184,7	4,70E-02
	Tw_7817	F-ATPases	72,0	471,7	63,9	74,4	247,1	134,8	67,8	101,0	49,3	0,00E+00
	Tw_9011	M ⁺ -Ppase	567,3	378,5	93,5	772,1	568,5	236,5	649,0	314,2	162,3	2,00E-02
	Tw_1254	NDH	2041,6	1018,0	577,6	2805,4	692,5	784,9	2785,0	908,1	715,4	1,80E-02
	Tw_18030	NDH	2413,4	1785,9	1144,8	4087,9	791,7	1135,9	4651,3	1735,4	933,7	1,50E-02
	Tw_18166	NDH	163,4	69,1	28,9	219,3	57,6	49,2	119,7	37,0	22,4	2,00E-03
	Tw_24090	NDH	21456,4	10691,0	3368,4	33671,6	5203,5	4764,8	29501,2	6386,0	4473,9	0,00E+00
	Tw_28668	NDH	1519,3	1081,6	390,5	2295,1	658,0	609,5	2339,3	763,9	568,8	1,60E-02
	Tw_32485	NDH	10386,7	4523,9	1461,8	14859,0	2048,3	2077,6	11535,1	2472,2	1655,9	0,00E+00
	Tw_40939	NDH	254,7	70,2	46,1	342,9	77,0	46,6	139,9	59,8	50,4	1,00E-03
	Tw_4834	NDH	816,9	639,5	237,9	1112,3	209,9	245,8	980,7	280,9	156,7	1,00E-03
	Tw_15978	P-ATPase	217,4	198,5	186,3	33,2	62,9	37,3	8,7	16,6	4,5	0,00E+00
	Tw_33979	QCR	0,0	16,5	0,0	1,3	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	1,80E-02
Tw_4560	QCR	1853,8	930,2	552,1	2090,4	727,0	404,3	2033,6	661,6	388,5	7,00E-03	
<i>T. oceanica</i>	THAOC_04093	P-ATPase	12,9	25,7	11,0	1,1	3,0	1,7	0,0	0,0	0,0	1,91E-03
	THAOC_07445	P-ATPase	5,9	21,6	1,2	1,1	1,0	0,8	0,0	0,0	0,8	4,36E-02
	THAOC_32021	POT	20,0	24,3	22,0	16,0	10,1	13,5	13,1	44,2	86,0	8,18E-03

Abréviations et symboles

Abréviations :

AC : anhydrase carbonique

ACP : analyse en composantes principales

AFC : analyse factorielle des correspondances

ANOVA : analysis of variance

BSi : silice biogénique

Caro : β -carotène

CDCA : cadmiun carbonic anhydrase

cds : coding DNA sequence

Chl_a : chlorophylle *a*

Chl_b : chlorophylle *b*

Chl_c : chlorophylle *c*

CI : carbohydate interne

CCM : carbon concentrating mechanisms

CO₂ aq : CO₂ dissous

CO₂ air : CO₂ atmosphérique

CR : centre réactionnel de la photosynthèse

DCG : diatom core gene

DD : diadinoxanthine

DIC : dissolved inorganic carbon

DSi : dissolved silicon

DT : diatoxanthine

EC : enzyme code

EGT : endosymbiotic gene transfer

EPS : extrapolymeric substances

EST : expressed sequence tag

ETs : éléments transposables

GO : gene ontology

H⁺-ATPase : pyrophosphatase vacuolaire

HGT : horizontal gene transfer

HPLC : high-performance liquid chromatography

InCR : incorporation rate of silicon

KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes

LHA : light harvesting antenna

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscope électronique à transmission

MTs : membrane transporters

NGS : next generation sequencing

PAM : pulse-amplitude modulation

pCO₂ : pression partielle en CO₂

pHe : pH extérieur

pHi : pH cytosolique

pHv : pH vacuolaire

ppm : partie par million

PSI : photosystème I

PSII : photosystème II

psu : practical salinity unit

reads : séquences issues du séquençage

RNA-Seq : RNA sequencing

ROI : region of interest

SDV : silica deposition vesicule

Sii : silicium intracellulaire

SIT : silicon transporter

TCG : thalassiosira core gene

TEP : transparent exopolymer particles

UV : rayons ultraviolet

V-ATPase : transporteur à protons vacuolaire

Eopt : intensité lumineuse optimale du PSII

ETR : taux de transport d'électrons du PSII

Ex : longueur d'onde d'excitation

Fv/Fm : rendement quantique du PSII

NFc : nombre de fultoportulae centraux

NFm : nombre de fultoportulae marginaux

PPS : pourcentage de plaques siliceuses

Pr : precision

Symboles :

α : efficacité photosynthétique

σ : coefficient de corrélation de Pearson

σ_{PSII} : l'absorption fonctionnelle du PSII

λ : longueur d'onde

Acc : accuracy

DFc : distance entre les fultoportulae centraux

DFm : distance entre les fultoportulae marginaux

Ek : saturation lumineuse

Em : longueur d'onde d'émission

Bibliographie

-A-

Adams C, Bugbee B (2014). Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. *J Appl Phycol* **26**: 1351-1357.

Admiraal W (1977). Salinity tolerance of benthic estuarine diatoms as tested with a rapid polarographic measurement of photosynthesis. *Mar Biol* **39**: 11-18.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Bio* **11**: 545-555.

Al-Handal AY, Wulff A (2008). Marine epiphytic diatoms from the shallow sublittoral zone in Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Bot Mar* **51**: 411-435.

Aletsee L, Jahnke J (1992). Growth and productivity of the psychrophilic marine diatoms *Thalassiosira antarctica* comber and *Nitzschia-frigida* grunow in batch cultures at temperatures below the freezing-point of sea-water. *Polar Biol* **11**: 643-647.

Alkawri AAS, Ramaiah N (2010). Spatio-temporal variability of dinoflagellate assemblages in different salinity regimes in the west coast of India. *Harmful Algae* **9**: 153-162.

Allan AK, Du J, Davies SA, Dow JAT (2005). Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. *Physiol Genomics* **22**: 128-138.

Allen AE, Vardi A, Bowler C (2006). An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Current opinion in plant biology* **9**: 264-273.

Allen AE, Dupont CL, Obornik M, Horak A, Nunes-Nesi A, McCrow JP *et al* (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* **473**: 203-+.

Alverson AJ (2007). Strong purifying selection in the silicon transporters of marine and freshwater diatoms. *Limnol Oceanogr* **52**: 1420-1429.

Alverson AJ, Beszteri B, Julius ML, Theriot EC (2011). The model marine diatom *Thalassiosira pseudonana* likely descended from a freshwater ancestor in the genus *Cyclotella*. *Bmc Evol Biol* **11**.

Alverson AJ (2014). Timing marine-freshwater transitions in the diatom order Thalassiosirales. *Paleobiology* **40**: 91-101.

Amato A, Orsini L, D'Alelio D, Montresor M (2005). Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **41**: 542-556.

Amo YD, Brzezinski MA (1999). The chemical form of dissolved Si taken up by marine diatoms. *J Phycol* **35**: 1162-1170.

Annenkov VV, Danilovtseva EN, Zelinskiy SN, Basharina TN, Safonova TA, Korneva ES *et al* (2010). Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Anal Biochem* **407**: 44-51.

Apt KE, KrothPancic PG, Grossman AR (1996). Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular & General Genetics* **252**: 572-579.

Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R *et al* (2002). In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *Journal of cell science* **115**: 4061-4069.

Araki Y, Gonzalez EL (1998). V- and P-type Ca²⁺-stimulated ATPases in a calcifying strain of *Pleurochrysis* sp. (Haptophyceae). *J Phycol* **34**: 79-88.

Araujo CVM, Romero-Romero S, Lourencato LF, Moreno-Garrido I, Blasco J, Gretz MR *et al* (2013). Going with the flow: detection of drift in response to hypo-saline stress by the estuarine benthic diatom *Cylindrotheca closterium*. *PLoS one* **8**.

Armbrust EV (1999). Identification of a new gene family expressed during the onset of sexual reproduction in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Applied and environmental microbiology* **65**: 3121-3128.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH *et al* (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**: 79-86.

Armbrust EV (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* **459**: 185-192.

-B-

Badger MR, Hanson D, Price GD (2002). Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Funct Plant Biol* **29**: 161-173.

Baek SH, Jung SW, Shin K (2011). Effects of temperature and salinity on growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) isolated from ballast water. *J Freshwater Ecol* **26**: 547-552.

Bauer JE, Cai WJ, Raymond PA, Bianchi TS, Hopkinson CS, Regnier PAG (2013). The changing carbon cycle of the coastal ocean. *Nature* **504**: 61-70.

Baumgartner J, Morin G, Menguy N, Gonzalez TP, Widdrat M, Cosmidis J *et al* (2013). Magnetotactic bacteria form magnetite from a phosphate-rich ferric hydroxide via nanometric ferric (oxyhydr)oxide intermediates. *P Natl Acad Sci USA* **110**: 14883-14888.

Bazin P, Jouenne F, Friedl T, Deton-Cabanillas AF, Le Roy B, Veron B (2014). Phytoplankton diversity and community composition along the estuarine gradient of a temperate macrotidal ecosystem: combined morphological and molecular approaches. *PLoS one* **9**.

Beardall J, Raven JA (2004). The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* **43**: 26-40.

Becker B, Hickisch A (2005). Inhibition of contractile vacuole function by brefeldin A. *Plant Cell Physiol* **46**: 201-212.

Bedoshvili YD, Popkova TP, Likhoshway YV (2009). Chloroplast structure of diatoms of different classes. *Cell Tiss Biol* **3**: 297-310.

Belogurov GA, Lahti R (2002). A lysine substitute for K⁺ - A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 49651-49654.

Bender SJ, Durkin CA, Berthiaume CT, Morales RL, Armbrust EV (2014). Transcriptional responses of three model diatoms to nitrate limitation of growth. *Frontiers in Marine Science* **1**.

Bethmann B, Schonknecht G (2009). pH regulation in an acidophilic green alga - a quantitative analysis. *New Phytologist* **183**: 327-339.

Bhattacharyya P, Volcani BE (1980). Sodium-dependent silicate transport in the apochlorotic marine diatom *Nitzschia alba*. *P Natl Acad Sci USA* **77**: 6386-6390.

Blanc G, Wolfe KH (2004). Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**: 1667-1678.

Boissonneault KR, Henningsen BM, Bates SS, Robertson DL, Milton S, Pelletier J *et al* (2013). Gene expression studies for the analysis of domoic acid production in the marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Bmc Mol Biol* **14**.

Bolhuis H, Fillinger L, Stal LJ (2013). Coastal microbial mat diversity along a natural salinity gradient. *PLoS one* **8**.

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A *et al* (2008). The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239-244.

Bowler C, De Martino A, Falciatore A (2010). Diatom cell division in an environmental context. *Current opinion in plant biology* **13**: 623-630.

Boyd PW, Trull TW (2007). Understanding the export of biogenic particles in oceanic waters: is there consensus? *Prog Oceanogr* **72**: 276-312.

Brand LE (1984). The salinity tolerance of 46 marine-phytoplankton isolates. *Estuar Coast Shelf S* **18**: 543-556.

Bricaud A, Babin M, Morel A, Claustre H (1995). Variability in the chlorophyll-specific absorption-coefficients of natural phytoplankton - analysis and parameterization. *J Geophys Res-Oceans* **100**: 13321-13332.

Brotas V, Plante-Cuny MR (2003). The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecol* **24**: S109-S115.

Brown AD (1976). Microbial Water Stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803-846.

Bruning A, Gaitan-Espitia JD, Gonzalez A, Bartheld JL, Nespolo RF (2013). Metabolism, growth, and the energetic definition of fitness: a quantitative genetic study in the land snail *Cornu aspersum*. *Physiol Biochem Zool* **86**: 538-546.

Brzezinski MA, Olson RJ, Chisholm SW (1990). Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Mar Ecol Prog Ser* **67**: 83-96.

Burkhardt S, Amoroso G, Riebesell U, Sultemeyer D (2001). CO₂ and HCO₃⁻ uptake in marine diatoms acclimated to different CO₂ concentrations. *Limnol Oceanogr* **46**: 1378-1391.

Bussard A, Lopez PJ (2014). Evolution of vacuolar pyrophosphatases and vacuolar H⁺-ATPases in diatoms. *J Mar Sci Tech-Taiw* **22**: 50-59.

Bussard A, Corre E, Hubas C, Duvernois-Berthet E, Lecorguille G, Jourden L *et al* (Submitted). Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in acclimation to salinity gradients in diatoms.

-C-

Caldeira K, Wickett ME (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* **425**: 365-365.

Camburn KE (1982). Subaerial diatom communities in Eastern Kentucky. *T Am Microsc Soc* **101**: 375-387.

Canfield DE, Kristensen E, Thamdrup B (2005). Aquatic Geomicrobiology. *Elsevier, San Diego, California*.

Cavalier-Smith T, Chao EE (1996). 18S rRNA sequence of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae), and the phylogeny of heterokont algae (Ochrophyta). *Phycologia* **35**: 500-510.

Cavalier-Smith T (2002). Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Current Biology* **12**: R62-R64.

Chaffey N (2011). All flesh is grass. Plant–animal interrelationships. *Ann Bot-London* **108**: vii-vii.

Chan CX, Reyes-Prieto A, Bhattacharya D (2011). Red and green algal origin of diatom membrane transporters: insights into environmental adaptation and cell evolution. *PLoS one* **6**.

Chan CX, Bhattacharya D, Reyes-Prieto A (2012). Endosymbiotic and horizontal gene transfer in microbial eukaryotes: impacts on cell evolution and the tree of life. *Mobile genetic elements* **2**: 101-105.

Cheng RL, Feng J, Zhang BX, Huang Y, Cheng J, Zhang CX (2014). Transcriptome and gene expression analysis of an oleaginous diatom under different salinity conditions. *Bioenerg Res* **7**: 192-205.

Chepurnov VA, Mann DG, Sabbe K, Vyverman W (2004). Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *Int Rev Cytol* **237**: 91-154.

Chepurnov VA, Mann DG, von Dassow P, Vanormelingen P, Gillard J, Inze D *et al* (2008). In search of new tractable diatoms for experimental biology. *Bioessays* **30**: 692-702.

Chi W, He B, Jiang J, Zhang L (2015). Plastid sigma factors: their individual functions and regulation in transcription. *Biochimica et biophysica acta* **1847**: 0-8.

Claquin P, Probert I, Lefebvre S, Veron B (2008). Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat Microb Ecol* **51**: 1-11.

Clavero E, Hernandez-Marine M, Grimalt JO, Garcia-Pichel F (2000). Salinity tolerance of diatoms from thalassic hypersaline environments. *J Phycol* **36**: 1021-1034.

Cloern JE, Cole BE, Wong RLJ, Alpine AE (1985). Temporal dynamics of estuarine phytoplankton - a case-study of San-Francisco Bay. *Hydrobiologia* **129**: 153-176.

Cohn SA, Zelner D, Crea J, Wibisono B, Silverman M (1999). Analysis of diatom motility using light avoidance and fluorescent bend assays. *Mol Biol Cell* **10**: 264a-264a.

Cohn SA, Farrell JF, Munro JD, Ragland RL, Weitzell RE, Wibisono BL (2003). The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion. *Diatom Res* **18**: 225-243.

Collen J, Davison IR (1999). Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell and Environment* **22**: 1143-1151.

Collins S, Bell G (2004). Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga. *Nature* **431**: 566-569.

Connolly JA, Oliver MJ, Beaulieu JM, Knight CA, Tomanek L, Moline MA (2008). Correlated evolution of genome size and cell volume in diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol* **44**: 124-131.

Coquille N, Jan G, Moreira A, Morin S (2015). Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat Toxicol* **158**: 202-210.

Corstjens PLAM, Araki Y, Gonzalez EL (2001). A coccolithophorid calcifying vesicle with a vacuolar-type ATPase proton pump: cloning and immunolocalization of the V-0 subunit c(1). *J Phycol* **37**: 71-78.

Cox E (2011). Morphology, cell wall, cytology, ultrastructure and morphogenetic studies. *The Diatom World*. Springer Netherlands. pp 21-45.

Crawford KJ, Raven JA, Wheeler GL, Baxter EJ, Joint I (2011). The response of *Thalassiosira pseudonana* to long-term exposure to increased CO₂ and decreased pH. *PLoS one* **6**.

Cullen JJ (1985). Diel vertical migration by dinoflagellates: roles of carbohydrate metabolism and behavioral flexibility. *Contr Mar Sci* **27**: 135-152.

Curnow P, Senior L, Knight MJ, Thamatrakoln K, Hildebrand M, Booth PJ (2012). Expression, purification, and reconstitution of a diatom silicon transporter. *Biochemistry* **51**: 3776-3785.

-D-

De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y (2005). Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends Ecol Evol* **20**: 591-597.

De Miranda M, Gaviano M, Serra E (2005). Changes in the cell size of the diatom *Cylindrotheca closterium* in a hyperhaline pond. *Chem Ecol* **21**: 77-81.

De Riso V, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A (2009). Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic acids research* **37**.

- Des Marais DJ (2000). Evolution - When did photosynthesis emerge on earth? *Science* **289**: 1703-1705.
- Deschamps P, Moreira D (2012). Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome biology and evolution* **4**: 683-688.
- Descles J, Vartanian M, El Harrak A, Quinet M, Bremond N, Sapriel G *et al* (2008). New tools for labeling silica in living diatoms. *New Phytologist* **177**: 822-829.
- Diakov TT, Kane PM (2010). Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *The Journal of biological chemistry* **285**: 23771-23778.
- Ding LP, Ma YY, Huang BX, Chen SW (2013). Effects of seawater salinity and temperature on growth and pigment contents in *Hypnea cervicornis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Biomed Res Int*.
- Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A (2001). The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *P Natl Acad Sci USA* **98**: 2170-2175.
- Dittami SM, Scornet D, Petit JL, Segurens B, Da Silva C, Corre E *et al* (2009). Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. *Genome Biol* **10**.
- Dittami SM, Gravot A, Goulitquer S, Rousvoal S, Peters AF, Bouchereau A *et al* (2012). Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae). *Plant Journal* **71**: 366-377.
- Docampo R, Moreno SNJ (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium* **50**: 113-119.
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009). Ocean Acidification: the other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science* **1**: 169-192.
- Doron M, Babin M, Mangin A, Hembise O (2007). Estimation of light penetration, and horizontal and vertical visibility in oceanic and coastal waters from surface reflectance. *J Geophys Res-Oceans* **112**.
- Dorrell RG, Smith AG (2011). Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. *Eukaryot Cell* **10**: 856-868.
- Doucette GJ, King KL, Thessen AE, Dortch Q (2008). The effect of salinity on domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Nova Hedwigia*: 31-46.
- Downes-Tettmar N, Rowland S, Widdicombe C, Woodward M, Llewellyn C (2013). Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Cont Shelf Res* **53**: 40-49.

Drum RW, Pankratz HS (1964). Post mitotic fine structure of *Gomphonema parvulum*. *Journal of Ultrastructure Research* **10**: 217-223.

Du XN, Peterson WT (2014). Seasonal cycle of phytoplankton community composition in the coastal upwelling system off central Oregon in 2009. *Estuar Coast* **37**: 299-311.

Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010). AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research* **38**: W64-70.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* **28**: 350-356.

Dugdale TM, Willis A, Wetherbee R (2006). Adhesive modular proteins occur in the extracellular mucilage of the motile, pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biophysical journal* **90**: L58-L60.

Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG (1995). Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J Phycol* **31**: 1004-1012.

Durkin CA, Mock T, Armbrust EV (2009). Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryot Cell* **8**: 1038-1050.

Eilers PHC, Peeters JCH (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Model* **42**: 199-215.

-E-

Engel A, Passow U (2001). Carbon and nitrogen content of transparent exopolymer particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Mar Ecol Prog Ser* **219**: 1-10.

Espinosa MA, Hassan GS, Isla FI (2012). Diatom-inferred salinity changes in relation to Holocene sea-level fluctuations in estuarine environments of Argentina. *Alcheringa* **36**: 373-386.

-F-

Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C (1999). Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol* **1**: 239-251.

Falciatore A, Bowler C (2002). Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual review of plant biology* **53**: 109-130.

Falkowski P (2007). How the evolution of oceanic photosynthesis shaped the biogeochemistry of Earth. *Photosynth Res* **91**: 135-135.

Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O *et al* (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**: 354-360.

Feely RA, Sabine CL, Hernandez-Ayon JM, Ianson D, Hales B (2008). Evidence for upwelling of corrosive "acidified" water onto the continental shelf. *Science* **320**: 1490-1492.

Feng YY, Hare CE, Leblanc K, Rose JM, Zhang YH, DiTullio GR *et al* (2009). Effects of increased pCO₂ and temperature on the North Atlantic spring bloom. The phytoplankton community and biogeochemical response. *Mar Ecol Prog Ser* **388**: 13-25.

Ferrara MA, Dardano P, De Stefano L, Rea I, Coppola G, Rendina I *et al* (2014). Optical properties of diatom nanostructured biosilica in *Arachnoidiscus* sp: micro-optics from mother nature. *PloS one* **9**.

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237-240.

Figueiredo AG, Nittrouer CA, deAlencarCosta E (1996). Gas charged sediments in the Amazon submarine delta. *Geo-Mar Lett* **16**: 31-35.

Fischer H, Robl I, Sumper M, Kroger N (1999). Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **35**: 113-120.

Fogg GE (1996). Algae: An introduction to phycology *Nature* **381**: 660-660.

Forgac M (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Bio* **8**: 917-929.

Foster RA, Zehr JP (2006). Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of nifH, hetR and 16S rRNA sequences. *Environ Microbiol* **8**: 1913-1925.

Foster RA, Subramaniam A, Mahaffey C, Carpenter EJ, Capone DG, Zehr JP (2007). Influence of the Amazon River plume on distributions of free-living and symbiotic cyanobacteria in the western tropical north Atlantic Ocean. *Limnol Oceanogr* **52**: 517-532.

Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmuller H, Agre P *et al* (2002). Structure and function of water channels. *Current opinion in structural biology* **12**: 509-515.

Fukuda A, Tanaka Y (2006). Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter in barley. *Plant Physiol Bioch* **44**: 351-358.

-G-

Ganf GG, Oliver RL (1982). Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green-algae by blue-green-algae in the plankton of a stratified lake. *J Ecol* **70**: 829-844.

Garcia N, Lopez-Elias JA, Miranda A, Martinez-Porchas M, Huerta N, Garcia A (2012). Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Lat Am J Aquat Res* **40**: 435-440.

Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007). Plant proton pumps. *FEBS letters* **581**: 2204-2214.

Gensemer RW (1991). The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom *Asterionella ralfsii* var *americana*. *Limnol Oceanogr* **36**: 123-131.

George SK, Najera L, Sandoval RP, Countryman C, Davis RW, Ihler GM (1989). The hydrophobic domain of cytochrome-b5 is capable of anchoring beta-galactosidase in *Escherichia-coli* membranes. *Journal of bacteriology* **171**: 4569-4576.

Gillard J, Frenkel J, Devos V, Sabbe K, Paul C, Rempt M *et al* (2013). Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. *Angew Chem Int Edit* **52**: 854-857.

Goericke R, Welschmeyer NA (1992). Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J Phycol* **28**: 498-507.

Gould SB, Waller RR, McFadden GI (2008). Plastid evolution. *Annual review of plant biology* **59**: 491-517.

Graham LA, Powell B, Stevens TH (2000). Composition and assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase complex. *J Exp Biol* **203**: 61-70.

Graham LE, Wilcox LW (2000). *Algae*. Prentice Hall.

Green RB (2007). Evolution of light-harvesting antennas in an oxygen world. *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Academic Press: Burlington. pp 37-III.

Groger C, Sumper M, Brunner E (2008). Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*: solid-state Si-29 NMR and fluorescence microscopic studies. *J Struct Biol* **161**: 55-63.

Guern J, Felle H, Mathieu Y, Kurkdjian A (1991). Regulation of intracellular pH in plant-cells. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **127**: 111-173.

Guillou L, Moon-Van Der Staay SY, Claustre H, Partensky F, Vaulot D (1999). Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Applied and environmental microbiology* **65**: 4528-4536.

-H-

Haimovich-Dayan M, Garfinkel N, Ewe D, Marcus Y, Gruber A, Wagner H *et al* (2013). The role of C4 metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist* **197**: 177-185.

Hallegraeff GM, Bolch CJ (1992). Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships ballast water - implications for plankton biogeography and aquaculture. *J Plankton Res* **14**: 1067-1084.

Hama T, Miyazaki T, Ogawa Y, Iwakuma T, Takahashi M, Otsuki A *et al* (1983). Measurement of photosynthetic production of a marine-phytoplankton population using a stable ¹³C isotope. *Mar Biol* **73**: 31-36.

Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Pechtel K *et al* (2003). Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* **421**: 841-843.

Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS *et al* (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters* **9**: 228-241.

Hedrich R, Schroeder JI (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher-plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **40**: 539-569.

Hennon GMM, Quay P, Morales RL, Swanson LM, Armbrust EV (2014). Acclimation conditions modify physiological response of the diatom *Thalassiosira pseudonana* to elevated CO₂ concentrations in a nitrate-limited chemostat. *J Phycol* **50**: 243-253.

Hennon MM, Ashworth J, Groussman RD, Berthiaume C, Morales RL, Baliga NS *et al* (2015). Diatom acclimation to elevated CO₂ via cAMP signalling and coordinated gene expression. *Nature Climate Change*.

Herth W (1980). Chitin fibril formation in algae. *European journal of cell biology* **22**: 461-461.

Herve V, Derr J, Douady S, Quinet M, Moisan L, Lopez PJ (2012). Multiparametric analyses reveal the pH-dependence of silicon biomineralization in diatoms. *PloS one* **7**.

- Hildebrand M, Volcani BE, Gassmann W, Schroeder JI (1997). A gene family of silicon transporters. *Nature* **385**: 688-689.
- Hildebrand M, Dahlin K, Volcani BE (1998). Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Molecular and General Genetics* **260**: 480-486.
- Hildebrand M (2000). Silicic acid transport and its control during cell wall silicification in diatoms. *Rev Mineral Geochem*: 171-188.
- Hildebrand M, Wetherbee R (2003). Components and control of silicification in diatoms. *Progress in molecular and subcellular biology* **33**: 11-57.
- Hildebrand M (2005). Silicic acid transport and its control during cell wall silicification in diatoms. *Biom mineralization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp 159-176.
- Hildebrand M, York E, Kelz JI, Davis AK, Frigeri LG, Allison DP *et al* (2006). Nanoscale control of silica morphology and three-dimensional structure during diatom cell wall formation. *J Mater Res* **21**: 2689-2698.
- Hildebrand M, Frigeri LG, Davis AK (2007). Synchronized growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) provides novel insights into cell-wall synthesis processes in relation to the cell cycle. *J Phycol* **43**: 730-740.
- Hildebrand M (2008). Diatoms, biomineralization processes, and genomics. *Chemical reviews* **108**: 4855-4874.
- Hildebrand M, Kim S, Shi D, Scott K, Subramaniam S (2009). 3D imaging of diatoms with ion-abrasion scanning electron microscopy. *J Struct Biol* **166**: 316-328.
- Hirata R, Graham LA, Takatsuki A, Stevens TH, Anraku Y (1997). VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 4795-4803.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC (1993). Diatom extracellular polymeric substances - function, fine-structure, chemistry, and physiology. *J Phycol* **29**: 537-566.
- Hoede C, Arnoux S, Moisset M, Chaumier T, Inizan O, Jamilloux V *et al* (2014). PASTEC: an automatic transposable element classification tool. *PLoS one* **9**.
- Hopkins JT (1966). Role of water in behaviour of an estuarine mud-flat diatom. *J Mar Biol Assoc Uk* **46**: 617-&.

Hopkinson BM, Meile C, Shen C (2013). Quantification of extracellular carbonic anhydrase activity in two marine diatoms and investigation of its role. *Plant Physiol* **162**: 1142-1152.

Huysman MJJ, Martens C, Vandepoele K, Gillard J, Rayko E, Heijde M *et al* (2010). Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling. *Genome Biol* **11**.

Huysman MJJ, Fortunato AE, Matthijs M, Costa BS, Vanderhaeghen R, Van den Daele H *et al* (2013). Mediated induction of the diatom-specific cyclin *dscyc2* controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *Plant Cell* **25**: 215-228.

Huysman MJJ, Tanaka A, Bowler C, Vyverman W, De Veylder L (2015). Functional characterization of the diatom cyclin-dependent kinase A2 as a mitotic regulator reveals plant-like properties in a non-green lineage. *Bmc Plant Biol* **15**.

-I-

Ifuku K, Yan DY, Miyahara M, Inoue-Kashino N, Yamamoto YY, Kashino Y (2015). A stable and efficient nuclear transformation system for the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth Res* **123**: 203-211.

Iler RK (1979). The chemistry of silica. *Wiley-Interscience*.

Ingalls AE, Whitehead K, Bridoux MC (2010). Tinted windows: the presence of the UV absorbing compounds called mycosporine-like amino acids embedded in the frustules of marine diatoms. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 104-115.

-J-

Jefferies KC, Cipriano DJ, Forgac M (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. *Archives of biochemistry and biophysics* **476**: 33-42.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**: 275-282.

Jourdren L, Bernard M, Dillies MA, Le Crom S (2012). Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics* **28**: 1542-1543.

Jung H (2001). Towards the molecular mechanism of Na⁺/solute symport in prokaryotes. *Bba-Bioenergetics* **1505**: 131-143.

-K-

Kaczmarek I, Beaton M, Benoit AC, Medlin LK (2006). Molecular phylogeny of selected members of the order Thalassiosirales (Bacillariophyta) and evolution of the fultoportula. *J Phycol* **42**: 121-138.

Kader MA, Lindberg S, Seidel T, Golldack D, Yemelyanov V (2007). Sodium sensing induces different changes in free cytosolic calcium concentration and pH in salt-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa*) cultivars. *Physiol Plantarum* **130**: 99-111.

Kamp A, de Beer D, Nitsch JL, Lavik G, Stief P (2011). Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. *P Natl Acad Sci USA* **108**: 5649-5654.

Kane PA (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol R* **70**: 177-+.

Katayama T, Murata A, Taguchi S (2011). Responses of pigment composition of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to silicate availability during dark survival and recovery. *Plankton and Benthos Research* **6**: 1-11.

Katsuhara M, Kuchitsu K, Takeshige K, Tazawa M (1989). Salt stress-induced cytoplasmic acidification and vacuolar alkalization in *Nitellopsis obtusa* cells *in vivo* p-31-nuclear magnetic-resonance study. *Plant Physiol* **90**: 1102-1107.

Katsuhara M, Yazaki Y, Sakano K, Kawasaki T (1997). Intracellular pH and proton-transport in barley root cells under salt stress: *in vivo* P-31-NMR study. *Plant Cell Physiol* **38**: 155-160.

Keeling PJ, Palmer JD (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature reviews Genetics* **9**: 605-618.

Keeling PJ (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos T R Soc B* **365**: 729-748.

Kellosalo J, Kajander T, Kogan K, Pokharel K, Goldman A (2012). The structure and catalytic cycle of a sodium-pumping pyrophosphatase. *Science* **337**: 473-476.

Kettles NL, Kopriva S, Malin G (2014). Insights into the regulation of dmsp synthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* through apr activity, proteomics and gene expression analyses on cells acclimating to changes in salinity, light and nitrogen. *PLoS one* **9**.

Khabudaev KV, Petrova DP, Grachev MA, Likhoshway YV (2014). A new subfamily LIP of the major intrinsic proteins. *BMC genomics* **15**.

- Khatoon H, Banerjee S, Yusoff FM, Shariff M (2010). Effects of salinity on the growth and proximate composition of selected tropical marine periphytic diatoms and cyanobacteria. *Aquac Res* **41**: 1348-1355.
- Kidder DL, Erwin DH (2001). Secular distribution of biogenic silica through the Phanerozoic: comparison of silica-replaced fossils and bedded cherts at the series level. *J Geol* **109**: 509-522.
- Kingston MB (1999). Wave effects on the vertical migration of two benthic microalgae: *Hantzschia virgata* var. *intermedia* and *Euglena proxima*. *Estuaries* **22**: 81-91.
- Kingston MB (2002). Effect of subsurface nutrient supplies on the vertical migration of *Euglena proxima* (Euglenophyta). *J Phycol* **38**: 872-880.
- Kirst GO (1990). Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine-Algae. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **41**: 21-53.
- Kitagawa N, Mazon H, Heck AJR, Wilkens S (2008). Stoichiometry of the peripheral stalk subunits E and G of yeast V-1-ATPase determined by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 3329-3337.
- Kleist TJ, Spencley AL, Luan S (2014). Comparative phylogenomics of the CBL-CIPK calcium-decoding network in the moss *Physcomitrella*, *Arabidopsis*, and other green lineages. *Front Plant Sci* **5**.
- Kluge C, Lahr J, Hanitzsch M, Bolte S, Gollmack D, Dietz KJ (2003). New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **35**: 377-388.
- Knoll AH (2003). Biomineralization and evolutionary history. *Rev Mineral Geochem* **54**: 329-356.
- Koester JA, Swanson WJ, Armbrust EV (2013). Positive selection within a diatom species acts on putative protein interactions and transcriptional regulation. *Mol Biol Evol* **30**: 422-434.
- Kooistra WCF, Gersonde R, K. Medlin L, G. Mann D (2007). The origin and evolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence. In: Knoll PGFH (ed). *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Academic Press: Burlington. pp 207-249.
- Kooistra WCF, De Stefano M, Mann D, Medlin K (2003). The phylogeny of the diatoms. In: Müller WG (ed). *Silicon Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg. pp 59-97.
- Kooistra WHCF, Medlin LK (1996). Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Mol Phylogenet Evol* **6**: 391-407.
- Kooistra WHCF, Forlani G, De Stefano M (2009). Adaptations of araphid pennate diatoms to a planktonic existence. *Mar Ecol-Evol Persp* **30**: 1-15.

Krell A, Funck D, Plettner I, John U, Dieckmann G (2007). Regulation of proline metabolism under salt stress in the psychrophilic diatom *Fragilariopsis cylindrus* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **43**: 753-762.

Krell A, Beszteri B, Dieckmann G, Glockner G, Valentin K, Mock T (2008). A new class of ice-binding proteins discovered in a salt-stress-induced cDNA library of the psychrophilic diatom *Fragilariopsis cylindrus* (Bacillariophyceae). *Eur J Phycol* **43**: 423-433.

Kroger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M (2000). Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *P Natl Acad Sci USA* **97**: 14133-14138.

Kroger N, Poulsen N (2008). Diatoms: from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu Rev Genet* **42**: 83-107.

Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS *et al* (2008). A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS one* **3**: e1426.

Kroth PG (2015). The biodiversity of carbon assimilation. *J Plant Physiol* **172**: 76-81.

-L-

Lane TW, Morel FMM (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *P Natl Acad Sci USA* **97**: 4627-4631.

Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FMM (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42-42.

Latta LC, Weider LJ, Colbourne JK, Pfrender ME (2012). The evolution of salinity tolerance in *Daphnia*: a functional genomics approach. *Ecology letters* **15**: 794-802.

Lavaud J, Materna AC, Sturm S, Vugrinec S, Kroth PG (2012). Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. *PLoS one* **7**.

Lawlor DW, Keys AJ (1993). Understanding photosynthetic adaptation to changing climate. *Plant adaptation to environmental stress*: 85-106.

Lay WCL, Liu Y, Fane AG (2010). Impacts of salinity on the performance of high retention membrane bioreactors for water reclamation: a review. *Water research* **44**: 21-40.

Lee SK, Li W, Ryu SE, Rhim T, Ahnn J (2010). Vacuolar H⁺-ATPases in *Caenorhabditis elegans*: What can we learn about giant H⁺ pumps from tiny worms? *Bba-Bioenergetics* **1797**: 1687-1695.

Leterme SC, Ellis AV, Mitchell JG, Buscot MJ, Pollet T, Schapira M *et al* (2010). Morphological flexibility of *Cocconeis placentula* (bacillariophyceae) nanostructure to changing salinity. *J Phycol* **46**: 715-719.

Leterme SC, Prime E, Mitchell J, Brown MH, Ellis AV (2013). Diatom adaptability to environmental change: a case study of two *Cocconeis* species from high-salinity areas. *Diatom Res* **28**: 29-35.

Lewis WM (1984). The diatom sex clock and its evolutionary significance. *Am Nat* **123**: 73-80.

Li JS, Yang HB, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A (2005). Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* **310**: 121-125.

Li WZ, Jaroszewski L, Godzik A (2001). Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics* **17**: 282-283.

Ligowski R, Jordan RW, Assmy P (2012). Morphological adaptation of a planktonic diatom to growth in Antarctic sea ice. *Mar Biol* **159**: 817-827.

Lin SM, Tsai JY, Hsiao CD, Huang YT, Chiu CL, Liu MH *et al* (2012). Crystal structure of a membrane-embedded H⁺-translocating pyrophosphatase. *Nature* **484**: 399-403.

Lippemeier S, Hartig P, Colijn F (1999). Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off-line PAM fluorescence measurements. *J Plankton Res* **21**: 269-283.

Liu LN, Chen XL, Zhang YZ, Zhou BC (2005). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview. *Bba-Bioenergetics* **1708**: 133-142.

Liu WH, Ming Y, Li P, Huang ZW (2012). Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation. *Plant Physiol Bioch* **54**: 43-48.

Lommer M, Roy AS, Schilhabel M, Schreiber S, Rosenstiel P, LaRoche J (2010). Recent transfer of an iron-regulated gene from the plastid to the nuclear genome in an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *BMC genomics* **11**.

Lommer M, Specht M, Roy AS, Kraemer L, Andreson R, Gutowska MA *et al* (2012). Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol* **13**.

Lowe TM, Eddy SR (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic acids research* **25**: 955-964.

Luoto HH, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM (2011). Na⁺-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H⁺-translocating pyrophosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 21633-21642.

Luoto HH, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM (2013). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺. *P Natl Acad Sci USA* **110**: 1255-1260.

Lyon BR, Lee PA, Bennett JM, DiTullio GR, Janech MG (2011). Proteomic analysis of a sea-ice diatom: Salinity acclimation provides new insight into the dimethylsulfoniopropionate production pathway. *Plant Physiol* **157**: 1926-1941.

-M-

Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M *et al* (2006). A silicon transporter in rice. *Nature* **440**: 688-691.

MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* **38**: 17-38.

Maeshima M (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Bba-Biomembranes* **1465**: 37-51.

Maheswari U, Jabbari K, Petit JL, Porcel BM, Allen AE, Cadoret JP *et al* (2010). Digital expression profiling of novel diatom transcripts provides insight into their biological functions. *Genome Biol* **11**.

Maldonado M, Carmona MG, Uriz MJ, Cruzado A (1999). Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature* **401**: 785-788.

Malinen AM, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R (2007). Na⁺-pyrophosphatase: A novel primary sodium pump. *Biochemistry* **46**: 8872-8878.

Mandel M, Moriyama Y, Hulmes JD, Pan YCE, Nelson H, Nelson N (1988). cDNA sequence encoding the 16-kda proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-Atpases. *P Natl Acad Sci USA* **85**: 5521-5524.

Mann DG (1999). The species concept in diatoms. *Phycologia* **38**: 437-495.

Maples RS (1984). The epiphytic diatom flora of 2 sargassum species. *Gulf Res Rep* **7**: 373-375.

Martin-Cereceda M, Cox EJ (2011). Morphological variation in a small *Thalassiosira* species (Bacillariophyta) under different culture regimes. *Bot Mar* **54**: 563-574.

Martin-Jézéquel V, Lopez PJ (2003). Silicon--a central metabolite for diatom growth and morphogenesis. *Prog Mol Subcell Biol* **33**: 99-124.

Martin W, Herrmann RG (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* **118**: 9-17.

Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J Exp Bot* **58**: 83-102.

Martins I, Oliveira SM, Flindt MR, Marques JC (1999). The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecol* **20**: 259-265.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology* **195**: 298-308.

Maulood BK, Hinton GCF (1979). Tychoplanktonic diatoms from a stenothermal spring in Iraqi Kurdistan. *Brit Phycol J* **14**: 175-183.

Maumus F, Allen AE, Mhiri C, Hu HH, Jabbari K, Vardi A *et al* (2009). Potential impact of stress activated retrotransposons on genome evolution in a marine diatom. *BMC genomics* **10**.

Maumus F, Rabinowicz P, Bowler C, Rivarola M (2011). Stemming epigenetics in marine stramenopiles. *Curr Genomics* **12**: 357-370.

Maurel C (2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS letters* **581**: 2227-2236.

Mayama S, Kuriyama A (2002). Diversity of mineral cell coverings and their formation processes: a review focused on the siliceous cell coverings. *J Plant Res* **115**: 289-295.

McCarthy A, Rogers SP, Duffy SJ, Campbell DA (2012). Elevated carbon dioxide differentially alters the photophysiology of *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae) and *Emiliana huxleyi* (haptophyta). *J Phycol* **48**: 635-646.

McGinn PJ, Morel FMM (2008). Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey. *Physiol Plantarum* **133**: 78-91.

Mcmillan M, Johansen JR (1988). Changes in valve morphology of *Thalassiosira decipiens* (Bacillariophyceae) cultured in media of 4 different salinities. *Brit Phycol J* **23**: 307-316.

Medlin AL, Kooistra A, Schmid AM (2000). A review of the evolution of the diatoms: a total approach using molecules, morphology and geology. *Polish Academy of Sciences*: 13-35.

Medlin LK, Williams DM, Sims PA (1993). Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *Eur J Phycol* **28**: 261-275.

Medlin LK, Kooistra WHCF, Gersonde R, Wellbrock U (1996a). Molecular evidence for the origin of the Thalassiosirales. *Nova Hedwigia* **112**: 221-234.

Medlin LK, Kooistra WHCF, Gersonde R, Wellbrock U (1996b). Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Mol Biol Evol* **13**: 67-75.

Medlin LK, Kooistra WHCF, Potter D, Saunders GW, Andersen RA (1997). Phylogenetic relationships of the 'golden algae' (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids. *Plant Syst Evol*: 187-219.

Medlin LK (2002). Why silica or better yet why not silica? Speculations as to why the diatoms utilise silica as their cell wall material. *Diatom Res* **17**: 453-459.

Medlin LK, Kaczmarek I (2004). Evolution of the diatoms: Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia* **43**: 245-270.

Medlin LK, Sato S (2009). The biological reality of the core and basal group of araphid diatoms. *Diatom Res* **24**: 503-508.

Meng XZ, Xu ZK, Song RT (2011). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase from *Dunaliella viridis*. *Mol Biol Rep* **38**: 3375-3382.

Milligan AJ, Morel FMM (2002). A proton buffering role for silica in diatoms. *Science* **297**: 1848-1850.

Milligan AJ, Varela DE, Brzezinski MA, Morel FOMM (2004). Dynamics of silicon metabolism and silicon isotopic discrimination in a marine diatom as a function of pCO₂. *Limnol Oceanogr* **49**: 322-329.

Mitbavkar S, Anil AC (2004). Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. *Mar Biol* **145**: 9-20.

Miyagawa A, Okami T, Kira N, Yamaguchi H, Ohnishi K, Adachi M (2009). Research note: high efficiency transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* with a promoter from the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Phycol Res* **57**: 142-146.

Miyahara M, Aoi M, Inoue-Kashino N, Kashino Y, Ifuku K (2013). Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci Biotech Bioch* **77**: 874-876.

Mock T, Samanta MP, Iverson V, Berthiaume C, Robison M, Holtermann K *et al* (2008). Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses. *P Natl Acad Sci USA* **105**: 1579-1584.

Montresor M, Di Prisco C, Sarno D, Margiotta F, Zingone A (2013). Diversity and germination patterns of diatom resting stages at a coastal Mediterranean site. *Mar Ecol Prog Ser* **484**: 79-+.

Morel FMM, Cox EH, Kraepiel AML, Lane TW, Milligan AJ, Schaperdoth I *et al* (2002). Acquisition of inorganic carbon by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Funct Plant Biol* **29**: 301-308.

Morris CA, Owen JR, Thomas MC, El-Hiti GA, Harwood JL, Kille P (2014). Intracellular localization and induction of a dynamic RNA-editing event of macro-algal V-ATPase subunit A (VHA-A) in response to copper. *Plant Cell and Environment* **37**: 189-203.

Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D (2009). Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**: 1724-1726.

Muto M, Fukuda Y, Nemoto M, Yoshino T, Matsunaga T, Tanaka T (2013). Establishment of a genetic transformation system for the marine pennate diatom *Fistulifera sp* strain JPCC da0580-a high triglyceride producer. *Mar Biotechnol* **15**: 48-55.

Myklesta S (1974). Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms: comparison of 9 different species in culture. *J Exp Mar Biol Ecol* **15**: 261-274.

Myklestad SM (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the Total Environment* **165**: 155-164.

-N-

Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N, Shirai Y, Nishida K, Itakura S *et al* (2004). Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Applied and environmental microbiology* **70**: 704-711.

Nagasaki K (2008). Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *J Microbiol* **46**: 235-243.

Nakajima K, Tanaka A, Matsuda Y (2013). SLC4 family transporters in a marine diatom directly pump bicarbonate from seawater. *P Natl Acad Sci USA* **110**: 1767-1772.

Nakayama T, Inagaki Y (2014). Unique genome evolution in an intracellular N₂-fixing symbiont of a Rhopalodiacean diatom. *Acta Soc Bot Pol* **83**: 409-413.

Nakov T, Theriot EC, Alverson AJ (2014). Using phylogeny to model cell size evolution in marine and freshwater diatoms. *Limnol Oceanogr* **59**: 79-86.

Napoleon C, Raimbault V, Claquin P (2013). Influence of nutrient stress on the relationships between pam measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLoS one* **8**: e66423.

Napoleon C, Fiant L, Raimbault V, Riou P, Claquin P (2014). Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Mar Ecol Prog Ser* **505**: 49-64.

Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Queguiner B (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean - revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cy* **9**: 359-372.

Neumann D, De Figueiredo C (2002). A novel mechanism of silicon uptake. *Protoplasma* **220**: 59-67.

Neumann D (2003). Silicon in Plants. In: Müller WG (ed). *Silicon Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg. pp 149-160.

Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada GH, Wada Y *et al* (2011). The a3 isoform vacuolar type H⁺-ATPase promotes distant metastasis in the mouse b16 melanoma cells. *Mol Cancer Res* **9**: 845-855.

Nodine ER, Gaiser EE (2014). Distribution of diatoms along environmental gradients in the Charlotte Harbor, Florida (USA), estuary and its watershed: implications for bioassessment of salinity and nutrient concentrations. *Estuar Coast* **37**: 864-879.

Nosenko T, Bhattacharya D (2007). Horizontal gene transfer in chromalveolates. *BMC Evol Biol* **7**.

Nubel U, Garcia-Pichel F, Clavero E, Muyzer G (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol* **2**: 217-226.

Nymark M, Valle KC, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G *et al* (2013). Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to re-illumination the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *PLoS one* **8**.

-O-

Obata T, Fernie A, Nunes-Nesi A (2013). The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites* **3**: 325-346.

Osborn HL, Hook SE (2013). Using transcriptomic profiles in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to identify and prioritize stressors. *Aquat Toxicol* **138**: 12-25.

Ostlund G, Schmitt T, Forslund K, Kostler T, Messina DN, Roopra S *et al* (2010). InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis. *Nucleic acids research* **38**: D196-D203.

-P-

Park H, Song B, Morel FMM (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ Microbiol* **9**: 403-413.

Parker MS, Mock T, Armbrust EV (2008). Genomic insights into marine microalgae. *Annu Rev Genet* **42**: 619-645.

Parkinson J, Brechet Y, Gordon R (1999). Centric diatom morphogenesis: a model based on a DLA algorithm investigating the potential role of microtubules. *Bba-Mol Cell Res* **1452**: 89-102.

Passarelli C, Meziane T, Thiney N, Boeuf D, Jesus B, Ruivo M *et al* (2015). Seasonal variations of the composition of microbial biofilms in sandy tidal flats: focus of fatty acids, pigments and exopolymers. *Estuar Coast Shelf S* **153**: 29-37.

Passow U (2002). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog Oceanogr* **55**: 287-333.

Patterson DJ, Durrschmidt M (1988). The formation of siliceous scales by *Raphidiophrys ambigua* (Protista, Centroheliozoa). *Journal of cell science* **91**: 33-39.

Peers G, Price NM (2006). Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. *Nature* **441**: 341-344.

Pennock JR, Sharp JH (1986). Phytoplankton Production in the Delaware Estuary - Temporal and Spatial Variability. *Mar Ecol Prog Ser* **34**: 143-155.

Perez-Castineira JR, Lopez-Marques RL, Losada M, Serrano A (2001). A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS letters* **496**: 6-11.

Perkins EJ (1960). The diurnal rhythm of the littoral diatoms of the river eden estuary, fife. *J Ecol* **48**: 725-728.

Peterson CG (1987). Gut passage and insect grazer selectivity of lotic diatoms. *Freshwater Biol* **18**: 455-460.

- Peterson CG, Vormittag KA, Valett HM (1998). Ingestion and digestion of epilithic algae by larval insects in a heavily grazed montane stream. *Freshwater Biol* **40**: 607-623.
- Petrou K, Ralph PJ (2011). Photosynthesis and net primary productivity in three Antarctic diatoms: possible significance for their distribution in the Antarctic marine ecosystem. *Mar Ecol Prog Ser* **437**: 27-40.
- Petrova DP, Khabudaev KV, Marchenkov AM, Galachyants YP, Kalyuzhnaya OV, Zakharova YR *et al* (2013). Aquaporin-like protein of the diatom *Synedra acus*. *Dokl Biochem Biophys* **448**: 5-8.
- Philippe H, Sorhannus U, Baroin A, Perasso R, Gasse F, Adoutte A (1994). Comparison of molecular and paleontological data in diatoms suggests a major gap in the fossil record. *J Evolution Biol* **7**: 247-265.
- Pierre G, Graber M, Orvain F, Dupuy C, Maugard T (2010). Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochem Syst Ecol* **38**: 917-923.
- Pondaven P, Ragueneau O, Treguer P, Hauvespre A, Dezileau L, Reyss JL (2000). Resolving the 'opal paradox' in the Southern Ocean. *Nature* **405**: 168-172.
- Poulsen N, Sumper M, Kroger N (2003). Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *P Natl Acad Sci USA* **100**: 12075-12080.
- Poulsen N, Kroger N (2005). A new molecular tool for transgenic diatoms - Control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette. *Febs J* **272**: 3413-3423.
- Poulsen N, Chesley PM, Kroger N (2006). Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **42**: 1059-1065.
- Poulsen NC, Spector I, Spurck TP, Schultz TF, Wetherbee R (1999). Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell motility and the cytoskeleton* **44**: 23-33.
- Prasad AKSK, Fryxell GA, Livingston RJ (1993). The genus *Thalassiosira* (bacillariophyta), *T. cedarkeyensis*, a new marine benthic diatom from the florida coast of the gulf-of-mexico. *Phycologia* **32**: 204-212.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red-cell chip28 protein. *Science* **256**: 385-387.
- Preston RA, Murphy RF, Jones EW (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 7027-7031.
- Prieto L, Sommer F, Stibor HN, Koeve W (2001). Effects of planktonic copepods on transparent exopolymeric particles (TEP) abundance and size spectra. *J Plankton Res* **23**: 515-525.

Prihoda J, Tanaka A, de Paula WBM, Allen JF, Tirichine L, Bowler C (2012). Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *J Exp Bot* **63**: 1543-1557.

Prince EK, Irmer F, Pohnert G (2013). Domoic acid improves the competitive ability of *Pseudo-nitzschia delicatissima* against the diatom *Skeletonema marinoi*. *Marine drugs* **11**: 2398-2412.

-R-

Raateoja MP (2004). Fast repetition rate fluorometry (FRRF) measuring phytoplankton productivity: a case study at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Boreal Environ Res* **9**: 263-276.

Racki G, Cordey F (2000). Radiolarian palaeoecology and radiolarites: is the present the key to the past? *Earth-Sci Rev* **52**: 83-120.

Radchenko IG, Il'yash LV (2006). Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *Biol Bull+* **33**: 242-247.

Raven J (1980). Nutrient transport in microalgae. *Adv Microb Physiol* **226**: 21-47.

Raven JA, Waite AM (2004). The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist* **162**: 45-61.

Raven JA, Giordano M (2009). Biomineralization by photosynthetic organisms: evidence of coevolution of the organisms and their environment? *Geobiology* **7**: 140-154.

Ravin NV, Galachyants YP, Mardanov AV, Beletsky AV, Petrova DP, Sherbakova TA *et al* (2010). Complete sequence of the mitochondrial genome of a diatom alga *Synedra acus* and comparative analysis of diatom mitochondrial genomes. *Current genetics* **56**: 215-223.

Rayko E, Maumus F, Maheswari U, Jabbari K, Bowler C (2010). Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles. *New Phytologist* **188**: 52-66.

Rehakova K, Zapomelova E, Prasil O, Vesela J, Medova H, Oren A (2009). Composition changes of phototrophic microbial communities along the salinity gradient in the solar saltern evaporation ponds of Eilat, Israel. *Hydrobiologia* **636**: 77-88.

Reinfelder JR, Kraepiel AML, Morel FMM (2000). Unicellular C4 photosynthesis in a marine diatom. *Nature* **407**: 996-999.

Reinfelder JR, Milligan AJ, Morel FMM (2004). The role of the C4 pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. *Plant Physiol* **135**: 2106-2111.

- Ren L, Riser SC (2010). Observations of decadal time scale salinity changes in the subtropical thermocline of the North Pacific Ocean. *Deep-Sea Res Pt II* **57**: 1161-1170.
- Reul N, Fournier S, Boutin J, Hernandez O, Maes C, Chapron B *et al* (2014). Sea surface salinity observations from space with the smos satellite: a new means to monitor the marine branch of the water cycle. *Surv Geophys* **35**: 681-722.
- Riebesell U (2000). Photosynthesis - Carbon fix for a diatom. *Nature* **407**: 959-960.
- Riedel GF, Nelson DM (1985). Silicon uptake by algae with no known Si requirement. *J Phycol* **21**: 168-171.
- Rijstenbil JW, Wijnholds JA, Sinke JJ (1989). Implications of salinity fluctuations for growth and nitrogen-metabolism of the marine diatom *Ditylum brightwellii* in comparison with *Skeletonema costatum*. *Mar Biol* **101**: 131-141.
- Rijstenbil JW (2005). UV- and salinity-induced oxidative effects in the marine diatom *Cylindrotheca closterium* during simulated emersion. *Mar Biol* **147**: 1063-1073.
- Robinson DG, Hoppenrath M, Oberbeck K, Luykx P, Ratajczak R (1998). Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bot Acta* **111**: 108-122.
- Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ (2007). The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol* **24**: 54-62.
- Rogerson A, DeFreitas ASW, McInnes AG (1987). Cytoplasmic silicon in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* localized by electron spectroscopic imaging. *Can J Microbiol* **33**: 128-131.
- Romero MF, Chen AP, Parker MD, Boron WF (2013). The SLC4 family of bicarbonate (HCO_3^-) transporters. *Mol Aspects Med* **34**: 159-182.
- Rost B, Riebesell U, Burkhardt S, Sultemeyer D (2003). Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* **48**: 55-67.
- Roubeix V, Chalief F, Gasse F (2014). The diatom *Thalassiosira faurii* (Gasse) Hasle in the Ziway-Shala lakes (Ethiopia) and implications for paleoclimatic reconstructions: Case study of the Glacial-Holocene transition in East Africa. *Palaeogeogr Palaeoclimatol* **402**: 104-112.
- Round F, Crawford R, Mann DG (1990). The diatoms. *Cambridge University Press*.
- Round FE, Crawford RM (1981). The lines of evolution of the Bacillariophyta. *Proc R Soc Ser B-Bio* **211**: 237-239.

Rowland SJ, Allard WG, Belta ST, Massae G, Robert JM, Blackburn S *et al* (2001). Factors influencing the distributions of polyunsaturated terpenoids in the diatom, *Rhizosolenia setigera*. *Phytochemistry* **58**: 717-728.

Ruck EC, Theriot EC (2011). Origin and evolution of the canal raphe system in diatoms. *Protist* **162**: 723-737.

Ruck EC, Nakov T, Jansen RK, Theriot EC, Alverson AJ (2014). Serial gene losses and foreign DNA underlie size and sequence variation in the plastid genomes of diatoms. *Genome biology and evolution* **6**: 644-654.

Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee, Docampo R (2001). The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and axe similar to acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46196-46203.

-S-

Saade A, Bowler C (2009). Molecular tools for discovering the secrets of diatoms. *Bioscience* **59**: 757-765.

Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL *et al* (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* **305**: 367-371.

Sabir JSM, Yu MJ, Ashworth MP, Baeshen NA, Baeshen MN, Bahieldin A *et al* (2014). Conserved gene order and expanded inverted repeats characterize plastid genomes of Thalassiosirales. *PloS one* **9**.

Saier MH, Tran CV, Barabote RD (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic acids research* **34**: D181-D186.

Saier MH, Yen MR, Noto K, Tamang DG, Elkan C (2009). The transporter classification database: recent advances. *Nucleic acids research* **37**: D274-D278.

Saier MH, Reddy VS, Tamang DG, Vastermark A (2014). The transporter classification database. *Nucleic acids research* **42**: D251-D258.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Sakano K (2001). Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic on in defense reaction and secondary metabolism. *Int Rev Cytol* **206**: 1-44.

SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature genetics* **20**: 43-45.

Sapriel G, Quinet M, Heijde M, Jourden L, Tanty V, Luo GZ *et al* (2009). Genome-wide transcriptome analyses of silicon metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* reveal the multilevel regulation of silicic acid transporters. *PLoS one* **4**.

Sauer J, Wenderoth K, Maier UG, Rhiel E (2002). Effects of salinity, light and time on the vertical migration of diatom assemblages. *Diatom Res* **17**: 189-203.

Scala S, Carels N, Falciatore A, Chiusano ML, Bowler C (2002). Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **129**: 993-1002.

Scheffel A, Poulsen N, Shian S, Kroger N (2011). Nanopatterned protein microrings from a diatom that direct silica morphogenesis. *P Natl Acad Sci USA* **108**: 3175-3180.

Schmid A-M (1994). Aspects of morphogenesis and function of diatom cell walls with implications for taxonomy. *Protoplasma* **181**: 43-60.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma JX, Mitros T, Nelson W *et al* (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**: 178-183.

Schnoor JL (2014). Ocean acidification: the other problem with CO₂. *Environmental science & technology* **48**: 10529-10530.

Schreiber U, Klughammer C, Kolbowski J (2012). Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynth Res* **113**: 127-144.

Schumacher K (2006). Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Current opinion in plant biology* **9**: 595-600.

Schumacher K, Krebs M (2010). The V-ATPase: small cargo, large effects. *Current opinion in plant biology* **13**: 724-730.

Schumann R, Baudler H, Glass A, Dumcke K, Karsten U (2006). Long-term observations on salinity dynamics in a tideless shallow coastal lagoon of the Southern Baltic Sea coast and their biological relevance. *J Marine Syst* **60**: 330-344.

Seckbach J (2013). Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. *Cellular origin and life in extreme habitats*.

Seebah S, Fairfield C, Ullrich MS, Passow U (2014). Aggregation and sedimentation of *Thalassiosira weissflogii* (diatom) in a warmer and more acidified future ocean. *PLoS one* **9**.

Segami S, Nakanishi Y, Sato MH, Maeshima M (2010). Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type ii H⁺-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **51**: 1350-1360.

Serodio J, Coelho H, Vieira S, Cruz S (2006). Microphytobenthos vertical migratory photoresponse as characterised by light-response curves of surface biomass. *Estuar Coast Shelf S* **68**: 547-556.

Serrano A, Perez-Castineira JR, Baltscheffsky H, Baltscheffsky M (2004). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases in some archaea and other extremophilic prokaryotes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **36**: 127-133.

Shimonaga T, Konishi M, Oyama Y, Fujiwara S, Satoh A, Fujita N *et al* (2008). Variation in storage alpha-glucans of the porphyridiales (rhodophyta). *Plant Cell Physiol* **49**: 103-116.

Shrestha RP, Tesson B, Norden-Krichmar T, Federowicz S, Hildebrand M, Allen AE (2012). Whole transcriptome analysis of the silicon response of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *BMC genomics* **13**.

Shrestha RP, Hildebrand M (2015). Evidence for a regulatory role of diatom silicon transporters in cellular silicon responses. *Eukaryot Cell* **14**: 29-40.

Shuter B (1979). Model of physiological adaptation in unicellular algae. *J Theor Biol* **78**: 519-552.

Si YQ, Liu P, Li PH, Brutnell TP (2014). Model-based clustering for RNA-seq data. *Bioinformatics* **30**: 197-205.

Simonsen R (1972). Ideas for a more natural system of the centric diatoms. *Nova Hedwigia* **39**: 37-54.

Simonsen R (1979). The diatom system: ideas on phylogeny. *Bacillaria* **2**: 9-71.

Sims PA, Mann DG, Medlin LK (2006). Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* **45**: 361-402.

Smetacek V (1999). Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist* **150**: 25-32.

Smetacek V (2001). A watery arms race. *Nature* **411**: 745-745.

Smith DJ, Underwood GJC (2000). The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *J Phycol* **36**: 321-333.

- Sobrinho C, Ward ML, Neale PJ (2008). Acclimation to elevated carbon dioxide and ultraviolet radiation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: effects on growth, photosynthesis, and spectral sensitivity of photoinhibition. *Limnol Oceanogr* **53**: 494-505.
- Sogaard DH, Hansen PJ, Rysgaard S, Glud RN (2011). Growth limitation of three Arctic sea ice algal species: effects of salinity, pH, and inorganic carbon availability. *Polar Biol* **34**: 1157-1165.
- Song HJ, Wignall PB, Tong JN, Yin HF (2013). Two pulses of extinction during the Permian-Triassic crisis. *Nat Geosci* **6**: 52-56.
- Sorhannus U (2003). The effect of positive selection on a sexual reproduction gene in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta): results obtained from maximum-likelihood and parsimony-based methods. *Mol Biol Evol* **20**: 1326-1328.
- Sorhannus U, Ortiz JD, Wolf M, Fox MG (2010). Microevolution and speciation in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta). *Protist* **161**: 237-249.
- Stanley SM (2008). Effects of global seawater chemistry on biomineralization: past, present, and future. *Chemical reviews* **108**: 4483-4498.
- Strickland JDH, Parsons TR, Strickland JDH (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada: Ottawa.
- Strzepek RF, Harrison PJ (2004). Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* **431**: 689-692.
- Sudhir P, Murthy SDS (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* **42**: 481-486.
- Sumper M (2002). A phase separation model for the nanopatterning of diatom biosilica. *Science* **295**: 2430-2433.
- Sumper M, Brunner E (2008). Silica biomineralisation in diatoms: The model organism *Thalassiosira pseudonana*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **9**: 1187-1194.
- Swanson SJ, Choi WG, Chanoca A, Gilroy S (2011). In vivo imaging of Ca²⁺, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. *Annual Review of Plant Biology, Vol 62* **62**: 273-297.
- Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002). A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends in plant science* **7**: 157-161.

Tachibana M, Allen AE, Kikutani S, Endo Y, Bowler C, Matsuda Y (2011). Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth Res* **109**: 205-221.

Tall L, Cattaneo A, Cloutier L, Dray S, Legendre P (2006). Resource partitioning in a grazer guild feeding on a multilayer diatom mat. *J N Am Benthol Soc* **25**: 800-810.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K (1998). Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *P Natl Acad Sci USA* **95**: 12719-12723.

Tanaka T, Maeda Y, Veluchamy A, Tanaka M, Abida H, Marechal E *et al* (2015). Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell* **27**: 162-176.

Taraldsvik M, Mykkestad SM (2000). The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Eur J Phycol* **35**: 189-194.

Tatters AO, Fu F-X, Hutchins DA (2012). High CO₂ and silicate limitation synergistically increase the toxicity of *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. *PloS one* **7**: e32116.

Taylor AR, Chrachri A, Wheeler G, Goddard H, Brownlee C (2011). A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PloS Biol* **9**.

Taylor AR, Brownlee C, Wheeler GL (2012). Proton channels in algae: reasons to be excited. *Trends in plant science* **17**: 675-684.

Tesson B, Hildebrand M (2010). Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: control over patterning on the meso- and micro-scale. *PloS one* **5**.

Tesson B, Hildebrand M (2013). Characterization and localization of insoluble organic matrices associated with diatom cell walls: insight into their roles during cell wall formation. *PloS one* **8**.

Thamatrakoln K, Hildebrand M (2008). Silicon uptake in diatoms revisited: a model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. *Plant Physiol* **146**: 1397-1407.

Thessen AE, Stoecker DK (2008). Distribution, abundance and domoic acid analysis of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* from the Chesapeake Bay. *Estuar Coast* **31**: 664-672.

- Tiffany M (2011). Epizoic and epiphytic diatoms. In: Seckbach J, Kociolek P (eds). *The Diatom World*. Springer Netherlands. pp 195-209.
- Tiffany MA, Lange CB (2002). Diatoms provide attachment sites for other diatoms: a natural history of epiphytism from southern California. *Phycologia* **41**: 116-124.
- Toei M, Saum R, Forgac M (2010). Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* **49**: 4715-4723.
- Tomaru Y, Nagasaki K (2011). Diatom viruses. In: Seckbach J, Kociolek P (eds). *The Diatom World*. Springer Netherlands. pp 211-225.
- Tortell PD, Payne CD, Li YY, Trimborn S, Rost B, Smith WO *et al* (2008). CO₂ sensitivity of Southern Ocean phytoplankton. *Geophys Res Lett* **35**.
- Totti C, Poulin M, Romagnoli T, Perrone C, Pennesi C, De Stefano M (2009). Epiphytic diatom communities on intertidal seaweeds from Iceland. *Polar Biol* **32**: 1681-1691.
- Treguer PJ, De La Rocha CL (2013). The world ocean silica cycle. *Annual Review of Marine Science, Vol 5* **5**: 477-501.
- Trigueros JM, Orive E (2000). Tidally driven distribution of phytoplankton blooms in a shallow, macrotidal estuary. *J Plankton Res* **22**: 969-986.
- Trimborn S, Wolf-Gladrow D, Richter KU, Rost B (2009). The effect of pCO₂ on carbon acquisition and intracellular assimilation in four marine diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol* **376**: 26-36.
- Tripp BC, Smith K, Ferry JG (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 48615-48618.
- Trobajo R, Cox EJ, Quintana XD (2004). The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. *Nova Hedwigia* **79**: 433-445.
- Trobajo R, Mann DG, Clavero E, Evans KM, Vanormelingen P, McGregor RC (2010). The use of partial *cox1*, *rbcl* and *LSU rDNA* sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae). *Eur J Phycol* **45**: 413-425.
- Trobajo R, Rovira L, Mann DG, Cox EJ (2011). Effects of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms. *Phycol Res* **59**: 83-90.
- Tuchman ML, Theriot E, Stoermer EF (1984). Effects of low-level salinity concentrations on the growth of *Cyclotella meneghiniana* kutz (bacillariophyta). *Arch Protistenkd* **128**: 319-326.

-U-

Underwood GJC, Phillips J, Saunders K (1998). Distribution of estuarine benthic diatom species along salinity and nutrient gradients. *Eur J Phycol* **33**: 173-183.

Underwood GJC, Smith DJ (1998). Predicting epipellic diatom exopolymer concentrations in intertidal sediments from sediment chlorophyll a. *Microbial ecology* **35**: 116-125.

-V-

Valmonte GR, Arthur K, Higgins CM, MacDiarmid RM (2014). Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function. *Plant Cell Physiol* **55**: 551-569.

Vardi A, Thamatrakoln K, Bidle KD, Falkowski PG (2008). Diatom genomes come of age. *Genome Biol* **9**.

Vartanian M, Descles J, Quinet M, Douady S, Lopez PJ (2009). Plasticity and robustness of pattern formation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist* **182**: 429-442.

Vaulot D, Olson RJ, Merkel S, Chisholm SW (1987). Cell-cycle response to nutrient starvation in 2 phytoplankton species, *Thalassiosira weissflogii* and *Hymenomonas carterae*. *Mar Biol* **95**: 625-630.

Verkman AS, Mitra AK (2000). Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol-Renal* **278**: F13-F28.

Vicient CM, Suoniemi A, Anamthawat-Jonsson K, Tanskanen J, Beharav A, Nevo E *et al* (1999). Retrotransposon BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell* **11**: 1769-1784.

Villareal TA (1992). Buoyancy Properties of the giant diatom *Ethmodiscus*. *J Plankton Res* **14**: 459-463.

Villareal TA, Altabet MA, Culverrymsza K (1993). Nitrogen transport by vertically migrating diatom mats in the north pacific-ocean. *Nature* **363**: 709-712.

Villareal TA, Pilskaln C, Brzezinski M, Lipschultz F, Dennett M, Gardner GB (1999). Upward transport of oceanic nitrate by migrating diatom mats. *Nature* **397**: 423-425.

Vitousek PM, Howarth RW (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea - how can it occur ? *Biogeochemistry* **13**: 87-115.

Volk T, Hoffert MI (2013). Ocean carbon pumps: analysis of relative strengths and efficiencies in ocean-driven atmospheric CO₂ changes. *The Carbon Cycle and Atmospheric CO₂: Natural Variations Archean to Present*. American Geophysical Union. pp 99-110.

Von Dassow P, Montresor M (2011). Unveiling the mysteries of phytoplankton life cycles: patterns and opportunities behind complexity. *J Plankton Res* **33**: 3-12.

Vrieling E, Hazelaar S, Gieskes WC, Sun Q, Beelen TM, Van.Santen R (2003). Silicon biomineralisation: towards mimicking biogenic silica formation in diatoms. In: Müller WG (ed). *Silicon Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg. pp 301-334.

Vrieling EG, Poort L, Beelen TPM, Gieskes WWC (1999). Growth and silica content of the diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Navicula salinarum* at different salinities and enrichments with aluminium. *Eur J Phycol* **34**: 307-316.

Vrieling EG, Beelen TPM, van Santen RA, Gieskes WWC (2000). Nanoscale uniformity of pore architecture in diatomaceous silica: A combined small and wide angle X-ray scattering study. *J Phycol* **36**: 146-159.

Vrieling EG, Sun QY, Beelen TPM, Hazelaar S, Gieskes WWC, van Santen RA *et al* (2005). Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization. *J Nanosci Nanotechno* **5**: 68-78.

Vrieling EG, Sun QY, Tian M, Kooyman PJ, Gieskes WWC, van Santen RA *et al* (2007). Salinity-dependent diatom biosilicification implies an important role of external ionic strength. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 10441-10446.

-W-

Weiner S, Dove PM (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev Mineral Geochem* **54**: 1-29.

Wessler SR (1996). Plant retrotransposons: turned on by stress. *Current Biology* **6**: 959-961.

Whitton B (1999). Phycology, 3rd Edition, edited by Robert Edward Lee. *J Appl Phycol* **11**: 598-598.

Wielgoss S, Barrick JE, Tenaillon O, Wisner MJ, Dittmar WJ, Cruveiller S *et al* (2013). Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. *P Natl Acad Sci USA* **110**: 222-227.

Wilhelm C, Buchel C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, LaRoche J *et al* (2006). The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist* **157**: 91-124.

Wootton JT, Pfister CA, Forester JD (2008). Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. *P Natl Acad Sci USA* **105**: 18848-18853.

Wraige EJ, Belt ST, Masse G, Robert JM, Rowland SJ (1998). Variations in distributions of C-25 highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in the diatom, *Haslea ostrearia*: influence of salinity. *Org Geochem* **28**: 855-859.

Wu Y, Campbell DA, Irwin AJ, Suggett DJ, Finkel ZV (2014). Ocean acidification enhances the growth rate of larger diatoms. *Limnol Oceanogr* **59**: 1027-1034.

-X-

Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi YG, Morel FMM (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* **452**: 56-U53.

Xu Y, Morel FM (2013). Cadmium in marine phytoplankton. *Met Ions Life Sci* **11**: 509-528.

-Y-

Yagisawa F, Nishida K, Yoshida M, Ohnuma M, Shimada T, Fujiwara T *et al* (2009). Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Journal* **60**: 882-893.

Yang CZ, Albright LJ (1992). Effects of the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* on respiration of rainbow-trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms* **14**: 105-114.

Yokoyama K, Imamura H (2005). Rotation, structure, and classification of prokaryotic V-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **37**: 405-410.

-Z-

Zachos JC, Rohl U, Schellenberg SA, Sluijs A, Hodell DA, Kelly DC *et al* (2005). Rapid acidification of the ocean during the Paleocene-Eocene thermal maximum. *Science* **308**: 1611-1615.

Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE (2000). Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol* **36**: 379-386.

- Zehr JP, Kudela RM (2011). Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Annu Rev Mar Sci* **3**: 197-225.
- Zhang CY, Hu HH (2014). High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Mar Genom* **16**: 63-66.
- Zhang J, Feng JJ, Lu J, Yang YZ, Zhang X, Wan DS *et al* (2014). Transcriptome differences between two sister desert poplar species under salt stress. *BMC genomics* **15**.
- Zhang JA, Li JQ, Wang XC, Chen J (2011). OVP1, a Vacuolar H-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiol Bioch* **49**: 33-38.
- Zhang X, Dong FC, Gao JF, Song CP (2001). Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Res* **11**: 37-43.
- Zhang ZB, Liu CY, Wu ZZ, Xing L, Li PF (2006). Detection of nitric oxide in culture media and studies on nitric oxide formation by marine microalgae. *Med Sci Monitor* **12**: Br75-Br85.
- Zhou AF, Baidoo E, He ZL, Mukhopadhyay A, Baumohl JK, Benke P *et al* (2013). Characterization of NaCl tolerance in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough through experimental evolution. *Isme J* **7**: 1790-1802.
- Zonneveld KAF, Marret F, Versteegh GJM, Bogus K, Bonnet S, Bouimetarhan I *et al* (2013). Atlas of modern dinoflagellate cyst distribution based on 2405 data points. *Rev Palaeobot Palyno* **191**: 1-197.
- Zudaire L, Roy S (2001). Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J Photoch Photobio B* **62**: 26-34.

Curriculum vitæ

Adrien BUSSARD

📍 : 30 rue Geoffroy St Hilaire 75005

@ : adriembussard@hotmail.fr

☎ : +33(0)6.89.63.82.87

26 ans

Doctorant en biologie des algues spécialisé dans l'innovation

Algues brunes - Valorisation de l'innovation - Recherche scientifique

Expériences professionnelles

- 2014 - actuel :** **Consultant au sein de la SATT LUTECH - Valorisation de l'innovation - Paris**
En association avec un chef de projet, j'interviens en tant que consultant sur la valorisation et la maturation de projets innovants du Pôle "Sciences du Vivant et Chimie".
Mon expertise : Etudes de marché et de faisabilité - Prospection industrielle - Paysage concurrentiel
- 2011 - actuel :** **Projet doctoral sur l'adaptabilité des algues brunes au MNHN - Paris**
Mon doctorat a pour but d'étudier l'adaptation de micro-algues brunes à différents facteurs environnementaux au niveau morphologique, physiologique, biologique et génétique. Des analyses originales ont été développées pour permettre des analyses multiparamétriques innovantes.
- Eté 2013 :** **Mission scientifique à Taïwan - Algae Research Center - Keelung**
Cette mission m'a permis de me former aux techniques d'analyses bio-informatiques et de rencontrer des chercheurs spécialisés dans la valorisation biotechnologique des algues (*Algae research center* à Keelung & *Green Energy Development Center* à Tainan).
- 2010 - 2011 :** **Recherche internationale en Aquaculture - France / Chili**
Stages de Master 1 : Grâce à des analyses moléculaires, j'ai mis en évidence une interaction positive entre stress et reproduction chez deux poissons migrateurs à forts intérêts économiques et aquacoles.

Formations

- 2012 - actuel :** **Doctorat sur les algues brunes UMR BOREA CNRS-MNHN-UPMC-IRD**
Mission en entreprise : Consultant valorisation au sein de la SATT LUTECH
Formations doctorales : "Innovation et valorisation" - "Communication"
- 2010 - 2012 :** **Double master international "Biologie des organismes marins" France / Chili**
Mention Bien - France UPMC et stations marines de Banyuls et Roscoff / Chili
- 2009 - 2010 :** **Master 1 "Ecologie fonctionnelle et développement durable : Bioressources aquatiques"**
Mention Bien / Major de promotion / Université Montpellier 2
- 2006 - 2009 :** **Licence "Sciences de la Vie et de la Terre"**
Mention Bien / Sous-major de promotion / Université Paris 7

Langues et informatique

Langues : Espagnol → Courant

Anglais → Intermédiaire

Informatique : Microsoft office 2013 (maîtrise complète Excel, Word et PowerPoint), Langage S, R®, Mega6, ImageJ, ...

Base de données : Orbit (brevets), Medtrack (médicaments), Frost & Sullivan (études de marché)

Activités

Aquariophilie (Cichlidés du Malawi - reproduction - grossissement) - **Tennis** (Arbitre A1 - Enseignant - Compétiteur) - **Voyage** (Chili, Pérou, Argentine, Taiwan, Espagne, UK, ...) - **Pêche**



[LinkedIn](#)

Annexe - Compétences

Dans la valorisation de l'innovation :

Mon expérience à la SATT LUTECH en tant que "doctorant-conseil" me permet de travailler à l'interface entre les laboratoires de recherche et les entreprises. J'assure le processus de valorisation et de maturation de projets innovants issus de la recherche publique dans le but d'un transfert de technologie allant jusqu'au licencing ou à la création de start-up.

Compétences scientifiques :

Microscopie : autonomie complète sur microscope à fluorescence et électronique (transmission et balayage)

Biologie : extraction et purification ARN et ADN, PCR, qPCR, cytométrie de flux FACS, HPLC, bioanalyzer, électrophorèse, spectrophotomètre, spectrofluorimètre, marquage cellulaire, méthodes diverses d'extractions...

Génomique : séquençage haut-débit de type Illumina, analyse et annotation d'un transcriptome *de novo*, bio-informatique, utilisation de divers logiciels et outils online

Algues : culture en milieu stérile, préparation de milieux de culture optimisés, gestion de la "Diatothèque", cycle de vie

Encadrement :

Accompagnement de 3 stagiaires de Master 2 :

<i>Michèle Ratsimbazafy</i>	(Ecologie - 2013 - MNHN - Tel: 0617749364)
<i>Robin de Maleprade</i>	(Chimie - 2014 - Collège de France - Tel: 0671864890)
<i>William Watkins</i>	(Chimie - 2015 - UPMC - Tel: 0667826473)

Communication internationale :

Publication scientifique : Bussard, A., Lopez, P., "Evolution of vacuolar pyrophosphatases and vacuolar H⁺-ATPases in diatoms". Journal of Marine Science and Technology (2014)

Bussard, A, Corre, E, Hubas, C, Duvernois-Berthet, E, Le corguille, G, Jourden, L, Culpier, F, Claquin, P, Lopez, P.J. "Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in acclimation to salinity gradients in diatoms". Submitted (2015)

Présentation orale : Bussard, A., Genomic analysis of adaptation to salinity in the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Summer program National Scientific Council of Taiwan (2013)

Contribution à des projets de collaboration :

Biotechnologie : Intérêt des diatomées dans l'amélioration des panneaux photovoltaïques

Acteurs du projet : Collège de France - MNHN - EDF

Ecologie : Production primaire dans l'estuaire de Seine

Acteurs du projet : Université de Caen - MNHN - IFREMER - GIP Seine-Aval

Summary

Diatoms are a major group of microalgae found in numerous aquatic ecosystems. They occupy a major place within the biosphere. In order to cope with environmental constraints, should they be local or global, durable or transitory, diatoms have to develop acclimation strategies implicating various physiological trade-off and genomic responses. Studying these acclimation capabilities not only enables the understanding of their passed evolution, but also makes possible the anticipation of their becoming facing global changes. In this study, we have explored the acclimation capabilities of diatoms integrating physiological, morphological and transcriptomic studies.

After sequencing the transcriptome of *Thalassiosira weissflogii*, short (5 days) and long-term (2 years) experiments were undertaken focusing on hyposalin gradient acclimation. We were able to see a relatively close fitness and physiology regardless of the hyposalin gradient or the acclimation duration imposed in this euryhalin specie. However, this temporal difference leads to a strong transcriptome modification. Indeed, after a two year acclimation period, the cost of transcription for several genes was reduced. Certain genes belonging to the metabolism of energy or to the inorganic carbon incorporation seemed to be adjusted. This transcriptomic reprogramming, which is not without consequences to the valve's morphogenesis, could constitute an evolution of the tolerance to the salinity of *T. weissflogii*.

In order to better understand the acclimation strategies in diatoms, a comparative study between costal *T. weissflogii* and oceanic *T. oceanica* diatoms was undertaken. The two species were exposed to a pH and salinity gradients, which revealed, regardless of the homogenous fitness, a different transcriptional effort relatively specific to the two species. Although, the salinity gradient leads to a more important differential expression compared to the pH gradient in the *T. oceanica* species, in *T. weissflogii*, it is the pH gradient which requires the differential expression of a wider range of genes. The homeostasis of the cytosolic pH is dependant of these two abiotic factors though its regulation is also relatively different for these two species transcribing a different management of the homeostasis.

We propose that diatoms have, during their evolution and adaptation to different environments, developed relatively specific acclimatization strategies which adjust depending on the duration of the stress in order to optimise their fitness.

Résumé

Les diatomées sont un groupe majeur de microalgues retrouvées dans de nombreux écosystèmes aquatiques et qui occupent une place primordiale dans la biosphère. Pour faire face aux contraintes environnementales aussi bien locales que globales, transitoires ou durables, les diatomées doivent mettre en place des stratégies d'acclimatation impliquant différents compromis physiologiques et réponses génomiques. Etudier ces capacités d'acclimatation permettrait non seulement de comprendre leur évolution passée, mais aussi d'anticiper leur devenir face aux changements globaux. Dans cette étude, nous avons exploré les capacités d'acclimatation des diatomées en intégrant des études physiologiques, morphologiques et transcriptomiques.

Après avoir séquencé le transcriptome de *Thalassiosira weissflogii*, des expériences d'acclimatation à un gradient hyposalin à court (5 jours) et à long-terme (2 ans) ont été réalisées. Nous avons pu constater, chez cette espèce euryhaline, une fitness et une physiologie relativement proches quel que soit le gradient hyposalin ou quelle que soit la durée d'acclimatation imposés. En revanche, cette différence temporelle a entraîné une modification forte du transcriptome. En effet, après 2 ans d'acclimatation, le coût transcriptionnel pour un certain nombre de gènes semble réduit. Certains gènes appartenant au métabolisme énergétique ou à l'incorporation du carbone inorganique semblent s'ajuster. Cette reprogrammation transcriptomique, qui n'est pas sans conséquence sur la morphogénèse des valves, pourrait constituer une évolution de la tolérance à la salinité de la souche *T. weissflogii*.

Pour mieux comprendre les stratégies d'acclimatation chez les diatomées, une étude comparative entre la diatomée côtière *T. weissflogii* et la diatomée océanique *T. oceanica* à des gradients couplés de pH et de salinité révèle un effort transcriptionnel différents et relativement spécifique pour ces deux espèces malgré une fitness homogène. Alors que le gradient salin entraîne une expression différentielle plus importante que celle observée pour le gradient pH chez *T. oceanica*, l'inverse est observé chez *T. weissflogii*. L'homéostasie du pH cytosolique est dépendante de ces deux facteurs abiotiques mais sa régulation est elle aussi relativement différente pour ces deux espèces traduisant une gestion différente de cette homéostasie.

Nous proposons que les diatomées ont, au cours de l'évolution et des adaptations à différents milieux de vie, développé des stratégies d'acclimatation relativement spécifiques qui s'ajustent en fonction de la durée du stress pour optimiser leur fitness.