

Doctorat : REGULATION EPITRANSCRIPTOMIQUE DANS L'ADAPTATION A DES STRESS ENVIRONNEMENTAUX CHEZ L'HUÎTRE *Crassostrea gigas* (RIVAgE)

Supervision / contact	Guillaume Rivière, PHD HDR guillaume.riviere@unicaen.fr +33231565113
Laboratoire	UMR BOREA, MNHN, CNRS 8067, SU, IRD 207, UCN, UA ; site de Caen
Début du contrat	1 ^{er} Octobre 2022
Durée du contrat	36 mois
Date limite de candidature	1er juillet 2022 – à soumettre dès que possible
Salaires	Selon grille officielle, environ 1750 euros bruts/mois

Mots-Clés :

Chromatine, Méthylation, Environnement, Epigénétique, Epitranscriptomique, Huître, Ploïdie, Conformation, Structure.



Aperçu général du projet de thèse RIVAgE

Contexte général :

1. Objectif général et questions de recherche traitées.

Les modifications épitranscriptomiques (méthylation de l'ARN, N⁶-mA ou m6A) émergent comme un niveau supplémentaire de régulation de l'expression des gènes, notamment en réponse au stress chez de nombreux animaux. Chez l'huître, les conditions de l'environnement maternel sont reflétées par des signatures spécifiques dans les épitranscriptomes ovocytaires qui sont transmis à la génération suivante (Le Franc et al., *in prep*). **Nous émettons l'hypothèse que la régulation épitranscriptomique participerait à l'adaptation de l'huître *Crassostrea gigas* d'une part à court terme en modulant la réponse adaptative de l'expression des gènes lors de stress environnementaux et d'autre part à plus long terme en conditionnant le développement de la génération suivante.** Le projet de thèse RIVAgE a donc pour objectif de traiter les questions suivantes : - Objectif 1 : La régulation épitranscriptomique participe-t-elle à la régulation de l'expression des gènes lors de stress environnementaux chez l'huître ? Si oui, un verrouillage chromatinien par méthylation d'ARN non codants (m6A-carRNA) est-il impliqué ? - Objectif 2 : Les signatures épitranscriptomiques induites par l'environnement maternel dans les ovocytes affectent-elles le développement de la génération suivante ? Ces connaissances permettront de mieux comprendre l'adaptation de l'huître à l'échelle de l'individu mais également de la population, des enjeux cruciaux au niveau fondamental mais également dans le contexte d'une conchyliculture soumise à une pression environnementale croissante.

2. Contexte de l'étude et méthodologie.

A l'interface terre/mer, les écosystèmes littoraux sont particulièrement exposés à des stress environnementaux abiotiques et biotiques divers. Parmi eux, les efflorescences de microalgues toxiques (Harmful Algal Blooms, HAB) et la contamination aux pesticides et herbicides (PH) ont une prévalence croissante et émergent en tant que facteurs de stress préoccupants. L'étude de leurs effets spécifiques est un enjeu majeur dans la compréhension de la résilience des écosystèmes aquatiques. Les HAB sont des stress biotiques de plus

en plus fréquents, intenses et étendus, néfastes pour certaines espèces et communautés en zones côtières et la chaîne trophique qu'elles supportent, perturbant ainsi les écosystèmes marins[1]. Les dinoflagellés toxiques du genre *Alexandrium*, largement présentes dans tous les océans tempérés[2], produisent des phycotoxines paralysantes qui s'accumulent dans les organismes marins et peuvent être létales pour l'homme dans les cas extrêmes. Ces efflorescences sont également délétères pour la prise de nourriture et la reproduction chez les bivalves filtreurs via des altérations comportementales et cellulaires[3–5]. De manière similaire, la contamination aux pesticides est également préoccupante pour l'écosystème littoral[6] dans la mesure où elle promeut le découplage de communautés à la base du réseau trophique[7] et où la bioaccumulation des contaminants est à problématique pour la santé des organismes aquatiques[8,9]. Ainsi, des stress environnementaux distincts représentent un risque pour la pérennité des écosystèmes marins littoraux notamment *via* leur impact délétère à court et long terme sur la physiologie et les populations d'organismes filtreurs, particulièrement exposés et affectés par ces pollutions.

L'adaptation des organismes aux changements environnementaux est largement déterminée par des changements transcriptionnels permettant une physiologie appropriée. Bien que la dynamique adaptative du transcriptome soit liée à la dynamique du génome[10], les mécanismes précis restent mal décrits. Pourtant, ils conditionnent la survie des espèces et la sélection évolutive, une question cruciale dans le contexte du changement global. Il a été suggéré que les signaux environnementaux déclencheraient et orienteraient la régulation transcriptomique par des mécanismes épigénétiques[11–13]. L'épigénome est constitué de marques chimiques réversibles de l'ADN et/ou des histones, ou encore d'ARNs, qui contrôlent la compaction de la chromatine, la transcription et la traduction. Ces marques et les états transcriptionnels induits peuvent être héréditaires et dépendent de voies enzymatiques, donc des facteurs environnementaux au sens large. A l'échelle de l'individu, durant l'établissement de la lignée germinale, l'environnement parental façonne l'épigénome transmis à la génération suivante et influence le développement et l'adaptation de la descendance[14]. L'hérédité épigénétique permet donc la transmission de caractères acquis, une telle 'empreinte parentale' ayant des conséquences multi- voire transgénérationnelles majeures[15]. A plus long terme, un signal environnemental fort et/ou répété associé à une épimutation peut être fixé dans le génome à l'échelle d'une population et guider l'adaptation de l'espèce au cours de son évolution[16–18].

La N6-méthyladenosine (m6A) est la modification la plus abondante des ARNm eucaryotes, une modification épigénétique affectant le transcriptome et appelée 'épitranscriptomique'. Elle est réversible et résulte de l'activité d'une machinerie enzymatique complète[19]. Il s'agit d'un régulateur crucial de la traduction qui contrôle l'épissage[20] et la stabilité de l'ARN[21]. La m6A-ARN influence également la transcription[22] *via* la méthylation d'ARNs régulateurs associés aux chromosomes (carARNs)[23] qui modulent la structure de la chromatine, comme illustré par l'inactivation du chromosome X, 'verrouillé' chez les mammifères par la m6A-méthylation de l'ARN non codant Xist[24]. La m6A-ARN participe au contrôle de nombreuses fonctions biologiques[25–28], dont la réponse au stress chez les Vertébrés notamment par l'expression des *Heat Shock Proteins*[29] et le trafficking d'ARNm des granules de stress[30]. Des observations similaires ont été réalisées chez les insectes[31] et *C. elegans*[32], et réciproquement la voie épitranscriptomique semble elle-même sensible à l'exposition à des toxiques dans une lignée cellulaire humaine[33]. Toutefois, ces mécanismes restent largement inconnus chez les Lophotrochozoaires, pourtant représentatifs d'une très large diversité d'espèces et d'écologies. Par ailleurs, la m6A-ARN est cruciale pour le développement précoce à de nombreux niveaux chez les vertébrés et les Insectes. Elle gouverne l'identité souche des cellules et leur différenciation[34], déclenche l'activation du génome zygotique[35], conditionne la maturation méiotique de l'ovocyte et contrôle la traduction dans l'embryon de xenope[36].

L'huître *Crassostrea gigas* (e.g. *Magallana gigas*) est un mollusque bivalve filtreur présentant des larves pélagiques et des adultes sessiles au cycle de reproduction annuel, la gonade se mettant en place chaque année à partir de cellules germinales souches. L'ovogenèse, pendant laquelle les ARN maternels s'accumulent dans l'ovocyte, est ainsi particulièrement soumise aux changements et stress environnementaux. De nombreuses données génomiques[37], transcriptomiques[38] et épigénétiques[39] sont disponibles chez ce modèle Lophotrochozoaire qui constitue au sein de l'écosystème conchylicole une espèce sentinelle pour la bio-surveillance du milieu marin. Ainsi, les stades larvaires, cruciaux pour le développement et la survie de l'espèce, sont utilisés en recherche en écotoxicologie ainsi qu'en surveillance[40] pour tester la toxicité des polluants chimiques (norme AFNOR XP-T90-382). Chez *C. gigas*, les efflorescences toxiques d'*Alexandrium sp.* diminuent la prise alimentaire[41], impactent la reproduction[3] et diminuent la survie des larves[4]. Notamment dans le

cadre du projet RIN ECUME (P. Favrel), nous avons récemment démontré qu'une voie épitranscriptomique complète était conservée chez l'huître[42], et qu'elle régule les étapes clés du développement embryo-larvaire (Le Franc *et al.*, bioRxiv 458180, en révision). Nous avons établi que des stress environnementaux (HAB et microplastiques) induisent des signatures spécifiques dans les épitranscriptomes ovocytaires, qui constituent ainsi un vecteur d'héritage de l'environnement maternel (Le Franc *et al.*, in prep) et attestent de la transmission verticale de traits de vie chez l'huître par voie épitranscriptomique, en parallèle d'autres mécanismes épigénétiques[43]. Cependant, bien que les ARNs maternels soient la seule ressource pour la synthèse de protéines dans l'embryon avant l'activation du génome zygotique, les conséquences fonctionnelles d'épitranscriptomes hérités altérés par des traits de vie parentaux sur le développement des descendants restent inconnues chez l'huître, un modèle d'intérêt fondamental et appliqué fortement exposé.

Alors que les stress environnementaux (pesticides, HAB) pourraient menacer la pérennité de l'écosystème conchylicole notamment en altérant la physiologie des huîtres adultes puis le développement précoce de leurs descendants, les mécanismes moléculaires médiateurs de leurs réponses adaptatives et de leurs effets multigénérationnels restent largement inconnus. Cependant, le rôle prévalent des mécanismes épigénétiques dans l'adaptation à l'environnement au cours de l'évolution est attesté. **La régulation épitranscriptomique (m6A-ARN) émerge comme un régulateur épigénétique majeur de la réponse au stress chez les Vertébrés et les Insectes, une voie de régulation conservée chez l'huître.** En outre, nous avons montré que **les ARN qui s'accumulent pendant la gamétogenèse, et qui constituent les seules ressources pour la synthèse des protéines lors du développement précoce** en amont de l'activation du génome zygotique, véhiculent des signatures épitranscriptomiques spécifiques de l'environnement maternel chez *C. gigas*. Nous émettons donc l'hypothèse que **Les épitranscriptome peuvent constituer une source majeure de variabilité phénotypique et conditionner le succès du développement**, c'est à dire la **vulnérabilité de *C. gigas* et son adaptation aux stress environnementaux à court terme et au fil des générations.**

Pour tester cette hypothèse, nous proposons le projet de thèse RIVAgE structuré de la manière suivante :

- **Objectif 1 :** Déterminer le rôle de la régulation épitranscriptomique dans la réponse adaptative à court terme à des stress environnementaux par une approche intégrée. Dans un premier temps, une approche *in silico* (exploitation des données RNAseq de la banque GigaTON[38] sera entreprise pour étudier l'influence de nombreux stress environnementaux sur l'expression des gènes de la voie épitranscriptomique (writers, erasers, readers). Ces résultats seront validés en RT-qPCR sur des couples tissus/stress choisis reproduits et échantillonnés au laboratoire. Les niveaux associés de m6A-ARN seront mesurés par LC-MS/MS (plateforme ICORE PRISMM) afin de valider au niveau fonctionnel un éventuel lien causal entre environnement et épitranscriptome chez l'huître (**Objectif 1.1**). Dans un second temps, des gonades de géniteurs adultes exposés respectivement à un cocktail environnemental de pesticides ou à l'algue toxique *A. minutum* seront analysés. Ces échantillons sont générés dans le cadre d'autres projets (ANR JCJC PESTO R. Sussarellu 2020-2024 et ANR HABIS H. Hégarret demande 2022-2026). Ils permettront d'établir le lien entre les épitranscriptome induits par les stress distincts et l'expression des gènes à l'échelle globale en confrontant les transcriptomes (RNAseq) avec les m6A-méthylomes par séquençage direct epiRNAseq Nanopore[44,45]. Cette méthodologie innovante permet de d'obtenir une cartographie à haute résolution et à haut débit sans traitement chimique ni perte d'information lors de l'amplification des bibliothèques. Le MeRIP-seq, moins informatif mais éprouvé au laboratoire, pourra être envisagé en remplacement le cas échéant (**Objectif 1.2**). L'étude de ces mécanismes sera envisagée sous l'angle d'un mécanisme de verrouillage chromatinien m6A-dépendant par des ARN non codants (m6A-carRNAs) dont l'implication est suggérée par la littérature[23] et constitue l'axe 2 du RIN EMERGENCE SCHEMAh (G. Rivière 2021-2023) (**Objectif 1.3**).

- **Objectif 2 :** Caractériser l'influence d'altérations épitranscriptomiques précoces induites par l'environnement maternel sur le développement embryo-larvaire de la génération suivante. Cette caractérisation se déroulera en deux étapes. Dans un premier temps, des perturbations globales des épitranscriptomes seront induites par l'exposition *in vitro* de stades précoces à l'UZH1a, un inhibiteur spécifique d'ARN méthyltransférase, développé récemment[46]. Le développement rapide de l'huître (organogenèse larvaire complète en 24h au stade larve D) permettra d'observer en microscopie optique et électronique à balayage (plateforme ICORE CMABio³) d'éventuelles différences phénotypiques entre embryons traités et contrôles. Les mécanismes moléculaires sous-jacents seront examinés comme précédemment, d'abord par évaluation des niveaux de m6A au niveau de séquences cibles par MeRIP-qPCR (ou au niveau global par LC-

MS/MS si les quantités d'ARN le permettent), puis également par RNAseq vs. epiRNAseq Nanopore) (*Objectif 2.1*). Dans un second temps, cette méthodologie sera appliquée à des embryons d'huîtres issus des géniteurs exposés respectivement à un cocktail environnemental de pesticides ou au dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*, décrits dans l'objectif 1 (*Objectif 2.2*).

3. Perspectives.

Le projet de thèse **RIVAgE** apportera des éléments clés pour la compréhension de la **régulation épitranscriptomique de l'adaptation de l'huître, première ressource conchylicole en Normandie, à l'échelle de l'individu mais également de la population**. Les perspectives sur un plan fondamental, à travers les épitranscriptomes et les transcriptomes générés, permettront de mieux comprendre la **sensibilité physiologique de *C. gigas* à différents stress environnementaux prévalents** (microalgues toxiques, pesticides). En parallèle, l'aspect 'multigénérationnel' du projet aidera à mieux cerner l'**adaptabilité de l'huître dans l'écosystème conchylicole et son évolution**. A plus long terme, la caractérisation des **implications fonctionnelles d'une héritabilité épitranscriptomique chez un modèle marin distant, à ce jour inconnues**, représenterait une **percée majeure en épigénétique environnementale** qui ouvre des pistes de recherches aussi bien sur un plan **moléculaire** qu'en termes de conception des relations entre environnement, adaptation, hérédité, développement et évolution. **Sur un plan plus appliqué**, l'étude des effets spécifiques du type de stress pourront à terme fournir des **marqueurs épitranscriptomiques et transcriptomiques potentiellement utiles pour la prédiction de la vulnérabilité de la génération suivante d'huîtres** dans un contexte de stress environnementaux variés. Ces **perspectives sont autant d'enjeux importants** pour la gestion de la ressource et la **durabilité de la conchyliculture au sein de socio-écosystèmes littoraux sous pression anthropique croissante dans un contexte de changement global**.

Compétences attendues :

Le/la candidat(e) sera titulaire d'un Master 2 en sciences de la vie orienté biologie moléculaire, biologie animale, physiologie, génomique. Des connaissances en biologie du développement et écophysologies seraient utiles. Il/elle et possèdera une bonne maîtrise théorique dans l'ensemble de ces domaines. Le/la candidat(e) devra avoir des compétences en biologie moléculaire à la paillasse et éventuellement en bioinformatique. Une expérience ou une connaissance de modèles marins, idéalement dans un contexte écophysologique ou de challenge environnemental, serait un atout mais n'est pas strictement requise. Intégré au sein d'une équipe pluridisciplinaire, le/la candidat(e) devra être curieux, capable de travailler en équipe au sein d'un groupe composé d'enseignants-chercheurs, de chercheurs, d'ingénieurs, de doctorants et d'étudiants en Master. A ce titre, un niveau de français ou d'anglais permettant une communication fluide est indispensable.

Cadre de travail et moyens mis à disposition :

Le présent contrat se déroulera au sein de l'unité BOREA – Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques – MNHN, CNRS 8067, SU, IRD 207, UCN, UA sur le site de l'Université de Caen Normandie (<https://borea.mnhn.fr>). Le doctorant sera accueilli par l'équipe EMERGE (Environnement, épi-gEnomes, déteRminismes et ontoGEnèses) (<https://borea.mnhn.fr/fr/equipe-recherche-axe-implantation/emerge-environnement-%C3%A9pi-g%C3%A9nomes-d%C3%A9terminismes-ontogen%C3%A8ses>), et s'inscrira dans les axes thématiques 'influence des conditions environnementales sur les processus d'ontogenèse' et 'épigénétique et ontogenèse' de l'équipe.

Le site de Caen de l'unité offre l'accès à l'ensemble des ressources nécessaires à la réalisation du projet, notamment en termes de biologie moléculaire. La plupart des équipements est disponible au laboratoire (Nanodrop, qPCR, séquenceur Nanopore...). Certains aspects pourront s'appuyer sur les plateformes de l'université telles que le CMABio3 (Centre de microscopie appliqué à la biologie <https://www.unicaen.fr/laboratoire/plateau-technique-cmabio-centre-de-microscopie-appliquee-a-la-biologie-%C2%B7-cmabio/>), le CREC Centre de

Ressources en Ecologie Côtière (station marine de Luc-sur-Mer (<https://crec.unicaen.fr/>)) et la plateforme de transcriptomique PROTEOGEN (<https://www.unicaen.fr/laboratoire/plateau-technique-proteogen-%C2%B7-proteogen/>).

Les calculs pourront bénéficier du supercalculateur de l'Ifremer (DATARMOR – <https://wwz.ifremer.fr/pcdm/Equipement>).

Des missions en station marine et en externe (congrès/collaborations) sont à envisager. Aucun risque particulier en dehors des pratiques classiques de laboratoire n'est à considérer de manière spécifique.

Le contrat est supporté par le Conseil Régional de Normandie (RIN Doctorants 2022) et les expérimentations par le programme SCHEMAh (G. Rivière, RIN Recherche Emergent 'SCHEMAH' – convention 00110890-21^F05080 du 01/11/2021 au 30/04/2024) et par le projet ANR PRC HABIS (H. Hégaret – C. Fabioux, évaluatino en phase 2).

Candidature :

CV + lettre de motivation + recommandations

à guillaume.riviere@unicaen.fr

objet : [RIVAGe] candidature

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Harvell CC, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, et al. Emerging marine diseases – climate links and anthropogenic factors. *Science* (80-) 1999;285:1505–10.
- [2] Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993;32:79–99.
- [3] Le Goïc N, **Hégaret H**, **Fabioux C**, Miner P, Suquet M, Lambert C, et al. Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output : application of flow cytometry assays on spermatozoa. *Aquat Living Resour* 2013;26:221–8.
- [4] Castrec J, **Hégaret H**, Alunno-Bruscia M, Picard M, Soudant P, Petton B, et al. The dinoflagellate *Alexandrium minutum* affects development of the oyster *Crassostrea gigas*, through parental or direct exposure. *Environ Pollut* 2019;246:827–36.
- [5] Leverone JR, Blake NJ, Pierce RH, Shumway SE. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxicon* 2006;48:75–84.
- [6] Čelić M, Jaén-Gil A, Briceño-Guevara S, Rodríguez-Mozaz S, Gros M, Petrović M. Extended suspect screening to identify contaminants of emerging concern in riverine and coastal ecosystems and assessment of environmental risks. *J Hazard Mater* 2021;404:124102.
- [7] Pringault O, Bouvy M, Carre C, Fouilland E, Meddeb M, Mejri K, et al. Impacts of chemical contamination on bacterio-phytoplankton coupling. *Chemosphere* 2020;257:127165.
- [8] Derby A, Fuller N, Huff Hartz K, Segarra A, Connon R, Brander S, et al. Trophic transfer, bioaccumulation and transcriptomic effects of permethrin in inland silversides, *Menidia beryllina*, under future climate scenarios. *Env Pollut* 2021;275:116545.
- [9] Farrington J. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Env Heal Perspect* 1991;90:75–84.
- [10] Dowle EJ, Powell THQ, Doellman MM, Meyers PJ, Calvert MB, Walden KKO, et al. Genome-wide variation and transcriptional changes in diverse developmental processes underlie the rapid evolution of seasonal adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:23960–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002357117>.
- [11] Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2011;13:97–109. <https://doi.org/10.1038/nrg3142>.
- [12] Vandegheuchte MB, Janssen CR. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 2011;20:607–24. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0634-0>.
- [13] Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* 2019;571:489–99.

- [14] Flores K, Wolschin F, Corneveaux JJ, Allen AN, Huentelman MJ, Amdam G V. Genome-wide association between DNA methylation and alternative splicing in an invertebrate. *BMC Genomics* 2012;13:480. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-480>.
- [15] Plasschaert RN, Bartolomei MS. Genomic imprinting in development , growth , behavior and stem cells. *Development* 2014;141:1805–13. <https://doi.org/10.1242/dev.101428>.
- [16] Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet* 1989;83:181–8.
- [17] Rollo CD. Radiation and the regulatory landscape of neo2-Darwinism. *Mutat Res* 2006;597:18–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.09.009>.
- [18] Branciamore S, Rodin AS, Riggs AD, Rodin SN. Enhanced evolution by stochastically variable modification of epigenetic marks in the early embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:6353–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402585111>.
- [19] Gilbert W V, Bell TA, Schaening C. Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science* 2016;352:1408–12. <https://doi.org/10.1126/science.aad8711>.
- [20] Zhao X, Yang YY-G, Sun B-F, Shi Y, Yang X, Xiao W, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res* 2014;24:1403–19. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.151>.
- [21] Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, et al. 5'-UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* 2015;163:999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>.
- [22] Shi H, Wei J, He C. Where , When , and How : Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers and Erasers. *Mol Cell* 2019;74:640–50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.025>.
- [23] Liu J, Dou X, Chen C, Chen C, Liu C, Michelle Xu M, et al. N6-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science (80-)* 2020;367:580–6. <https://doi.org/10.1126/science.aay6018>.
- [24] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, et al. M6 A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 2016;537:369–73. <https://doi.org/10.1038/nature19342>.
- [25] Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, et al. XRNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell* 2013;155:793–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.026>.
- [26] Hong JR, Lin GH, Lin CJ, Wang WP, Lee CC, Lin TL, et al. Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. *Development* 2004;131:5417–27.
- [27] Zhang L, Hou C, Chen C, Guo Y, Yuan W, Yin D, et al. The role of N6-methyladenosine (m6A) modification in the regulation of circRNAs. *Mol Cancer* 2020;19:1–11.
- [28] Lence T, Akhtar J, Bayer M, Schmid K, Spindler L, Ho CH, et al. M6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature* 2016;540:242–7. <https://doi.org/10.1038/nature20568>.
- [29] Lu Z, Ma Y, Li Q, Liu E, Jin M, Zhang L, et al. The role of N6-methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*). *Cell Stress Chaperones* 2019;24:333–42. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-00965-x>.
- [30] Huang L, Ashraf S, Wang J, Lilley DM. Control of box C/D snoRNP assembly by N 6 -methylation of adenine . *EMBO Rep* 2017;18:1631–45. <https://doi.org/10.15252/embr.201743967>.
- [31] Jiang T, Li J, Qian P, Xue P, Xu J, Chen Y, et al. The role of N6 -methyladenosine modification on diapause in silkworm (*Bombyx mori*) strains that exhibit different voltinism. *Mol Reprod Dev* 2019;86:1981–92. <https://doi.org/10.1002/mrd.23283>.
- [32] Liberman N, O’Brown Z, Earl A, Boulias K, Gerashchenko M V, Wang S, et al. N6-adenosine methylation of ribosomal RNA affects lipid oxidation and stress resistance. *Sci Adv* 2020;6:eaaz4370.
- [33] Cayir A, Barrow TM, Guo L, Byun HM. Exposure to environmental toxicants reduces global N6-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes. *Environ Res* 2019;175:228–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.011>.
- [34] Batista PJ, Molinie B, Wang J, Qu K, Zhang J, Li L, et al. M6A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014;15:707–19. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.019>.
- [35] Zhao BS, Wang X, Alana V, Lu Z, Shi H, Kuuspalu A, et al. m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 2017;542:475–8. <https://doi.org/10.1038/nature21355>.
- [36] Qi ST, Ma JY, Wang ZB, Guo L, Hou Y, Sun QY. N6 -methyladenosine sequencing highlights the

- involvement of mRNA methylation in oocyte meiotic maturation and embryo development by regulating translation in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 2016;291:23020–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748889>.
- [37] Zhang GG, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 2012;490:49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>.
- [38] **Riviere G**, Klopp C, Ibouniyamine N, Huvet A, Boudry P, Favrel P. GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics* 2015;16:401. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0833-4>.
- [39] **Riviere G**, He Y, Tecchio S, Crowell E, Sourdain P, Guo X, et al. Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet* 2017;13:e1006807.
- [40] Schintu M, Buosi C, Galgani F, Marrucci A, Marras B, Ibba A, et al. Interpretation of coastal sediment quality based on trace metal and PAH analysis, benthic foraminifera, and toxicity tests (Sardinia, Western Mediterranean). *Mar Pollut Bull* 2015;94:72–83.
- [41] Castrec J, Soudant P, Payton L, Tran D, Miner P, Lambert C, et al. Bioactive extracellular compounds produced by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* are highly detrimental for oysters. *Aquat Toxicol* 2018;199:188–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.034>.
- [42] Le Franc L, Bernay B, Petton B, Since M, Favrel P, **Rivière G**. A functional m6A-RNA methylation pathway in the oyster *Crassostrea gigas* assumes epitranscriptomic regulation of lophotrochozoan development. *FEBS J* 2020;288:1696–711. <https://doi.org/10.1111/febs.15500>.
- [43] Rondon R, Grunau C, Fallet M, Charlemagne N, **Sussarellu R**, Chaparro C, et al. Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environ Epigenetics* 2017;3:1–13. <https://doi.org/10.1093/eep/dvx004>.
- [44] Liu H, Begik O, Lucas MC, Ramirez JM, Mason CE, Wiener D, et al. Accurate detection of m6A RNA modifications in native RNA sequences. *Nat Commun* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11713-9>.
- [45] Pelizzola M, Zhong C, Chandra Janga S, Ponomarenko J, Novoa EM, Cozzuto L, et al. MasterOfPores: A Workflow for the Analysis of Oxford Nanopore Direct RNA Sequencing Datasets 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00211>.
- [46] Moroz-Omori E V., Huang D, Kumar Bedi R, Cheriyaunkunel SJ, Bochenkova E, Dolbois A, et al. METTL3 Inhibitors for Epitranscriptomic Modulation of Cellular Processes. *ChemMedChem* 2021. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100291>.