

Année universitaire :2015.-2016.

Spécialité :

Agronomie

Spécialisation (et option éventuelle) :

Sciences halieutiques et aquacoles.

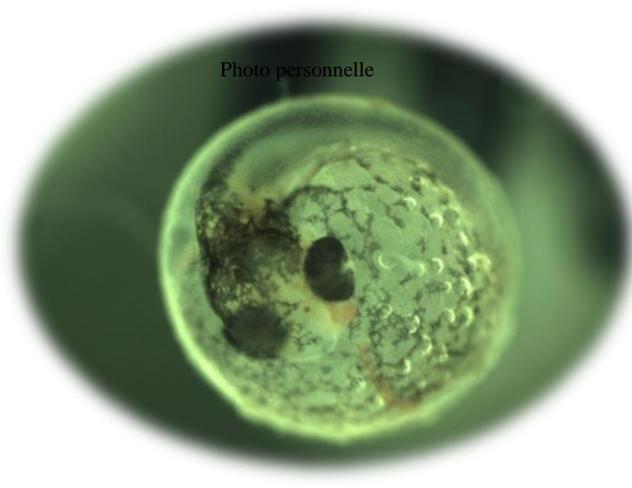
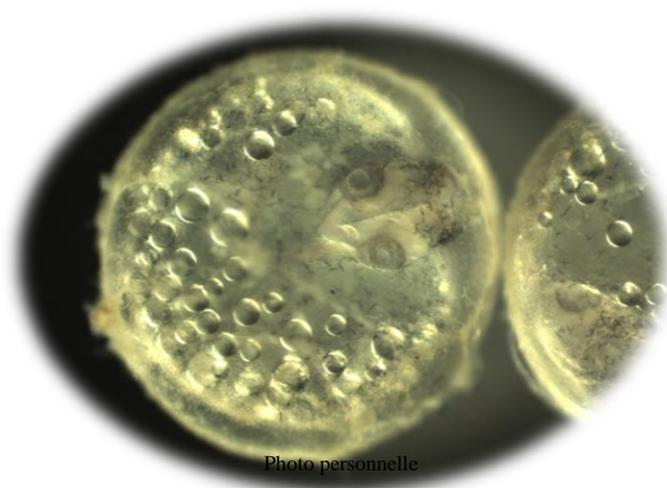
Dominante aquaculture.....

Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Caractérisation moléculaire des ADNs méthyltransférases chez le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus* et étude du rôle fonctionnel de la méthylation de l'ADN.

Par : Laury Lescat



Soutenu à **Rennes** le* **13 septembre**
2016

Devant le jury composé de :

Président : Dominique Ombredane, Agrocampus Ouest

Maître de stage : Frederic Silvestre, Laboratoire de
Physiologie Adaptative et Evolutive, NAMUR

Autres membres du jury :

Elodie Réveillac, Agrocampus Ouest

Eric Petit, Inra Rennes

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier, mon maître de stage, le professeur Frédéric Silvestre, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir accordé sa confiance et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour le temps que tu as toujours su prendre pour moi, même lorsqu'il ne s'agissait que de petits moments de « papotes ». Tes conseils avisés m'auront permis d'apprendre énormément sur comment mener à bien un projet. Pour ton savoir, ton expertise, ta bonne humeur, et ta gentillesse, un grand merci.

Je tiens à remercier Alexandre, mon encadrant scientifique de m'avoir apporté son expertise sur l'épigénétique et le rivulus des mangroves. Merci pour tes conseils pertinents et tes corrections, tes idées sur mon sujet et de m'avoir appris énormément sur la faune sauvage autour du globe, par tes photographies et tes connaissances.

Un grand merci, à mes deux copines de bureau : Alessandra et Anne-Sophie. Vous avez été mes premiers soutiens pendant mes moments de doutes, mais surtout mes camarades de fous rires, de papotes, de bonne ambiance. Vous êtes exceptionnelles les filles, ne changez rien ! Je ne peux que vous remercier de votre patience, de votre gentillesse, et d'avoir toujours porté une oreille attentive à mes questions et propositions. Sans vous le stage n'aurait définitivement pas été le même !!!

Morgane, Toa, Antoine, Devdutt, Marie, Elodie(s), Valérie... Que vous dire à part merci d'être les personnes que vous êtes, de votre aide, de vos conseils, et de votre bonne humeur au laboratoire. J'ai passé d'excellents moments avec vous, merci.

Pour finir, le plus grand des mercis à ma famille et mes ami(e)s qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours, dans mon projet professionnel, mes séjours à l'étranger, et bien évidemment lors de ces stages. Vous avez toujours eu les mots qui m'ont portée et rassurée, sans vous, je ne serais pas qui je suis.

Liste des abréviations

- + **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- + **ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- + **ARN** : Acide Ribonucléique
- + **ARNm** : Acide Ribonucléique messenger
- + **ARNt** : Acide Ribonucléique de transfert
- + **DNMTs** : DNA methyltransferase
- + **H₂S** : Sulfure d'hydrogène
- + **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- + **Ppt** : Part per thousands
- + **RT-qPCR** : Reverse transcriptase- quantitative Polymerase Chain Reaction
- + **T_m** : Température d'hybridation

Liste des figures

Figure 1 : Photos de <i>Kryptolebias marmoratus</i>	2
Figure 2 : Cycle de développement de <i>K.marmoratus</i> (Fellous et al. 2016)	3
Figure 3 : Schéma de la structure chimique de la cytosine lors de la méthylation de l'ADN ...	4
Figure 4 : Schéma simplifié de la réaction de PCR... ..	7
Figure 5 : Première étape de la réaction de rétro-transcription	9
Figure 6 : Etape de polymérisation de l'ARNm en ADNc	10
Figure 7 : Exemple de diagramme d'amplification	11
Figure 8 : Exemple de courbes de fusion.....	11
Figure 9 : Design expérimental des expositions à la 5-Azacytidine et à la pronase.	12
Figure 10 : Design expérimental des expositions à la température.....	13
Figure 11 : Amplification des gènes codant pour les DNMTs.....	15
Figure 12 : Représentation des domaines conservés pour les séquences de DNMTs.....	16
Figure 13 : Arbre phylogénétique des différentes DNMTs par le modèle Maximum Likelihood Tree	17
Figure 14 : Photos du développement des œufs exposés au stade gastrula en fonction des 3 températures et des différents time-points.	18
Figure 15 : Influence de la température sur le développement morphologique et la mortalité des œufs exposés au stade gastrula.	19
Figure 16 : Photos du développement des œufs exposés au stade St17-19 en fonction des 3 températures et des différents time-points..	21
Figure 17 : Influence de la température sur le développement morphologique et la mortalité des œufs.....	22
Figure 18 : Expression des DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3 pour quelques stades développement	23
Figure 19 : Impacts de la température sur l'expression des gènes codants pour DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3.	24

Liste des annexes

- ✚ **Annexe 1** : Schéma de synthèse du fonctionnement des DNMTs
- ✚ **Annexe 2** : Tableau récapitulatif des gènes ayant la plus grande homologie avec *K.marmoratus*
- ✚ **Annexe 3** : Arbres phylogénétiques (Minimum Evolution Tree et Neighbor-joining Tree) combinés
- ✚ **Annexe 4** : Sortie numérique des résultats statistiques sous GraphPad
- ✚ **Annexe 5** : Calculs de l'expression relative des gènes par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$

Table des matières

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Introduction	1
Matériel et Méthodes	6
1. Elevage de <i>Kryptolebias marmoratus</i>	6
2. Caractérisation moléculaire des DNMTs chez <i>K.marmoratus</i>	6
2.1. Design des amorces.....	6
2.2. PCR haute fidélité	6
2.3. Phylogénie.....	7
3. Expression des ARNm des DNMTs.....	8
3.1. Extraction des ARN totaux	8
3.2. Rétro-transcription	8
3.2.1. <i>Traitement DNase</i>	8
3.2.2. <i>Rétro transcription</i>	9
3.3. PCR Quantitative	10
3.3.1. <i>Les amorces</i>	10
3.3.2. <i>Test de l'efficacité des amorces</i>	10
3.3.3. <i>Protocole de la PCR quantitative</i>	10
3.3.4. <i>Analyses des données</i>	11
4. Rôle biologique de la méthylation de l'ADN au cours du développement.....	11
4.1. Expositions à la 5-Azacytidine : un inhibiteur de la méthylation.....	11
4.2. Expositions aux températures	12
5. Analyses statistiques	13
Résultats	15
1. Caractérisation moléculaire des DNMTs	15
2. Caractérisation phylogénétique des DNMTs	15
3. Conséquences des expositions sur la biologie de l'espèce.....	17
3.1. Expositions à la 5-azacytidine	17
3.2. Expositions à la température	18
3.2.1. <i>Observations pour les œufs exposés au stade gastrula</i>	18
3.2.2. <i>Observations pour les œufs exposés au stade St17-19</i>	20
4. Expression des gènes codant pour les DNMTs.....	22
4.1. L'expression des gènes au cours du développement	22
4.2. L'expression des gènes après une perturbation environnementale.....	23
Discussion :	25
1. Caractérisation moléculaire des DNMTs	25
2. Caractérisation phylogénétique des DNMTs	26

3.	Expressions des gènes codant pour les DNMTs lors du développement.....	27
4.	Conséquences des expositions sur la biologie de l'espèce.....	28
4.1.	Expositions à la 5-azacytidine	29
4.2.	Expositions à la température	30
4.2.1.	<i>Impacts de la température sur le développement des œufs</i>	30
4.2.2.	<i>Influence de la température sur l'expression des DNMTs</i>	31
	Conclusion et perspectives :	32
	Bibliographie, sitographie, ouvrage :	33
	Annexes :	38

Introduction

Le réchauffement climatique est aujourd'hui une réalité qui influe sur les habitats et sur la biologie de nombreuses espèces quelles soient marines ou terrestres. Les impacts cumulés de l'augmentation de la température, de la fonte des glaces, l'augmentation du nombre de tempêtes et ouragans, la déforestation et toutes les pollutions d'origine anthropique sont une réelle menace pour la survie des organismes vivants.

Dans ces conditions là, peu d'espèces semblent pouvoir s'adapter à des changements aussi rapides.

C'est dans ce contexte que s'incorporent les études menées au laboratoire de Physiologie Adaptative et Evolutive de l'université de Namur en Belgique.

Le laboratoire a pour objectif principal de comprendre comment les organismes aquatiques s'acclimatent, s'adaptent et évoluent dans un environnement de plus en plus perturbé par les activités humaines et par les changements globaux grâce à des études protéomiques, génomiques, comportementales et épigénétiques sur deux modèles de poissons, le poisson zèbre, *Danio rerio* et le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*.

L'étude présentée ici fait partie intégrante du projet « Epigénétique et plasticités phénotypiques chez le rivulus des mangroves ». La question centrale de ce projet étant de comprendre comment les mécanismes épigénétiques régulent les mécanismes moléculaires et physiologiques à la base de l'importante plasticité phénotypique de l'espèce ainsi que de ses grandes capacités d'adaptation.

Le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*, est un téléostéen appartenant à l'ordre des Cyprinodontiformes et à la famille des Rivulidae (IUCN, 2012), anciennement classifié sous le nom de *Rivulus marmoratus* (Poey, 1880). Il est principalement inféodé aux mangroves à palétuviers rouges (*Rhizophora mangle*), du golfe du Mexique, depuis la Floride jusqu'à l'embouchure de l'Amazone où il utilise les terriers de crabes, et les racines de palétuviers comme micro-habitat (McIvor & Silverman 2010).

En milieu naturel, son espérance de vie est d'environ 4 ans, alors qu'en laboratoire elle a déjà atteint la durée de 8 ans (Données non publiées de D.S. Taylor, reviewé dans Taylor 2012).

Son régime alimentaire est composé principalement de petits invertébrés aquatiques voir terrestres mais aussi de certains juvéniles de poissons (Davis, Taylor, et Turner 1990; Huehner, Schramm, et Hens 1985). De plus, il peut présenter parfois un comportement cannibale et dévorer ses propres œufs (Kristensen 1970).

K.marmoratus peut supporter d'importants et rapides changements de salinité (espèce euryhaline) dans le milieu (Lee et al., 2008) ainsi qu'un fort gradient de température s'étendant de 7°C à 38°C (avec un optimal à 25°C) (Taylor et al., 1995). Toutefois, une température inférieure ou égale à 5°C est létale pour ce poisson, c'est pourquoi il utilise les micro-habitats (cités auparavant) comme refuges (Taylor 2012).

La première particularité du rivulus des mangroves, qui en fait un modèle d'étude unique en biologie est que celui-ci possède une importante plasticité physiologique lui permettant d'être adapté à un milieu variable que représentent les mangroves. L'une d'elle est son comportement d'émersion : pour la chasse avec une capacité à la locomotion terrestre (Pronko, Perlman, et Ashley-Ross 2013), pour échapper à la prédation ou bien lorsque les

conditions du milieu deviennent trop défavorables, comme l'hypoxie aigüe (~0,2 mg/L) ou l'augmentation des taux de H₂S combinés à une hypoxie moyenne (de l'ordre de 2mg/L) (Abel, Koenig, et Davis 1987; Regan, Jonz, et Wright 2011).

En cas de conditions très défavorables du milieu, le rivulus des mangroves est capable de rester environ 2 mois hors de l'eau en utilisant les micro-habitats qui conservent une humidité ambiante suffisante à sa survie (Taylor, 2000).

Toutefois, bien que l'émersion soit généralement induite par les conditions du milieu, il a aussi été observé par Turko et al. (2011) qu'une émersion volontaire journalière de l'animal a lieu afin de réguler l'excrétion des déchets azotés par contact de l'air sur la peau. Lors d'émersions prolongées, il a été observé la mise en place d'une angiogénèse provoquant une augmentation des nombres de vaisseaux sanguins ainsi qu'une réduction de la superficie des branchies permettant aux individus d'avoir une respiration cutanée (Cooper et al. 2012). Ce phénomène est réversible.

Une deuxième caractéristique en faisant une future bonne espèce modèle en biologie est que les populations de rivulus sont constituées majoritairement d'hermaphrodites (avec une absence totale de femelles) avec, dans des proportions variables, la présence de mâles primaires et secondaires (hermaphrodite devenu mâle à la fin de sa vie ou suite à un stress environnemental) (Tatarenkov et al., 2009). Cette coexistence entre les 2 types d'individus est appelée androdioécie (Weeks, 2012) et la composition des populations se fait en fonction de l'âge des animaux (au bout de quelques années, jusqu'à 60% des hermaphrodites perdent leur tissu ovarien et se transforment en mâle secondaire)(Lee et al. 2008; Sakakura et al. 2006), des conditions du milieu (température et photopériode) (Harrington, 1975) et de leur localisation géographique (Lee et al., 2008).

Enfin, une troisième caractéristique faisant de *Kryptolebias marmoratus* (figure 1) un modèle unique dans le domaine de la biologie est son mode de reproduction par autofécondation qui en fait l'un des 2 seuls vertébrés connus (avec *Kryptolebias hermaphodicus*, aussi un rivulus, espèce sœur récemment séparée en une autre espèce) à la pratique (Harrington, 1961; Tatarenkov et al., 2009).

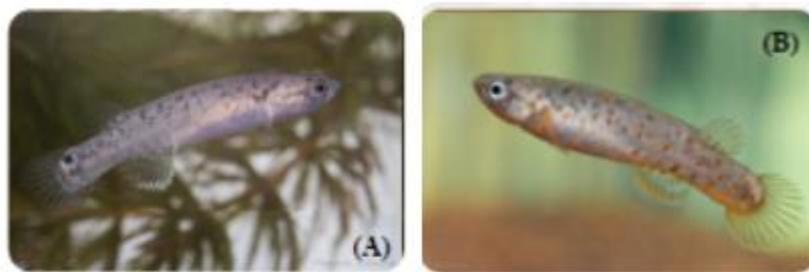


Figure 1 : Photos de *Kryptolebias marmoratus* (par Frédéric Silvestre). (A) Individu hermaphrodite, de couleur marron avec un point noir au niveau de la nageoire caudale appelé ocellus. (B) Individu mâle, de couleur orange-rose sur la partie postérieure du corps (Lee et al. 2008). Leur taille moyenne est de 60 mm (Taylor, 2000) mais peut atteindre 75mm en laboratoire (Lee et al., 2008). La taille finale est atteinte au bout de 2 à 3 ans (Lee et al., 2008).

Les lignées issues de ces reproductions sont dans certains cas hautement homozygotes et isogéniques (pas de variations génétiques au sein de la population) (Tatarenkov et al. 2012) comme c'est le cas des lignées utilisées au laboratoire (DC4, DC11 et .DC22). Cette caractéristique en fait un excellent modèle afin d'étudier les effets de l'environnement en éliminant la variabilité génétique. Ceci permet d'obtenir des normes de réaction « véritables »

et d'étudier le rôle de l'environnement dans la plasticité phénotypique et les capacités d'adaptation de cette espèce.

Le développement embryonnaire se fait en 32 stades (Mourabit et al. 2011): les premiers correspondent à la division cellulaire, puis il a la mise en place des stades blastula et gastrula. Ensuite, viennent les stades de la morphogénèse avec successivement la formation de la tête et des yeux (st17-19), au stade 20 le cœur bat mais la circulation n'est pas encore installée, au stade 21-22 les mouvements se mettent en place. S'en suit la formation des otolithes (st 23-24) et la formation de la nageoire pectorale (St25), la formation du foie (st26), l'augmentation de la pigmentation (st 27), le développement de la nageoire caudale (st 28), la mise en place de la vessie natatoire (st29), de la mâchoire (st30), le développement de la nageoire pectorale (st31) et pour finir le stade 32 auquel intervient l'éclosion.(10 jours environ) (figure 2). La larve naît autonome de son sac vitellin et est capable de se nourrir de petites proies.

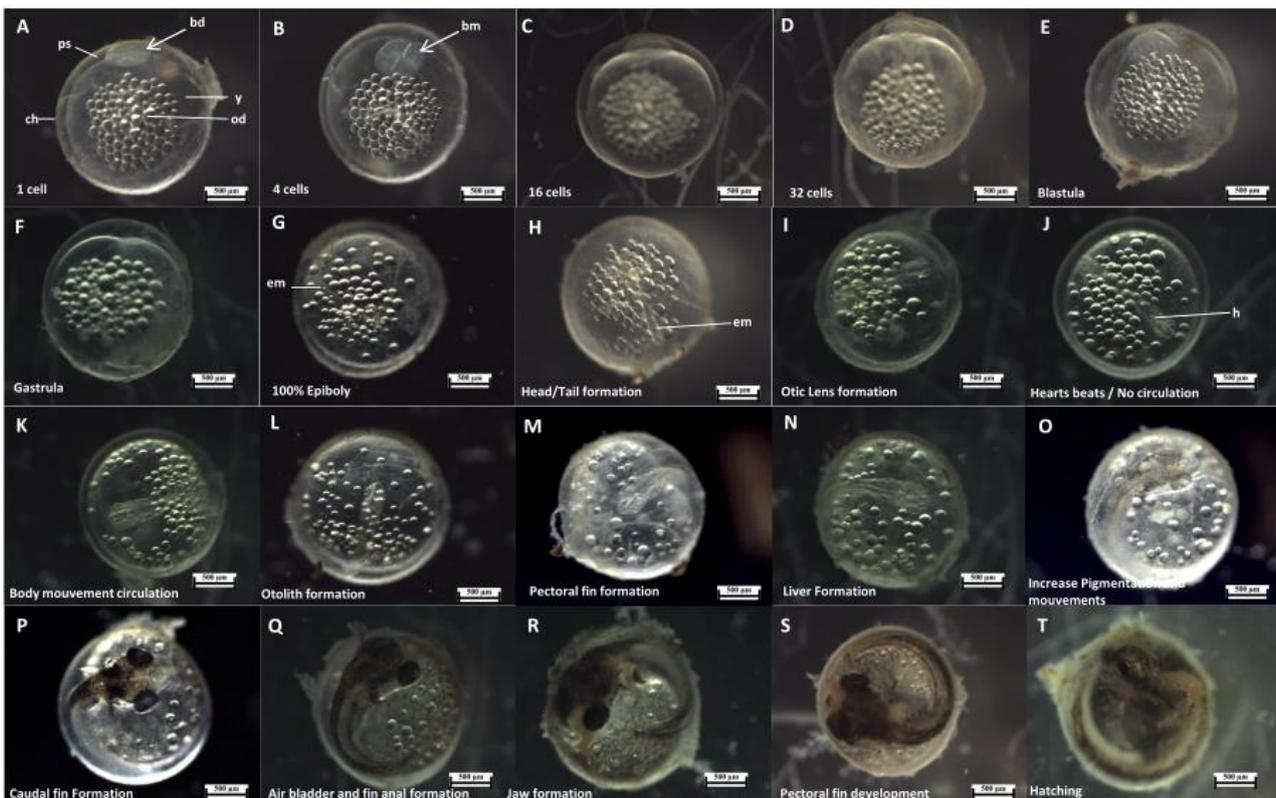


Figure 2 : Cycle de développement de *K.marmoratus* (source : Fellous et al. 2016)

Cependant, étant encore une potentielle espèce modèle, les connaissances sur l'espèce, et particulièrement, les mécanismes moléculaires à la base de la régulation de sa physiologie sont encore peu connus. Une piste envisagée pour expliquer comment, en l'absence de diversité génétique dans certaines populations, l'espèce survie et s'adapte à son environnement, pourrait passer par les mécanismes épigénétiques.

L'épigénétique concerne l'étude des mécanismes, pouvant être héréditaires, modulant l'expression des gènes sans modification de la séquence de l'ADN (Reviewed in Angers et al. 2010; Head 2014; Vandegheuchte & Janssen 2011).

Cette régulation se fait par le biais de modifications post-traductionnelles que sont les modifications des extrémités N-terminales des histones (méthylation, acétylation, ubiquitination, phosphorylation), les ARN non-codants et la méthylation de l'ADN, cette dernière étant abordée lors de ce stage (Angers et al. 2010; Bouwmeester et al. 2016;

Vandeghechuchte & Janssen 2011). Ce sont des mécanismes réversibles. L'ensemble de ces marques forment le code épigénétique ou épigénome (Goldberg, Allis, et Bernstein 2007)

La méthylation de l'ADN est présente dans l'ensemble du monde vivant (procaryotes et eucaryotes) (Angers et al. 2010) et semble en partie conservée au cours de l'évolution. Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) à la place d'un atome d'hydrogène au niveau d'un carbone ou d'un azote (Figure 3). Cependant, selon l'ordre auquel appartiennent les organismes, la position de ces groupes méthyls et les taux de méthylation varient. Ainsi chez les procaryotes, la méthylation se fait préférentiellement au niveau du 6^{ème} azote de l'adénine (Arand et al. 2012; Ziller et al. 2011) alors que chez les eucaryotes, elle se fait, principalement, en 5' des guanines (dinucléotides CpG) sur le 5^{ème} carbone de la cytosine pour former des 5-méthylcytosines (5-mC) (Angers et al., 2010; Gruenbaum et al., 1981). Chez les eucaryotes, une grande proportion des séquences méthylées se situe au niveau des rétro-transposons, des séquences répétées ou des régions inter géniques et, dans une moindre mesure, au niveau des gènes à copie unique ou soumis à empreinte parentale. Enfin, généralement, de petites séquences à fortes densités en CpG (îlots CpG) non méthylés sont observées au niveau des gènes ayant une expression constante et des promoteurs (Angers et al. 2010; Bird 1986; Takai et Jones 2002). Ces méthylations sont également variables en fonction des tissus et des stades (Martin et al. 1999)

La méthylation de l'ADN est un phénomène réversible et dynamique catalysée par l'action d'une famille d'enzymes : les ADN méthyltransférases (DNMTs). Les ADN méthyltransférases utilisent le cofacteur S-Adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur de méthyl, (Annexe 1) (Angers et al. 2010; Vandeghechuchte et Janssen 2011) (Campos et al. 2013).

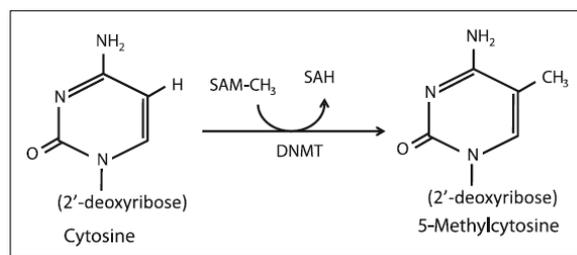


Figure 3 : Schéma de la structure chimique de la cytosine lors de la méthylation de l'ADN (Vandeghechuchte et al. 2011-modifié)

Elles sont divisées en trois familles (DNMT1, DNMT2, DNMT3) conservées au cours de l'évolution.

Les DNMT1 sont impliquées dans la maintenance des marques méthyles sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé lors des processus de réplication (Annexe 1) (Bird 2002).

La DNMT 2, bien qu'ayant une faible activité au niveau de la méthylation de l'ADN, serait le facteur principal de la méthylation des ARNt (Jeltsch, Nellen, et Lyko 2006).

Les DNMT3a et DNMT3b quant à elles ont pour rôle la méthylation *de novo* lors du développement embryonnaire (Annexe 1) (Angers et al. 2010; Vandeghechuchte et Janssen 2011). Elles sont induites en général par des signaux intrinsèques, mais pourraient également être mises en place sous l'action de signaux environnementaux (Angers et al. 2010; Jaenisch et Bird 2003).

La méthylation de l'ADN est un facteur majeur dans le développement de nombreux organismes. En effet, chez les invertébrés comme l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, le profil de la méthylation de l'ADN évolue au cours du développement et conditionne, au moins, une partie de l'expression des gènes du développement (Riviere et al. 2013).

Chez les poissons, comme le poisson zèbre, *Danio rerio*, une déméthylation globale est observée avant une augmentation rapide en stade blastula pour atteindre les niveaux observés chez l'adulte en stade gastrula (Rai et al. 2008). Cette reméthylation permet la mise en place des nouvelles méthylation : l'ensemble du processus correspond au reprogramming. Cependant, ce pattern n'est pas une règle générale. En effet, une absence de déméthylation/reméthylation est pour l'instant connue lors du développement embryonnaire du medaka (*Oryza latipes*), alors que chez notre modèle, le rivulus des mangroves, il a été démontré une phase de reméthylation qui ne s'achève que tardivement (Fellous et al. 2016). Cette phase transitoire représente la fenêtre critique du développement. C'est lors de cette dernière que l'impact de perturbateurs a le plus d'effets (mortalités importantes) (Martin et al. 1999)

Enfin, il a été observé que les mécanismes épigénétiques pouvaient contribuer à l'adaptation rapide de certaines espèces (*Fallopia japonica*, *Chrosomus eosneogaeus*), l'épigénome évoluant plus vite que le « génome » (Liu et al. 2015; Massicotte et Angers 2012). Pour finir, l'intérêt de l'étude de l'épigénétique en écologie, permet de comprendre les mécanismes adaptatifs des organismes confrontés à des changements plus ou moins rapides de leur environnement.

Ainsi, malgré l'intérêt du modèle poisson dans les questions de biologie, les mécanismes épigénétiques restent relativement peu décrit et se limite principalement aux poissons zèbres (Bouwmeester et al. 2016; Martin et al. 1999). Chez le rivulus, seul deux études décrivent l'implication des mécanismes épigénétiques chez l'espèce. Ainsi, un lien entre méthylation de l'ADN et déterminisme du sexe a été mis en évidence (Ellison et al, 2015) et une description des niveaux de méthylation avec un nouveau profil de reprogramming chez les vertébrés a été démontré par le laboratoire (Fellous et al. 2016)

Par conséquent, ce stage se place dans la continuité des travaux menés au laboratoire afin de déterminer la présence potentielle d'ADN méthyltransférases (DNMTs) et leurs rôles biologiques putatifs au cours du cycle de vie du rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus* ?

Afin de répondre à ces objectifs, des analyses *in-silico* des séquences et des techniques de PCR ont permis de mettre en évidence des DNMTs chez cette espèce. Par la suite, des études phylogénétiques et d'expressions par RT-qPCR ont aidé à déterminer leurs rôles biologiques putatifs au cours du cycle de vie du rivulus. Enfin, la relation entre méthylation de l'ADN et environnement a été appréhendée par des études exploratoires au cours du développement embryonnaire.

Matériel et méthodes

1. Elevage de *Kryptolebias marmoratus*

Les lignées de *K.marmoratus* présentes au laboratoire sont issues de poissons de génération F2 provenant du laboratoire du Pr.Ryan Earley (Université d'Alabama, USA).

Les lignées parentes F0 ont été échantillonnées dans les mangroves de Floride au sein de 3 populations distinctes. Au laboratoire, 3 lignées sont présentes : DC4, DC 11 et DC 22. Les poissons sont gardés individuellement dans des récipients d'une capacité de 1L, dans lesquels nous n'effectuons aucun renouvellement d'eau. Les conditions d'élevage sont les suivantes : salinité à 25 ppt, photopériode de 12 :12, et température maintenue à 25°C. Les poissons sont nourris avec des artémias vivants prélevés chaque jour et suspendus de nouveau dans de l'eau à 25 ppt. Le volume d'artémias donné à chaque poisson dépend de son âge et de son utilisation pour la reproduction.

C'est à partir de ce stock parental que les œufs nécessaires aux expériences et expositions ont été récoltés. Le prélèvement s'effectuait manuellement, boîte par boîte, 3 fois par semaine. Une fois prélevés, les œufs étaient triés par stade de développement et congelés à l'azote liquide en vue des extractions d'ARN. Les stades gastrula et St 17-19 étaient utilisés pour les expositions.

2. Caractérisation moléculaire des DNMTs chez *K.marmoratus*

2.1. Design des amorces

Le design des amorces a été réalisé via le site « Primers 3 » accessible par internet avec les paramètres suivant : un taux en bases « GC » compris entre 40 et 60%, une taille souhaitée pour les amorces de 18 à 22 nt, ainsi qu'une température d'hybridation (Tm) d'environ 60°C et la taille que nous attendions de l'amplicon.

2.2. PCR haute fidélité

Le principe de cette méthode est d'amplifier grâce à la présence d'amorces, des séquences partielles ou complètes de gènes afin de les détecter et de les quantifier avec pas ou très peu d'erreurs grâce à la Taq polymérase haute-fidélité.

Pour cela 3étapes sont nécessaires :

- 1- La dénaturation (faite à environ 95°C) qui permet d'obtenir des ADN simples brins sur lesquels les amorces vont pouvoir s'hybrider.
- 2- L'hybridation (la température d'hybridation dépend des amorces) qui correspond à la seconde étape de la PCR.
- 3- L'élongation (qui se fait à 72°C) ; qui correspond à la polymérisation du brin complémentaire grâce à l'action d'une enzyme polymérase (figure 4).

Ces 3 étapes sont généralement répétées 25 à 45 fois en fonction des gènes et des organismes.

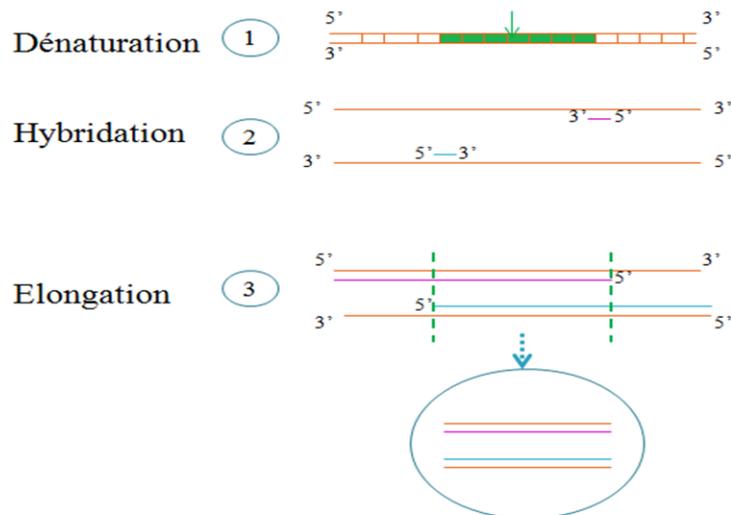


Figure 4 : Schéma simplifié de la réaction de PCR. La portion verte correspond au gène d'intérêt théorique à amplifier. La dernière partie du schéma correspond au gène d'intérêt amplifié obtenu au bout de 3 cycles et à partir duquel les autres amplifications vont avoir lieu. (Illustration personnelle).

Les amorces pour les PCR haute-fidélité, ont été réalisées également sur primer 3 avec les paramètres énumérés précédemment à partir d'analyses *in-silico* des séquences dans les bases de données disponibles sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Afin de maximiser l'hybridation de celles-ci, leur taille est d'environ 30 nucléotides selon les couples choisis.

Des ADN complémentaire (ADNc) provenant de différents stades de développement (gastrula, 100% époboly, St 17-19) et de cerveaux adultes ont été utilisés. Le mix nécessaire (20µL) à cette amplification est le suivant : 180ng d'ADNc, 10µL de 5x Buffer GC (New England, Biolabs), 1µL MgCl₂ (Promega), 2,5 µL de chaque amorce (IDT) à 1mM, 1µL de dNTP (10 mM) (Promega), 1,5 µL de DMSO (New England, Biolabs) et 0,5 µL Taq Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (M0530) (New England Biolabs) et de l'eau (dépendant de la quantité d'ADNc de base)

Le programme d'amplification au thermocycleur (T-Professional Family Thermocycleur, version 09/07, Biometra) était 30 minutes à 98°C, suivies de 35 cycles avec 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 72°C, et 1minute/kb à 72°C, suivies de 10 minutes à 72°C.

La révélation a été effectuée sur gel d'agarose à 1% avec une migration à 70V pendant 45 min. Les produits PCRs ont par la suite été séquencés chez Coulter Genomics après purification sur colonne (kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel).

2.3. Phylogénie

Des analyses *in-silico* à partir des séquences des gènes codant pour les différentes DNMTs ont été réalisées par criblage des bases de données sur le site du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) avec un test blastX permettant de retrouver une séquence protéique à partir de séquences nucléiques. Au total 47 séquences identifiées pour les DNMTs sont récupérées sur un total de 17 espèces (principaux modèles de recherche) (Annexe2). Seules les séquences formellement identifiées et complètes ont été sélectionnées. L'ensemble alignement, tri des séquences et tests phylogénétiques ont été réalisés sur le logiciel MEGA6. Les séquences ont été alignées par un test dit MUSCLE suivi par une suppression complète des régions non-alignées (Gap). Par la suite, trois tests phylogénétiques ont été appliqués, basés sur la méthode des bootstraps (500) avec suppression complète des

GAP, afin d'être le plus robuste possible dans notre analyse. Ces trois tests sont : le Maximum Likelihood (considéré comme le plus robuste avec un algorithme calculant les maximums de vraisemblances de l'évolution des séquences), le Neighbor-Joining et le Minimum Evolution Tree (ces deux tests ayant un algorithme basé sur les distances évolutives les plus faibles entre taxa, générant un arbre dont la longueur totale est la plus petite possible). Les arbres résultant de ces analyses furent complétés par une suppression des embranchements dont la valeur de bootstraps était inférieure à 50 (considéré comme non robuste).

3. Expression des ARNm des DNMTs

3.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN s'est faite à partir d'œufs congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C. Ces extractions ont été réalisées sur l'ensemble des stades du développement embryonnaire, et sur les œufs exposés à la température qui ont été prélevés à 6h, 24h ou 48h après le début de l'exposition.

Le principe est d'extraire les ARN totaux des œufs par l'action de différents réactifs.

Le premier est l'ExtractAll (1mL pour 80 mg de tissus). Il contient du Trizol ce qui va permettre, après le broyage manuel des œufs, de dissoudre les tissus, d'inhiber l'action des ARNase, et d'isoler les ARN.

En seconde étape, on rajoute du BromoChloroPropane (100 µL pour 1mL de ExtractAll) nécessaire pour la séparation des phases aqueuses et organiques. En complément, de ces premiers réactifs, il est indispensable de faire des centrifugations entre chaque étape afin de bien extraire les ARN des tissus et organites et d'en séparer correctement les phases.

A l'issue, seule la phase aqueuse sera récupérée puisque c'est elle qui contient les ARN.

En troisième étape, un réactif appelé RAI (3 volumes par volume de phase aqueuse, par exemple pour 100µL de phase aqueuse il a fallu 300µL de RAI) contenant le sel chaotropique, le thiocyanate de Guanidinium est rajouté, permettant l'augmentation des liaisons entre les ARN et la membrane de silice contenue dans les colonnes.

Ce réactif combiné à l'ajout d'éthanol (3 volumes par volume de phase aqueuse) permet d'éliminer au maximum les résidus d'ADN potentiellement encore présents.

Après ce traitement, le mélange surnageant et réactif est passé sur colonne où les ARN vont se fixer à la couche de silice. Le mélange est éliminé au fur et à mesure des centrifugations. Deux derniers lavages sont effectués par le réactifs RA3 (ajout de 600µL puis de 250µL) contenant notamment de l'alcool facilitant la destruction des sels, des métabolites et des derniers composants macromoléculaires.

En conclusion, les ARN totaux sont élués dans de l'eau ARNase free (DEPC) (élution dans 10 à 30 µL) chauffée à 50°C.

Les solutions d'ARN obtenues sont quantifiées au NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) en vue des RT-qPCR et sont préparées dans un volume de 9,15 µL à une concentration de 270ng/9,15µL.

3.2. Rétro-transcription

3.2.1. Traitement DNase

L'ARN dilué (9,15µL à 270 ng d'ARN) suite à l'extraction est traité avec 1,0µL de RQ1 DNase (Promega 1U/µL) et par 1,1 µL de tampon DNase 10X (Promega). L'utilisation du réactif RQ1 DNase permet la destruction des doubles brins et simples brins d'ADN encore potentiellement présents dans les éluions d'ARN. L'activation de cette digestion enzymatique

se fait par la chaleur avec une incubation au thermocycleur durant 30 minutes à 37°C. L'étape suivante a été stoppée par l'ajout d'une solution STOP puis activée en incubation pendant 10 minutes à 65°C.

1µL de ce mélange a été prélevé et dilué dans 20,6µL pour vérifier l'efficacité de ce traitement DNase par q-PCR.

3.2.2. Rétro transcription

Les ARN subissent une rétro-transcription permettant de les transformer en brins d'ADN complémentaires (ADNc). Pour permettre la copie des brins d'ARNm en brins d'ADNc, il est nécessaire d'ajouter à la réaction des amorces (0,2µL de Random Primers à 500µg/mL, Promega) qui vont reconnaître les brins d'ARNm et s'y hybrider.

Un mix réactionnel a été réalisé avec des dNTP (2,0µL de chaque amorce à 5mM) et du tampon avec des constituants (MgCl₂, Tris-HCl, KCl) permettant d'augmenter le potentiel d'hybridation des amorces et le potentiel de copie de l'enzyme polymérase (0,4 µL de tampon MMLVRT) (figure 5). Une incubation de 5 minutes à 65°C a été nécessaire pour engendrer l'hybridation des amorces au brin d'ARNm.

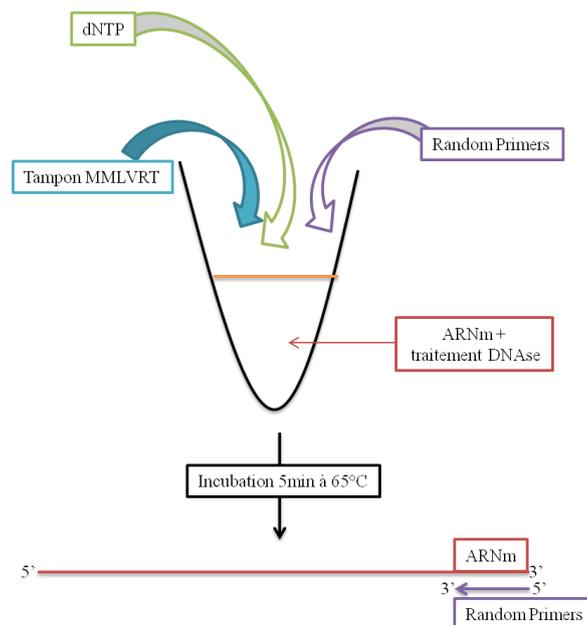


Figure 5 : Première étape de la réaction de rétro-transcription (Illustration personnelle)

Pour assurer la qualité des ARNs au cours du dernier traitement il a fallu ajouter une solution de RNAsin (40U/µL, Promega) diluée (0,3 µL de RNAsin dans 1,0 µL d'eau RNase yfree) afin d'éliminer certaines familles d'ARNases pouvant compromettre l'intégrité des ARNm (dégradation). Ensuite, 1µL d'enzyme MMLVRT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase-Promega 200U/µL) a été ajouté. Celle-ci est une enzyme ADN polymérase – ARN dépendante : cela signifie qu'elle va se fixer à l'extrémité 3' des amorces Random, et synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARNm (figure 6). Pour catalyser cette réaction, une incubation d'1h30 à 37°C, puis de 5 minutes à 70°C est nécessaire.

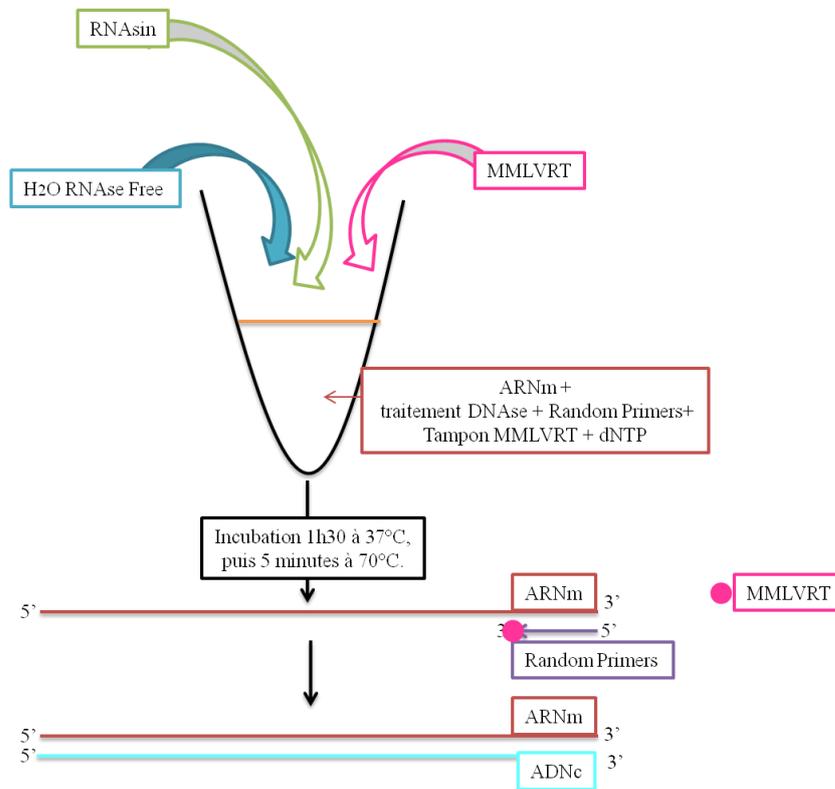


Figure 6 : Etape de polymérisation de l'ARNm en ADNc (Illustration personnelle)

3.3. PCR Quantitative

La PCR quantitative permet de quantifier l'expression des ARN messager pour un gène donné. Les qPCR ont été effectuées sur tous les stades de développement de *K.marmoratus* et sur des tissus d'individus adultes ainsi que sur les œufs exposés aux conditions de température).

3.3.1. Les amorces

Les amorces de q-PCR ont été réalisées sur le logiciel en ligne PRIMER 3 avec pour caractéristiques un contenu en « GC » de 50 à 60%, un T_m supérieur à 50°C et une taille d'amplicon comprise entre 75 et 150 pb (paire de base). Les gènes de références qui ont été choisis sont la Beta-actin et Ribosomal Protein car ils ont une expression stable. Ils ont servi à calculer l'expression des gènes d'intérêts.

3.3.2. Test de l'efficacité des amorces

Tester l'efficacité des amorces est primordiale afin d'évaluer de la manière la plus robuste possible l'expression des ARNm d'intérêts. Cette dernière doit être comprise entre 90% et 110% d'efficacité. Une gamme de dilutions successives de facteurs 10 (à partir de 29ng/μL) a été utilisée en triplicat pour chaque point et chaque amorce à partir d'un mix des ADNc. L'analyse des points doit suivre une courbe de régression linéaire descendante, dont le coefficient de régression doit être compris entre 90% et 110%. A partir de cette analyse un couple d'amorces par gènes ciblés a été sélectionné (un pour chaque gène de ménages Beta-actin et Ribosomal Protein, un pour le gène DNMT3A-var1 et un pour DNMT3B-var3).

3.3.3. Protocole de la PCR quantitative

Le mix nécessaire par puits (plaque 96 puits) est le suivant :

5µL d'ADNc à 1ng/µL, 1,9 µL d'eau RNase Free, 0,6 µL du mix d'amorces correspondantes à 10mM, 0,15 µL de CXR (fluorochrome pour améliorer l'intensité des signaux- Promega) et pour finir 7,5 µL de Syber Green.

Le programme d'amplification utilisé sur le thermocycleur StepOne Plus (Real-time PCR System-Applied Biosystems) commence par 1min30 à 95°C, puis deux alternances de 15 sec à 95°C et 1min à 58°C (40 cycles), et finit par une augmentation de 0,5°C en 0,5°C jusqu'à 95°C (15sec).

3.3.4. Analyses des données

L'analyse des résultats s'est effectuée à partir des résultats bruts sortis par le système. Plusieurs éléments doivent être vérifiés avant toute analyse :

- Les courbes d'amplification (figure 7) doivent sortir avant 35 Ct (Cycle Threshold : point de première amplification du gène d'intérêt).
- Les courbes de fusion doivent se superposer, cela correspondant à une amplification spécifique du gène d'intérêt (figure 8).

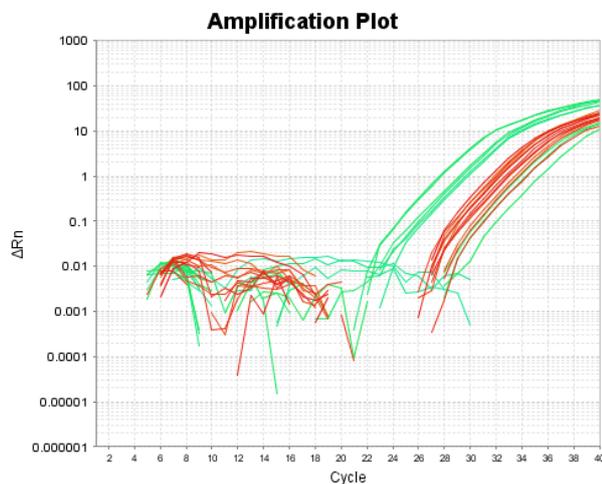


Figure 7 : Exemple de diagramme d'amplification (Données personnelles)

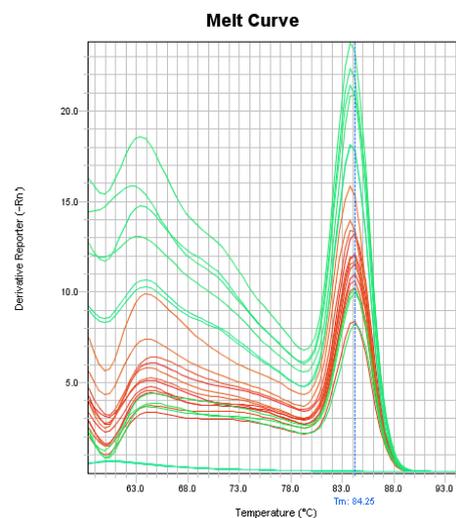


Figure 8 : Exemple de courbes de fusion (Données personnelles)

Une fois ces conditions vérifiées, un calcul d'expression relative des gènes, le 2 delta delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) a été effectué.

Cette méthode de calcul se décompose comme suit :

- $\Delta CT1$: moyenne des CTs pour le gène cible – moyenne des CTs pour le gène de référence
- $\Delta\Delta CT$: $\Delta CT1 - \Delta CT_{référence}$ (dans le cadre de cette étude, c'était soit le stade ovocyte pour l'étude au cours du développement, soit la condition contrôle pour les expositions)
- Calcul de l'expression (fold change) : $Fold = 2^{-\Delta\Delta CT}$

4. Rôle biologique de la méthylation de l'ADN au cours du développement

4.1. Expositions à la 5-Azacytidine : un inhibiteur de la méthylation

Pour ces expositions deux stades de développement ont été choisis :

- Le stade gastrula étant l'un des stades ayant le taux de méthylation le plus bas lors de la phase de reprogramming (fenêtre critique),

- Le stade St17-19 (formation de la tête et des yeux), stade en pleine transition au niveau des méthylations (mise en place des méthylations *de novo*).

Différents essais d'expositions ont été effectués :

- **Expositions à la 5-Azacytidine (A2385 Sigma suspendu à nouveau dans du DMSO) (sans pronase)** → Deux concentrations testées 100 μ M et 1000 μ M dans un volume d'eau de 10 mL (récipient en verre). Ces expositions avaient pour but de vérifier l'efficacité et les effets de ce produit chimique, sans étape préalable de déchorionisation. Des observations et des prélèvements ont été effectués à 6h, 24h et 48h d'intervalles après le début des expositions avec un renouvellement des milieux d'expositions toutes les 24h (figure9). 60 œufs ont été exposés de cette manière (soit une dizaine par condition : contrôle eau et DMSO, 100 μ M, et 1000 μ M et par stade)

- **Expositions à la pronase** → Elles ont été effectuées comme présentées sur le schéma expérimental suivant (figure 9). Ces traitements avaient pour but de vérifier la toxicité potentielle de ce constituant sur les œufs. Les mêmes time-point d'observations que précédemment ont été utilisés. 48 œufs ont été exposés (21 œufs en gastrula et 27 St 17-19)

- **Expositions à la 5-Azacytidine (avec pronase)** → Une soixantaine d'œufs a été exposée suivant le protocole ci-dessous (figure 9). La concentration 100 μ M a été retenue pour les expositions couplées 5-Aza/pronase.

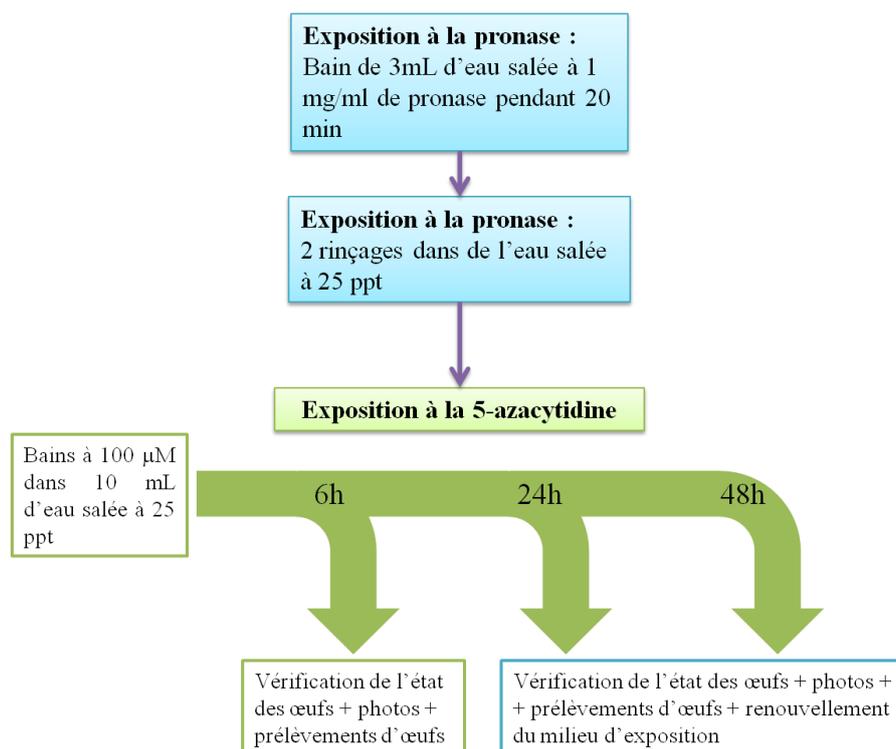


Figure 9 : Design expérimental des expositions à la 5-Azacytidine et à la pronase. Les photographies des œufs ont été réalisées par une caméra Nikon Digital Camera USB3 1/2.5 15 IM/SEC montée sur une loupe binoculaire Nikon SMZ1270 (analysées sur le logiciel Nis-Elements D4.40.00)

4.2. Expositions aux températures

Le but de ces expositions à la température était de voir l'influence de ce facteur sur le développement embryonnaire et in-fine sur les méthylations de l'ADN.

Stades exposés : Gastrula et St17-19

Nombre d'œufs exposés : 499 au total (soit environ 80 œufs par stade et par condition)

Températures d'exposition : une température basse (16°C), une température contrôle (25°C) et une température haute (34°C).

Paramètres observés : modifications morphologiques et épigénétiques, survie, ainsi que le développement.

Le protocole mis en place est le suivant (figure 10) :

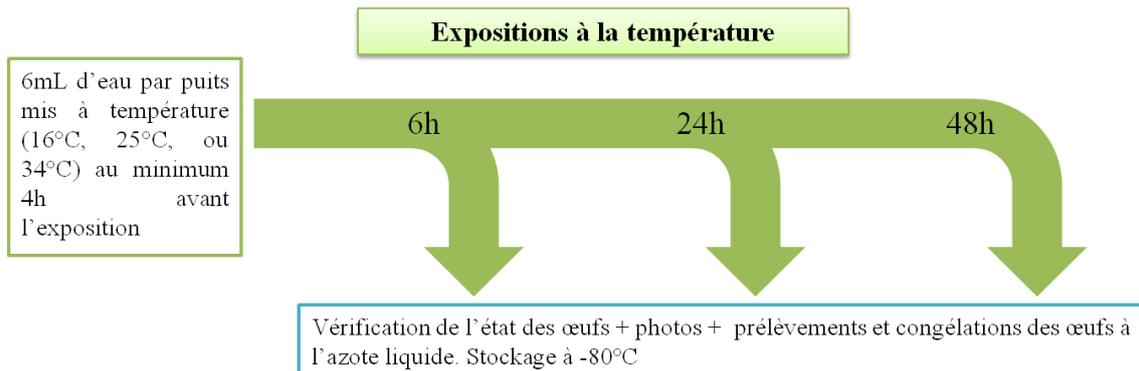


Figure 10 : Design expérimental des expositions à la température.

5. Analyses statistiques

Les analyses sont de deux types :

- la proportion d'œufs morts par stade en fonction des températures et la durée d'exposition
- la proportion d'œufs par stade ayant un développement normal par rapport à la condition contrôle en fonction des températures et des durées d'expositions (appelées pour l'analyse time-point d'observation). L'ensemble des tests statistiques a été effectué avec le logiciel GraphPad Prism version 7.01.

Avant toute analyse les résidus des échantillons ont été testés avec le test de normalité d'Agostino & Pearson afin de s'assurer qu'ils suivaient bien une distribution gaussienne. Ce dernier a été choisi en raison de la présence de valeurs identiques dans les données.

Pour les valeurs dont les résidus ne suivaient pas une distribution gaussienne, une transformation $\text{Arcsin}\sqrt{p}$ a été effectuée (le choix de cette transformation vient du fait que les données sont des proportions ayant des valeurs égales à 0). Cette transformation avait pour but de rapprocher au maximum les valeurs d'une distribution gaussienne.

- Pour les proportions de mortalités des œufs au stade gastrula et les proportions d'œufs au stade 17-19 avec un développement normal : Les valeurs des résidus avaient une distribution gaussienne avec transformation par la fonction $\text{Arcsin}\sqrt{p}$. La variance a été testée par une analyse de variance à deux facteurs (two-way ANOVA).

Un test paramétrique de comparaisons multiples a été possible pour chacun de ces jeux de données. Son but a été d'utiliser une comparaison multiple afin d'analyser l'impact combiné de la température et de la durée d'exposition. Le groupe contrôle (exposition des œufs à 25°C)

servant de référence pour l'analyse des deux autres groupes, l'utilisation du test de Dunnett a été possible. Le seuil de risque α choisi était 5%.

Selon le résultat un test paramétrique de comparaisons multiples a été réalisé (test de Dunnett) (précédé d'une two-way ANOVA) afin de voir les effets combinés de la température et du temps d'exposition, sinon un test non-paramétrique de Dunn a été effectué

-Pour les proportions de mortalités des œufs exposés au stade St17-19 et les proportions d'œufs au stade gastrula avec développement normal : Les valeurs des résidus n'avaient pas une distribution gaussienne même après la transformation par la fonction $\text{Arcsin}\sqrt{p}$, il n'a pas été possible d'utiliser le test paramétrique de comparaisons multiples de Dunnett.

Un test non-paramétrique permettant les comparaisons multiples paires à paires dans un même temps donné a été utilisé : le test de Dunn. Le seuil de risque qui a été choisi est de 5%.

-Statistiques sur les données qPCR d'expositions et l'expression des gènes au cours du développement : Au vue du manque de réplicats biologiques pour cette expérience, les résultats n'ont pas été analysés de manière statistique. Ils seront utilisés comme des résultats préliminaires pour les expositions futures.

1. Caractérisation moléculaire des DNMTs

La figure 11 ci-dessous montre l'amplification des différents gènes codant pour cette famille d'enzymes. Pour que l'amplification soit plus aisée, les séquences ont été coupées en plusieurs parties, et des couples d'amorces ont été créés spécifiquement pour chacune d'entre elles.

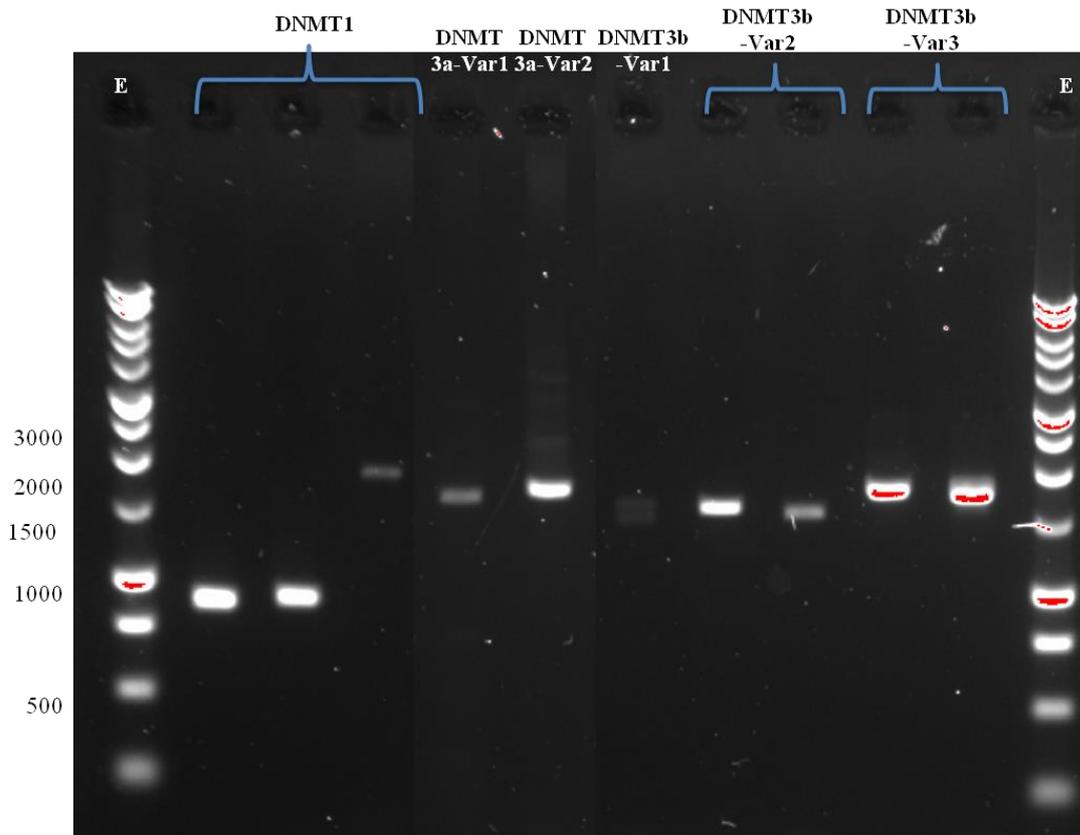


Figure 11 : Amplification des gènes codant pour les DNMTs. Les tailles totales attendues des séquences sont pour DNMT1 de 4527 pb, pour DNMT 3A-Var1 de 2532 pb, pour DNMT3A-Var2 de 2667 pb, pour DNMT3B-Var1 de 2412 pb, pour DNMT3B-Var2 de 4326 pb et pour DNMT3B-Var3 de 4380 pb.

Chaque gène attendu a été amplifié, et est caractérisé par la présence d'une bande. Un témoin de taille est présent de part et d'autre du gel. Dans le cas de la PCR les tailles des amplicons observés sont approximativement pour DNMT1 : 900/900/1900 pb, DNMT 3A-Var1 : 1700 pb, DNMT3A-Var2 : 1700 pb, DNMT3B-Var1 : 1500 pb, DNMT3B-Var2 : 1500/ 1500 pb, DNMT3B-Var3 : 1700/1700 pb.

Chacun des produits PCR a été envoyé, après purification, au séquençage afin de vérifier que ces amplicons correspondaient bien à des DNMTs. Une fois la qualité des séquences vérifiées, celles-ci ont été blastées sur le site de NCBI et les résultats ont montré que les séquences amplifiées correspondaient bien aux DNMTs présents chez *Kryptolebias marmoratus*.

2. Caractérisation phylogénétique des DNMTs

D'après les analyses *in-silico*, il ressort que les séquences des DNMTs portent différents domaines conservés (figure 12). Il existe des similitudes entre les différents types de DNMTs mais également de nombreuses différences

En effet, les DNMT1, sont composées de 5 domaines : DMAP-Binding, DNMT1-RFD, BAH-Dnmt1. Le domaine Dcm est commun aux DNMT1 mais aussi à DNMT3A-var1,var 2 et DNMT3B-var1.

Plusieurs variantes de DNMT3 (DNMT3A-var1, var 2 et DNMT3B-var1) possèdent des domaines en commun comme Dcm et Dnmt3b_related. Toutefois, les séquences des DNMT3A portent un domaine différent de celui de DNMT3B-var1 : le domaine ADDZ-Dnmt3a. Alors que DNMT3A-var1 porte le domaine PHD SF Superfamily. Ce dernier est commun à l'ensemble des DNMT3B. Par contre les DNMT3Bvar 2 et var 3 portent respectivement les domaines AdoMet_MTases superfamily (commun aux deux), PWWP Superfamily, Dnmt3b_related et CH Superfamily.

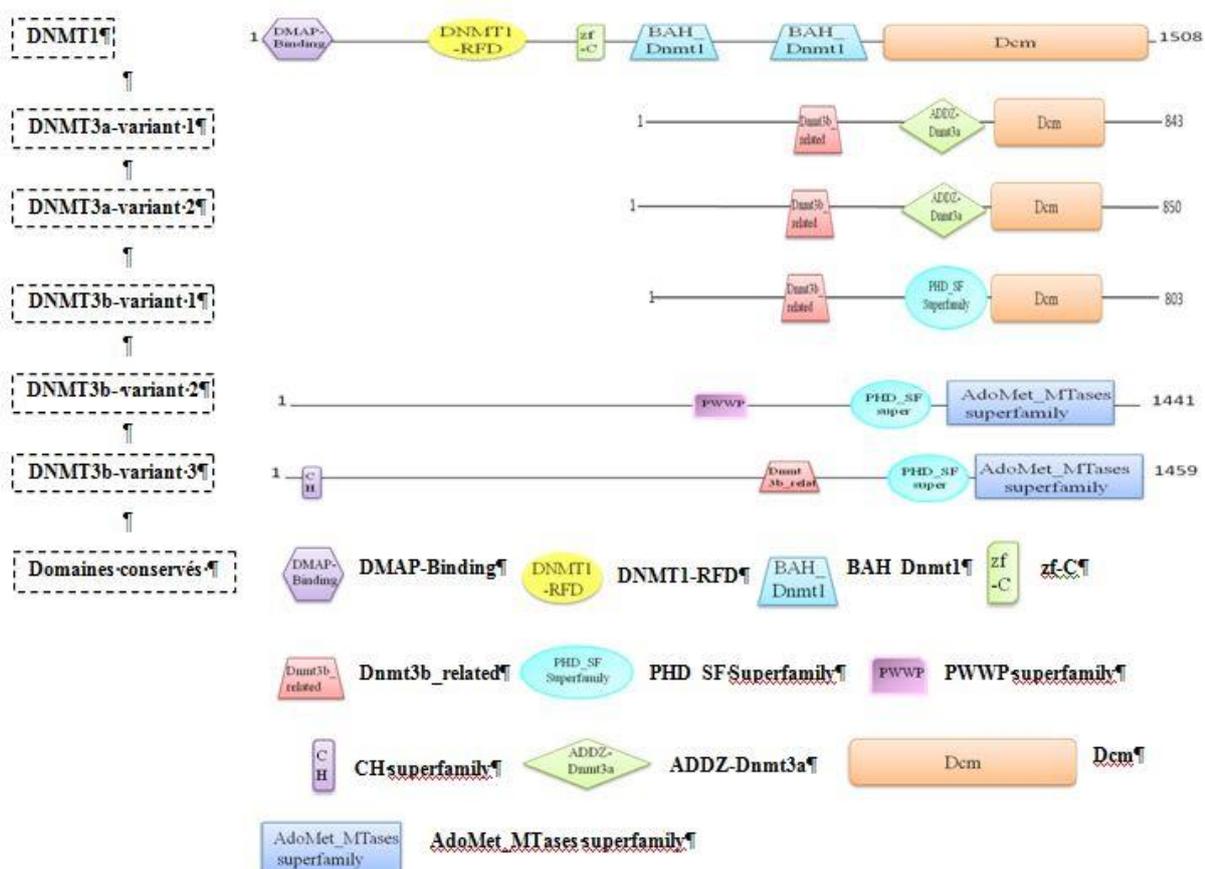


Figure 12 : Représentation des domaines conservés pour les séquences de DNMTs. La taille des séquences se situent en extrémité 3' (Illustration personnelle, d'après les informations obtenues sur ncbi)

Trois types d'arbres ont été générés lors de l'analyse phylogénétique des séquences :

- Le Maximum Likelihood Tree (figure 13) (modèle le plus robuste),
- Le Minimum Evolution Tree (Annexe 3).
- Le Neighbor-joining Tree (Annexe 3).

Ces derniers apportent les mêmes résultats : les DNMTs de *K.marmoratus* comparés à celles des autres espèces s'apparentent par type et isoformes (DNMT1, 3A, 3B var1, 3B var2 et 3). DNMT1 chez *K.marmoratus* sont le plus proche de celle de *Xiphophorus maculatus* et *Xiphophorus helleri*, (le Platy) avec un nombre de bootstrap de 53% (correspondant au nombre de fois où la branche a été répétée dans l'analyse). Pour les DNMT3A-var1,

DNMT3B variants 1,2 et 3 sont très proches de *Larimichthys crocea* (Tambour à gros yeux) (valeurs de bootstrap de 99%, 81%, 100% et 99% respectivement). Seul DNMT3A-var 2 est proche de *Danio rerio* avec une valeur de bootstrap de 87%.

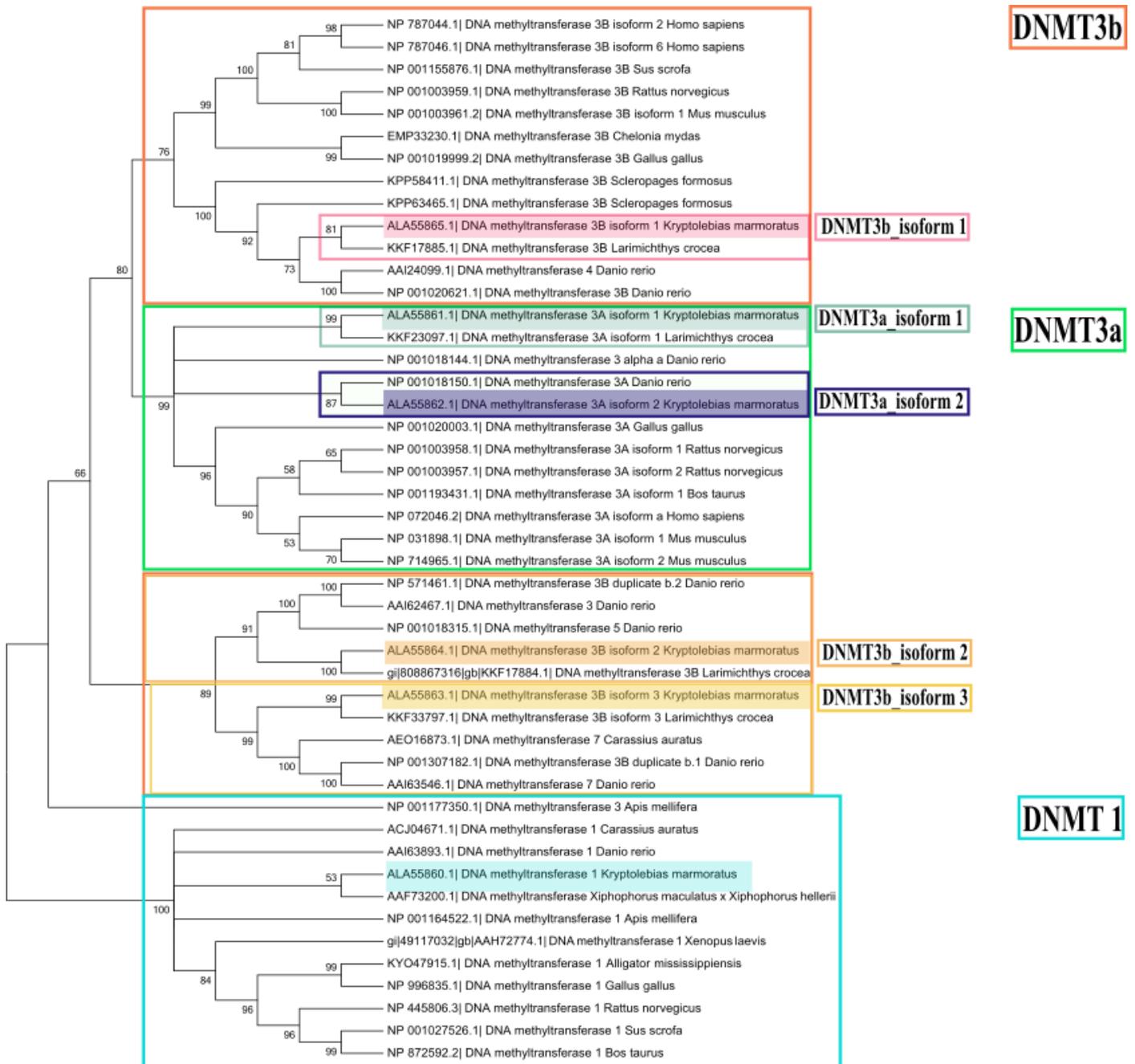


Figure 13 : Arbre phylogénétique des différentes DNMTs par le modèle Maximum Likelihood Tree (Illustration personnelle)

3. Conséquences des expositions sur la biologie de l'espèce

3.1. Expositions à la 5-azacytidine

Les œufs exposés à la 5-azacytidine avec ou sans traitement à la pronase ont un développement normal sans malformations au cours du développement. Chaque œuf se développe normalement entre les différents time-points d'observations : les gastrulas à 6h se

sont développés jusqu'au stade 100% Epiboly, puis à 24h au stade St 17-19 pour arriver au stade 25 au bout de 48h d'expositions.

Les œufs exposés au stade St17-19, sont passés du stade « body mouvement » à 6h, au stade 25 à 24h pour arriver au stade 27 au bout de 48h. L'ensemble des fonctions du développement comme les battements de cœur, la circulation, l'absorption du sac vitellin, la croissance de la nageoire et des tissus pectoraux, la coloration, la formation et le développement du cortex cérébral était normal.

3.2. Expositions à la température

3.2.1. Observations pour les œufs exposés au stade gastrula

Les œufs exposés au stade gastrula à 16°C après 6h d'exposition, ne se sont pas développés (figure 14-A), alors que les œufs de la condition contrôle (figure 15-B) et de la température haute (figure 14-C), ont atteint le stade 100% Epiboly. Statistiquement, seulement 11% des gastrulas ont atteint le stade 100% Epiboly au bout de 6h contre 73% pour les œufs de la condition contrôle et 70% pour les œufs exposés à 34°C (figure 15-A). La différence de développement est significative entre la condition 16°C et 25°C ($P\text{-value} = 0.0354 < 0.05$), par contre à ce time-point aucune différence significative n'existe entre la condition contrôle et la condition à 34°C ($P\text{-value} > 0.9999$). Au bout de 6h d'exposition, nous pouvons observer très peu de mortalité (0% à 16°C et 25°C et 2% à 34°C. Il n'y a pas de différences significatives des données à 16°C et 34°C par rapport au contrôle $P\text{-value} < 0.05$ dans les deux cas) (figure 15-D).

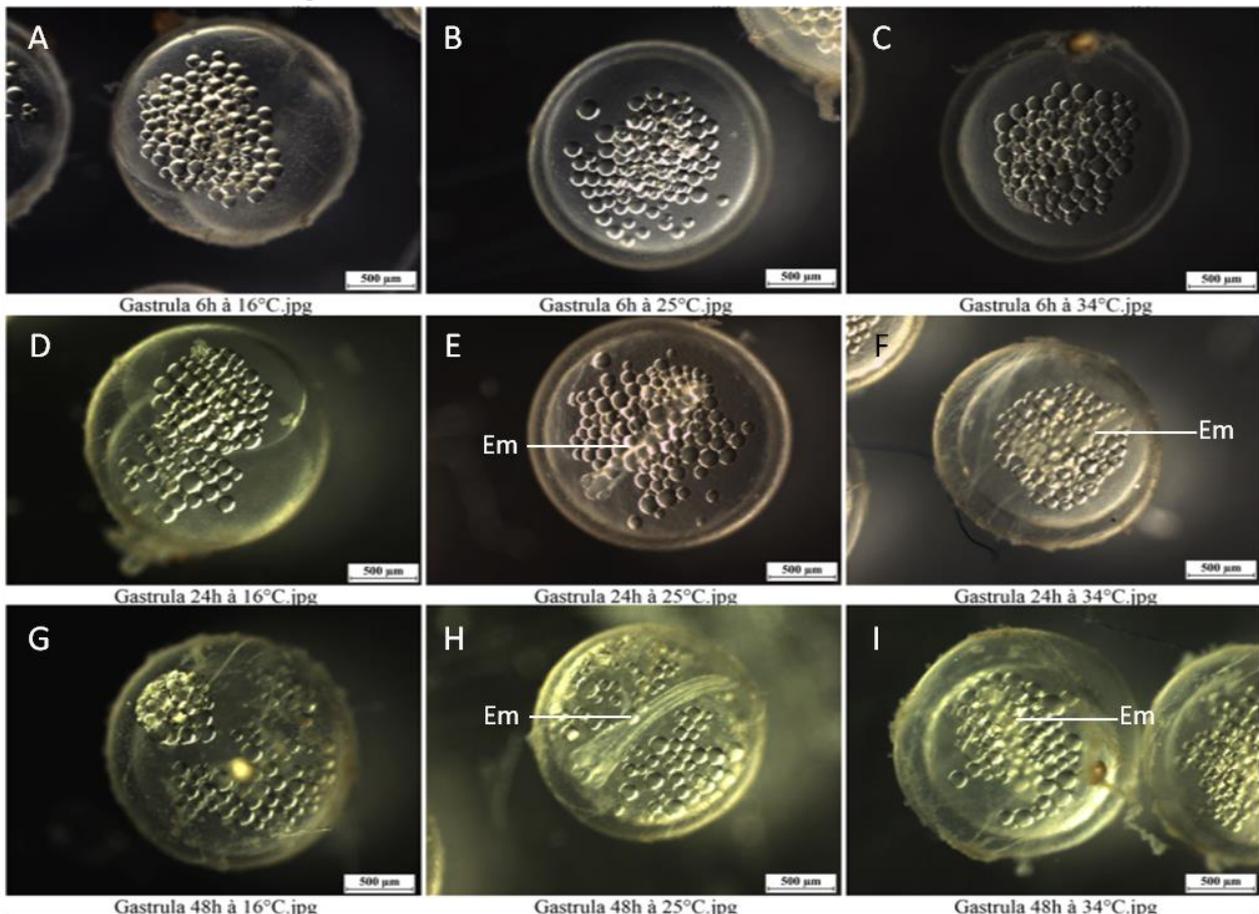


Figure 14 : Photos du développement des œufs exposés au stade gastrula en fonction des 3 températures et des différents time-points. Em =Embryon (Illustration personnelle)

A partir de 24h, nous avons pu constater des malformations notamment dans la condition 16°C (figure 14-D). Une sorte d'œdème est apparu déformant la forme normale des gastrulas. A cette température et à 24h, la mortalité augmente fortement (figure 15-D) (45,5%) alors que le pourcentage d'œuf se développant normalement atteint les 0% (figure 15-B). Ces évolutions sont significatives par rapport à la condition contrôle à 25°C (respectivement P-value = 0.0001<0.05 et P-value = 0.0001<0.05). A 48h, les mêmes observations sont faites au niveau de la mortalité (73% avec une P-value = 0.0001<0.05 par rapport au contrôle) (figure 15-D) et un taux de développement de 0% (P-value = 0.0001<0.05) (figure 15-C). L'œuf au bout de 48h a perdu les caractéristiques des gastrulas (œuf formant deux lobes avec une agrégation des réserves lipidiques), pour former un œuf avec des réserves lipidiques disparates et une dégénérescence d'un des lobes (figure 14-G)

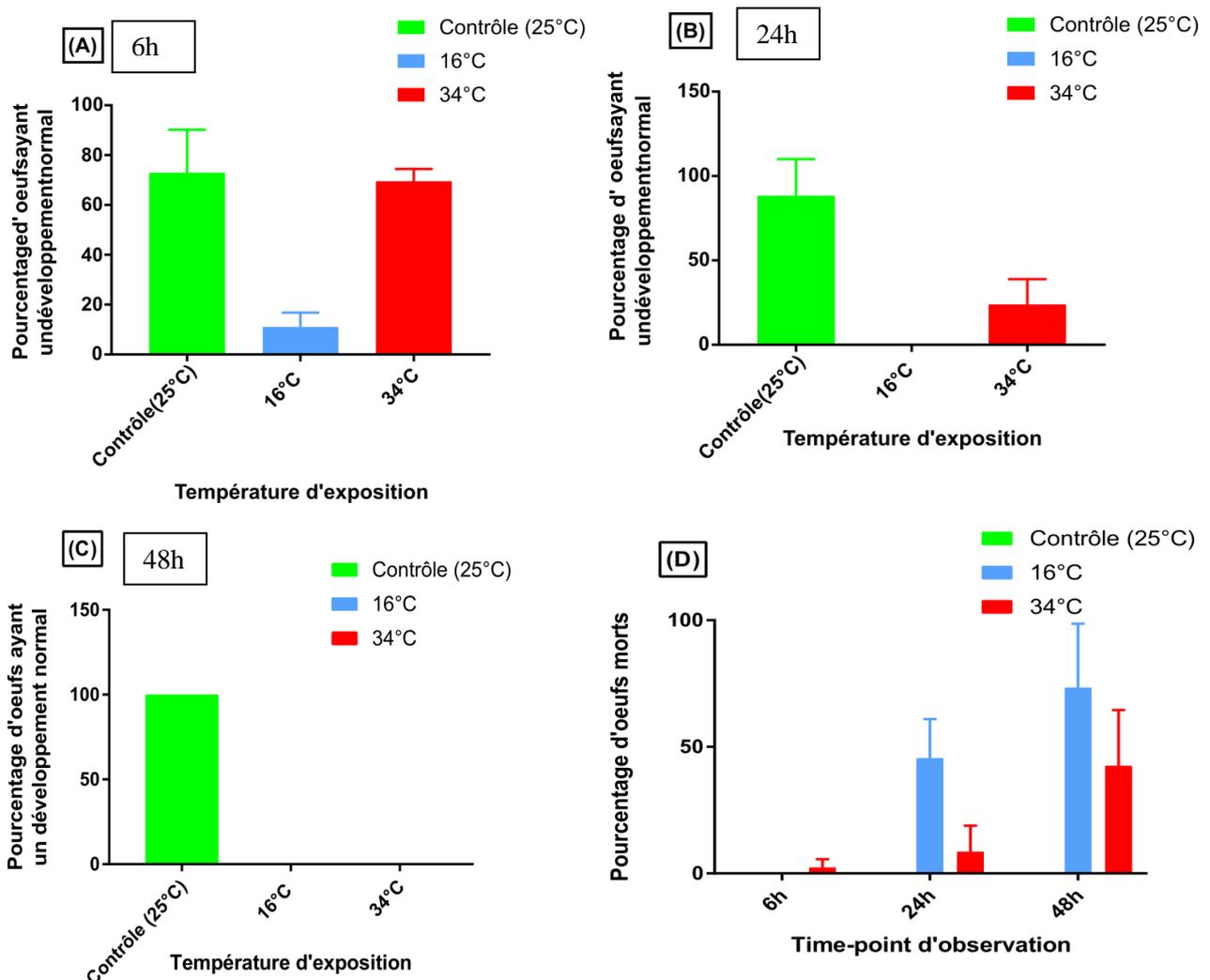


Figure 15 : Influence de la température sur le développement morphologique et la mortalité des œufs exposés au stade gastrula. (A) Pourcentage de développement au bout de 6h d'exposition. Différence significative pour 16°C (P-value<0.05), (B) Pourcentage de développement au bout de 24h d'exposition. Différences significatives pour 16°C et 34°C (P-value<0.05). (C) Pourcentage de développement au bout de 48h d'exposition. Différences significatives pour 16°C et 34°C (P-value<0.05) et (D) Pourcentage de mortalité en fonction de la température et la durée d'exposition. Différences significatives à 24h et 48h pour les œufs à 16°C et à 48h pour les œufs à 34°C (P-value<0.05). (Illustration personnelle)

Pour les œufs exposés à 25°C, le développement est normal avec la croissance jusqu'au stade 17-19 (figure 14-E) au bout de 24h (mise en place du système nerveux, apparition des

yeux et des lentilles). Le pourcentage de la mortalité pour cette condition est de 0% (figure 15-D) et celui du développement est de 88%. (Figure 14-B) Au bout de 48h, les œufs sont au stade 25 (début de pigmentation, formation du système nerveux achevée, début d'élargissement du tronc), le taux de la mortalité est le même que précédemment (figure 14-D) par contre le nombre d'œufs arrivés au stade 25 (figure 13-H) est de 100% (figure 15-C).

Pour les œufs exposés à 34°C, nous pouvons observer qu'une faible proportion d'œufs arrive au stade normal de développement au bout de 24h (24%) (Figure 15-B). Cette différence est significative par rapport au contrôle (P-value = 0.0021 <0.05). Dans le même temps, il y a eu une hausse de la mortalité passant de 0% à 6h à 9% à 24h ; cette différence au contrôle n'est pas significative (P-value >0.05). D'un point de vue morphologique, les différences avec la condition contrôle se font au niveau de la tête de l'embryon. Celle-ci, bien que discernable, pour les œufs exposés à 34°C, n'est pas formée correctement. Les yeux ne se sont pas développés totalement ainsi que le système cérébral (figure 14-F).

Au bout de 48h, la larve ressemble plus à un filament (figure 14- I) et la mortalité progresse jusqu'à 43% (différence significative par rapport au contrôle, P-value = 0.0001 <0.05) et aucun œuf n'a un stade normal de développement (différence significative avec P-value = 0.0001 <0.05)

Les tableaux de résultats des sorties GraphPad sont présents en annexe 4.

3.2.2. Observations pour les œufs exposés au stade St17-19

Les œufs exposés durant 6h à 16°C sont toujours au stade St17-19 pour une majorité (13%) (Figure 16-C), avec les particularités morphologiques propres à ce stade là (yeux développés, cortex cérébral) mais il n'y a pas de présence de battements de cœur ou de circulation montrant un développement vers le stade « Heart beats ». A cette température et time-point d'observation, aucune mortalité n'est présente. Cependant, la différence de développement entre les œufs exposés à 16°C et 25°C est significative (P-value = 0.0001 <0.05). Les œufs exposés à 25°C sont presque pour la moitié d'entre eux au stade « Heart Beats » (figure 17-C) et n'ont subi aucune mortalité. Les œufs exposés à 34°C ont exactement le même développement morphologique que ceux de la condition contrôle (66% d'entre eux ont atteints le stade « Heart Beats » mais la différence avec le contrôle n'est pas significative P-value >0.05). Sur la figure 17-C, nous pouvons observer la présence du cœur qui est la caractéristique principale de ce stade-ci.

Au bout de 24h, les œufs exposés à 16°C et 34°C montrent des signes d'anomalies morphologies (respectivement 0% et 13% d'œufs ayant un développement normal contre 98% pour la condition contrôle) (figure 16-D et figure 16-F). Les tissus/muscles au niveau du tronc ne se développent pas et semblent « lâches », peu ou pas de mouvements sont visibles. Aucune pigmentation n'apparaît pour les œufs à la température de 16°C. Chez ceux exposés à 34°C, une pigmentation du sac vitellin est visible avec pour certains, un cœur qui n'est pas formé ou ne bat pas et un cortex cérébral déformé. Ces anomalies sont significatives pour ces deux températures (P-value = 0.0001 <0.05 pour chacune) (figure 17-C). La mortalité pour les œufs exposés à 16°C est alors de 23% (différence significative P-value = 0,0228 <0.05) et de 2% pour les œufs à 34°C (différence non significative P-value >0.05) (figure 16-A).

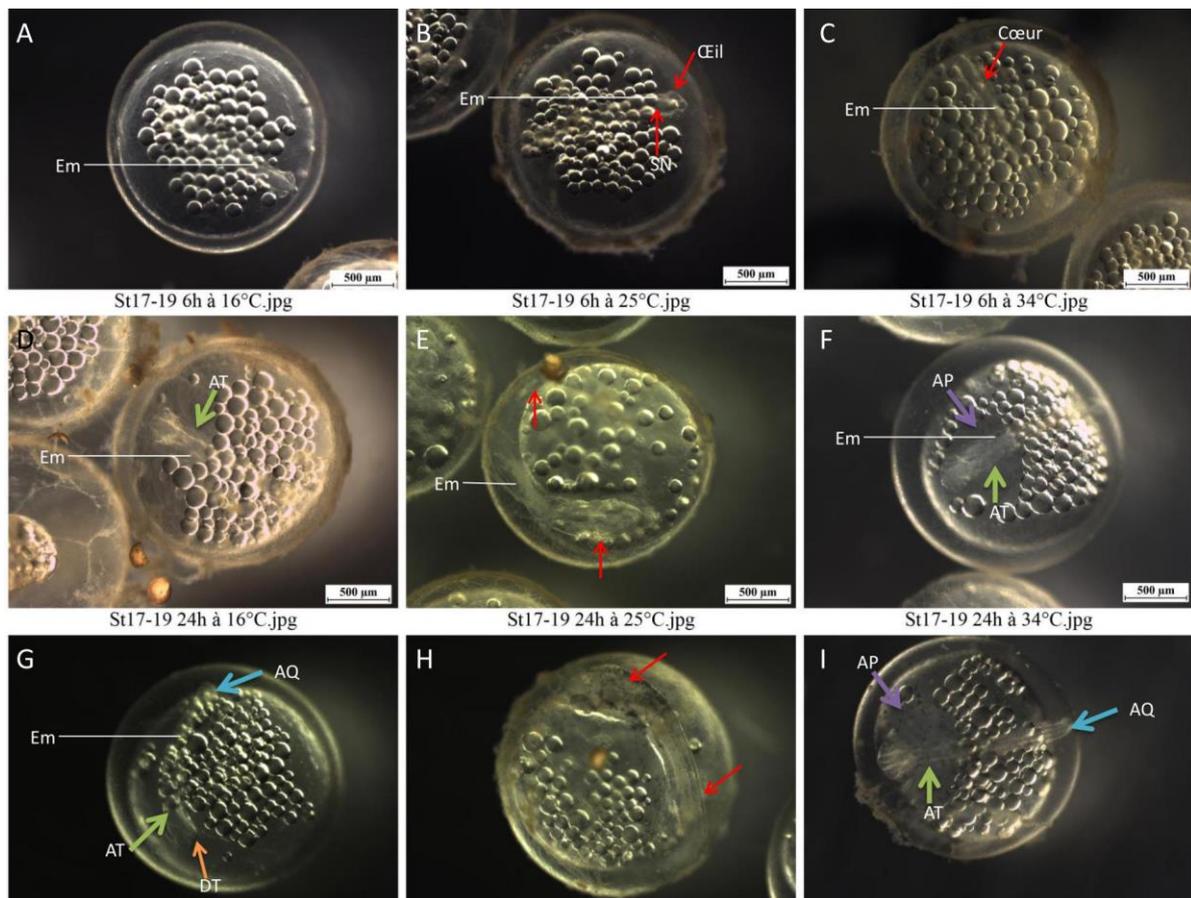


Figure 16 : Photos du développement des œufs exposés au stade St17-19 en fonction des 3 températures et des différents time-points. Les flèches rouges indiquent des caractéristiques normales par stade, les flèches vertes, violettes et oranges quant à elles, indiquent des anomalies morphologiques. AQ = Anomalie de la queue, AT = Anomalie du tronc, DT = Déformation de la tête, AP = Anomalie de pigmentation. Illustration personnelle.

Après 48h d'exposition, les œufs exposés à 16°C ont une mortalité de 40% (figure 17-B) contre 5% pour ceux exposés à 34°C. Aucun œuf exposé à 16°C n'atteint le stade 27 caractérisé par un élargissement du haut du tronc et de la tête, l'augmentation de la pigmentation (figure 16-H). Ils présentent des anomalies significatives ($P\text{-value} = 0.0001 < 0.05$) de développement au niveau de la queue (atrophies et pas de développement de la nageoire caudale), au niveau du tronc (pas de développement des tissus) et des déformations au niveau de la tête (yeux et cortex cérébral peu ou pas visibles).

Pour les œufs exposés à 34 °C, les mêmes observations sont constatées en complément des problèmes du rythme cardiaque (battements anormaux du cœur). L'aspiration du sac vitellin semble difficile, le cortex cérébral se déforme complètement, la pigmentation par les eurythrophores se disperse dans l'œuf, les tissus du tronc se collapsent, il y a peu ou pas de mouvements (différence significative $P\text{-value} = 0.0001 < 0.05$) (figure 17-C). 100% des œufs en condition de contrôle sont au stade 27 et ont un développement normal (figure 17-C et 16-H).

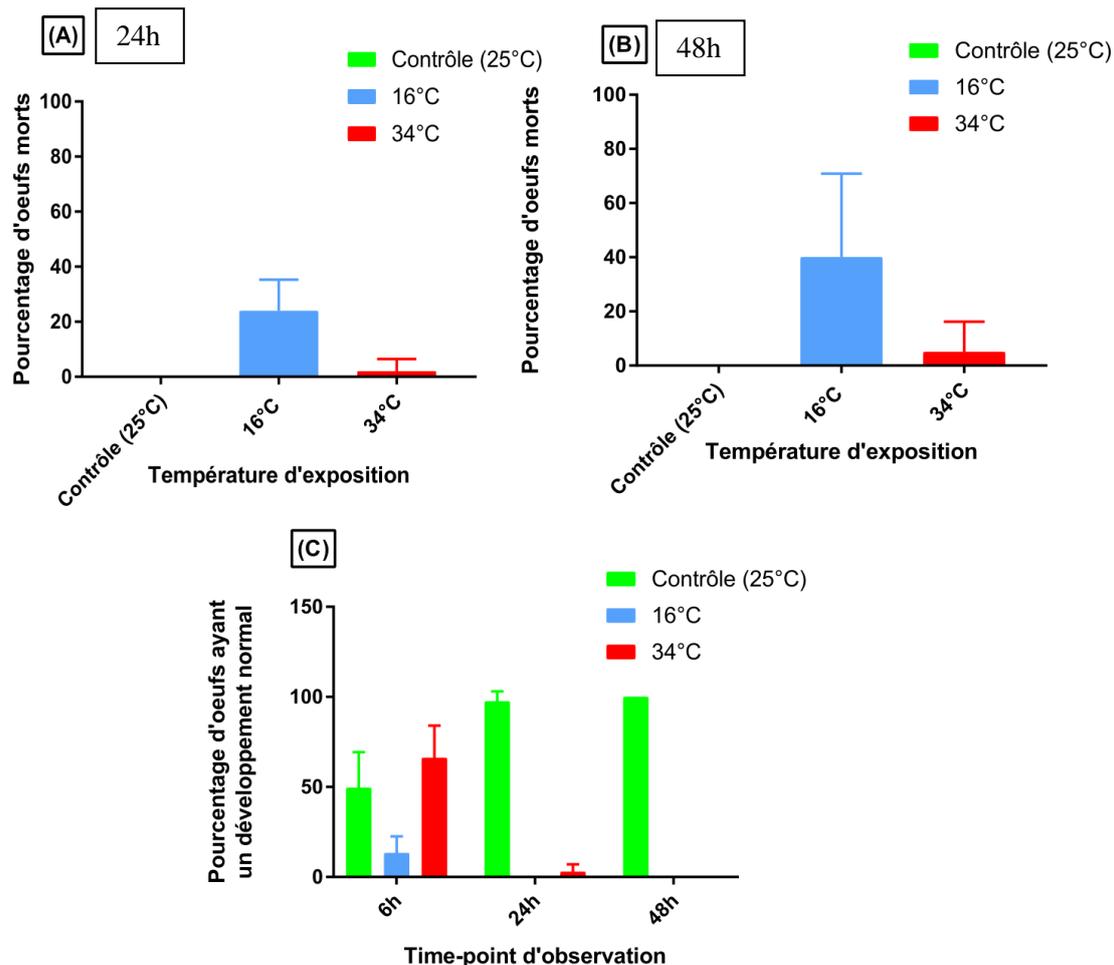


Figure 17 : Influence de la température sur le développement morphologique et la mortalité des oeufs. Des tests statistiques ont été effectués pour visualiser le développement morphologique et la mortalité des œufs exposés au stade 17-19. (A) Pourcentage de mortalité à 24h. Différence significative à 16°C (P-value <0.05), (B) Pourcentages de mortalité à 48h. , et (C) Pourcentage de développement normal des œufs selon les températures et la durée d'exposition. Différences significatives à 6h, 24, et 48h pour les œufs exposés à 16 °C et à 24h et 48h pour les œufs exposés à 34°C (P-value <0.05). (Illustration personnelle)

4. Expression des gènes codant pour les DNMTs

4.1. L'expression des gènes au cours du développement

La figure 18 présente les quelques résultats d'expressions des ARN messagers pour les gènes DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3 au cours du développement. Il en ressort que l'expression semble varier selon les stades. Pour le gène DNMT3A-var1 il apparaît comme étant 2 fois moins exprimé dans le stade 23-24 par rapport au stade 21-22. Par contre pour les stades 25 et 30 il apparaît comme respectivement 6,38 fois plus exprimés et 50 fois plus que dans le stade 21-22.

Le gène DNMT3B-var3, quant à lui apparaît 2,30 fois plus exprimé dans le stade 26 par rapport au stade 25, et 5 fois plus exprimé dans le cerveau d'hermaphrodite adulte par rapport au stade 25.

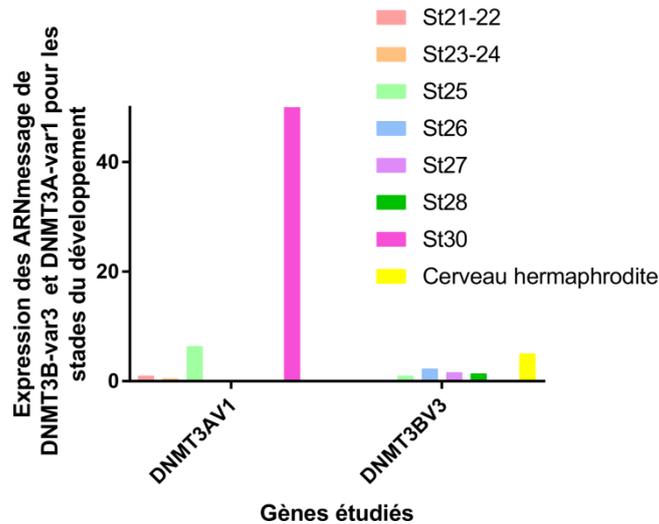


Figure 18 : Expression des DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3 pour quelques stades développement (Illustration personnelle)

4.2. L'expression des gènes après une perturbation environnementale

DNMT3A-var1, pour les œufs exposés 6h à 16°C au stade gastrula est 3,42 fois plus exprimé que dans les œufs de la condition contrôle à 25°C à 6h. Par contre, à 24h, nous pouvons voir l'inverse, puisque DNMT3A-var1 est 2 fois moins exprimé (figure 19-A). Pour les œufs exposés 6h à 34°C, il n'y a pas de différence d'expression par rapport au contrôle, alors qu'au bout de 24h d'exposition DNMT3A-var1 est 2,90 fois plus exprimé (figure 19-A).

Le gène DNMT3B-var3 ne semble pas différentiellement exprimé dans les œufs exposés 6h à 16°C ou 34°C par rapport à la condition contrôle à 25°C (figure 19-B). Alors qu'au bout de 24h, il est 3,47 fois moins exprimé dans les œufs exposés à 16°C par rapport à ceux exposés à 25°C, et il est 2,2 fois plus exprimé dans les œufs exposés à 34°C (figure 19-B).

Pour les œufs exposés durant 6h au stade St 17-19 à 16°C, l'expression des DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3 est sensiblement la même que celle des œufs de la condition contrôle. Par contre, le gène DNMT3A-var1 est 4,84 fois plus exprimé à 6h dans la condition 34°C que chez les œufs de la condition 25°C. Tandis que le gène DNMT3B-var3 est 3,10 fois plus exprimé chez les œufs exposés à une forte température (figure 19-C). Les calculs sont présents sur l'annexe 5.

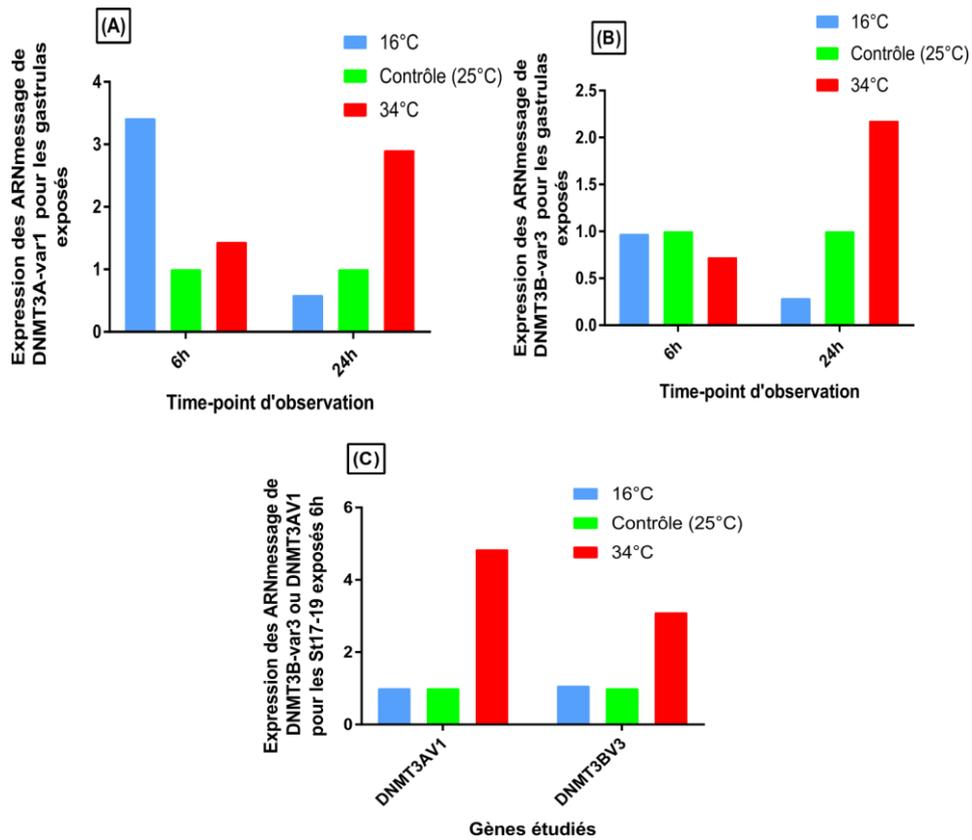


Figure 19 : Impacts de la température sur l'expression des gènes codants pour DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3. (A) Expressions de DNMT3A-var 1 pour les gastrulas à 6h et 24h. (B) Expressions de DNMT3B-var3 pour les gastrulas à 6h et 24h. (C) Expressions de DNMT3A-var1 et DNMT3B-var3 en fonction de la température après 6h d'exposition (Illustration personnelle)

1. Caractérisation moléculaire des DNMTs

Lors de ce stage nous avons mis en évidence les DNMTs 1, 3A (variant 1 et 2), 3B (variant 1,2 et3), chez le rivulus des mangroves, encore peu caractérisées concernant les mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN. Les tailles observées lors des PCRs sont un peu plus faibles que celles-attendues, par exemple la taille des gènes amplifiés pour DNMT3A-var1 et var 2 est de 1700 pb contre respectivement 2532 pb et 2667 pb attendus.

Ce résultat peut avoir plusieurs explications :

- La première c'est qu'il peut exister d'autres variants (comme c'est le cas chez le zebrafish où l'on dénombre pas moins de 8 variants pour les DNMT3 (Campos, Valente, et Fernandes 2012)) pour ces gènes

- La seconde explication peut venir d'une erreur lors de l'assemblage des séquences. A ce jour, seule une équipe a séquencé et annoté la séquence des DNMTs chez *K.marmoratus* (Kim et al. 2016).

- La troisième explication peut être due directement à la spécificité des lignées utilisées (DC4, DC11, et DC22), en effet, ces dernières présentent la particularité d'être naturellement isogéniques. Celle-ci peut amener de la variabilité sur tous les variants de ces gènes. Le réel biais de ces analyses est le manque d'informations sur le génome de ce poisson. Cependant, le génome annoté, a été publié très récemment (en juin 2016) (Kelley et al. 2016) (réalisation en cours du transcriptome et du méthylome par l'équipe).

Toutefois, les séquences mises en évidence sont bien des DNMTs car il existe la présence de domaines conservés caractéristiques et identifiés lors du Blast (analyse *in-silico*). Ceux-ci correspondent à des unités structurales fonctionnelles qui sont conservées au cours de l'évolution. Elles sont constituées de motifs protéiques (comme des sites de liaison ou des sites actifs d'enzymes) intervenant dans des fonctions particulières. Chaque domaine ayant une fonction précise en théorie, leur activité peut être supposée par comparaison avec les autres espèces mais le seul moyen de savoir s'ils sont fonctionnels, c'est de les cloner, de produire la protéine et de tester l'activité biochimique. Des domaines sont conservés chez différentes espèces et permettent de faire un lien hypothétique quant aux rôles des gènes où ils se trouvent.

Dans le cas des DNMTs, plusieurs domaines importants sont présents et donnent des indications pour les rôles. Toutes les séquences des DNMT1, DNMT3a (variant1 et 2) et DNMT3b-variant 1 ont le domaine Dcm, qui a été caractérisé comme intervenant dans la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les deux autres variants de DNMT3B portent le domaine AdoMet_MTases superfamily étant le siège de l'activité enzymatique méthyltransférases synthétisant le cofacteur S-Adenosyl-méthionine, qui est le donneur du groupement méthyl pour les méthylation de l'ADN (Turek-Plewa et Jagodziński 2005).

D'autres domaines sont inhérents aux gènes ; par exemple, seuls les DNMTs 1 présentent les domaines BAH_Dnmt1 (rôle dans la répression transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine) (Callebaut, Courvalin, et Mornon 1999), zf-C (intervient dans l'activation transcriptionnelle, la régulation de l'apoptose...), DNMT1-RFD (comporte le foyer de réplication des méthylation des cytosines. Il permet aux DNMT1 de méthyler les résidus

appropriés) (Turek-Plewa et Jagodziński 2005) et DMAP-Binding (intervient dans la co-répression transcriptionnelle) (Iyer, Abhiman, et Aravind 2011).

Les deux variants de DNMT3A portent le domaine ADDz_Dnmt3a qui intervient dans le contrôle transcriptionnel de la chromatine ainsi que le domaine Dnmt3b-related jouant le rôle d'un facteur de régulation dans de nombreux processus du développement (Qiu et al. 2002). Ce dernier est également présent pour les DNMT3b-var1 et 3. La séquence de DNMT3B-var2 portent les domaines PWWP superfamily (Qiu et al. 2002) et PHD_SF super family ces domaines jouent un rôle dans la régulation de la conformation de la chromatine ainsi qu'au niveau de l'activité des queues des histones.

Un dernier domaine n'est présent que chez les DNMT3B-Var3, le CH- superfamily. Ce dernier est fortement présent dans les gènes du cytosquelette et interviendrait dans la régulation de la contraction des muscles par le biais des microtubules (Bañuelos, Saraste, et Djinović Carugo 1998).

La question est de savoir si ces DNMTs sont actives chez le rivulus des mangroves et jouent les mêmes rôles que chez les autres espèces.

2. Caractérisation phylogénétique des DNMTs

Sur les trois arbres générés lors de l'analyse phylogénétique, les DNMTs s'apparient selon leurs types (1 ou 3a ou 3b) et selon les variants. La DNMT1 du rivulus des mangroves est proche de celle de *Xiphophorus maculatus x Xiphophorus helleri*, les DNMTs 3A-var1, et tous les variants de DNMT3B sont très proches de l'espèce *Larimichthys crocea*. A partir de ces appariements, il est possible d'envisager les rôles biologiques.

Les fonctions de cette famille d'enzyme commencent à être connues chez certaines espèces. Les DNMT1 sont notamment impliquées dans la maintenance des marques méthyles (et notamment lors de la transmission des patterns parentaux de méthylation lors des mitoses et méioses suivant la fécondation) (Gruenbaum et al. 1981) sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé lors des processus de réplication (Annexe1) (Bird 2002).

Alors que, les DNMT3A et DNMT3B ont pour rôle la méthylation *de novo* lors du développement embryonnaire (Annexe 1) (Angers et al. 2010; Vandegehuchte et Janssen 2011).

Il a été montré que la méthylation de l'ADN, du fait de son implication dans les régulations transcriptomiques, est importante dans de nombreux processus biologiques tels que :

- la différenciation et la pluripotence des cellules (grâce au phénomène de déméthylation/reméthylation) (Potok et al. 2013),
- la morphogénèse (taille, formation du tronc, des nageoires, mise en place de la circulation sanguine, développement des fonctions cardiaques, neurales, et germinales) (Bouwmeester et al. 2016; Cheng et al. 2015; Martin et al. 1999)
- l'ontogénie, l'inactivation du chromosome X et des éléments parasites et dans l'empreinte génomique (Hirose, Shimoda, et Kikuchi 2013).

Ainsi, nous pouvons envisager les suppositions suivantes quant aux rôles des DNMTs chez notre espèce :

- DNMT 1 joue un rôle dans la maintenance des patterns parentaux (au moins en partie) transmis à la descendance et lors de la méiose et mitose cellulaires.

- DNMT3A et B quant à eux, mettent en place les nouvelles méthylations qui vont réguler (activation ou répression) l'expression des gènes au cours du développement et lors de la vie de l'animal afin que l'organisme puisse mettre en place ses grandes fonctions biologiques comme le développement des tissus et des muscles, mise en place du système circulatoire, du système neural et cardiaque.

3. Expressions des gènes codant pour les DNMTs lors du développement

Une grande partie des échantillons (stade de développement) testés par qPCR ont un cycle threshold relativement tardif ($30 < Ct < 40$). Les gènes de ménage (une majeure partie) (β -actin et Ribosomal Protein) servant à normaliser ont le même problème. Il faut savoir qu'il est préconisé d'avoir des Ct inférieurs à 30 pour que les résultats puissent vraiment être interprétables. Au-dessus de ce nombre de cycles, les résultats sont à analyser avec parcimonie (Biosystems 2013; Life Technologies 2012).

Différents points techniques et/ ou biologiques peuvent expliquer ces résultats :

- le premier est la qualité des ARN extraits dont les rapports 260/280 et 260/230 doivent être supérieurs à 1,8 lorsqu'ils sont de très bonnes qualités. Dans le cas des extractions effectuées pour cette étude, les rapports étaient en-deçà de cette valeur. Le rapport 260/280 (correspondant aux contaminations par les protéines) reste toutefois acceptable avec une moyenne comprise entre 1,3 et 1,7. Par contre le rapport 260/230 (correspondant aux contaminations pour des solvants, par l'éthanol...) est toujours très bas (entre 0,3 et 0,7). Lorsque celui-ci est faible, cela signifie généralement la présence de solvants pouvant altérer ou inhiber les réactions de qPCR. Pour vérifier cette qualité, une migration pourrait être faite.

Différents facteurs peuvent être impliqués :

- le protocole utilisé n'est peut être pas suffisamment adapté pour l'extraction d'ARN sur les œufs de *K.marmoratus*,
- les constituants du chorion peuvent interférer dans l'extraction (présence d'ARNase endogène par exemple) et/ou saturent les colonnes,
- des problèmes techniques tels que de mauvaises manipulations ou, la température souvent trop élevée en salle de biologie moléculaire peuvent avoir joué sur la qualité des ARNm (malgré la manipulation sur glace).

Ainsi, la première solution serait de refaire des extractions d'ARN mais en prenant bien garde à la température ambiante et en utilisant d'autres protocoles d'extraction (avec et sans colonnes) tout en vérifiant sur gel la pureté des échantillons. Quelques tests avec la méthode du Tri-Reagent ont été fait après la fin de ce stage : les résultats montrent peu de différences au niveau des concentrations obtenues, mais des rapports généralement plus proches de 1,8 ou de 2. D'autres tests devraient avoir lieu pour améliorer ces extractions.

D'autres anomalies ont été mises en évidence, telles que :

- La présence de double température d'hybridation pour certains échantillons (une seule doit apparaître, sinon cela signifie qu'il peut y avoir de l'amplification non spécifique). Pour se prémunir de ce type de problèmes, il est essentiel de faire l'analyse avec les « Melt Curve » qui correspondent aux courbes de fusion et qui permettent de voir si l'amplification est spécifique. Cependant, le double T_m peut avoir une autre cause : la dimérisation des amorces. Bien que les amorces utilisées ait été validées pour leur efficacité (entre 87% et 100%), il pourrait y avoir une dimérisation qui s'effectue et faussant l'amplification.

Pour effectuer cette vérification , il y a deux moyens possibles :

- Le passage sur gel des produits de PCR afin de voir si des dimères d'amorces sont présents

- Le test de la potentialité des amorces à se dimériser sur des sites spécialisés (Life Technologies 2012).

Un dernier point peut interagir voir inhiber les réactions :

- L'utilisation de l'eau DEPC (traitée avec le diéthyl pyrocarbonate, diéthyl dicarbonate (DEPC) afin d'avoir de l'eau RNase free). En effet, cette eau est considérée RNase free suite à l'ajout de DEPC, que l'on chauffe pour détruire l'ensemble de ces contaminations. Par la suite, un passage à l'autoclave est effectué afin d'éliminer les résidus de DEPC dans l'eau. Toutefois, il peut arriver que ceux-ci soient encore présents et puissent inhiber les réactions de RT et de qPCR.

Nous avons pu constater que quelques résultats bruts de qPCR (Ct, Tm) semblaient correspondre aux normes requises pour les qPCR. Les stades pour DNMT3A-var 1 sont St21-22, St23-24, St 25 et St 30. Sur la figure 17, il est à constater que les DNMTs ne semblent pas s'exprimer de la même manière selon les stades de développement. Les mêmes résultats (bien que moins prononcés) sont observés pour DNMT3B-var3 (St25, St26, St 27, St28 et cerveau d'hermaphrodite). Ceux-là semblent corroborer avec des études récentes sur l'expression des DNMTs au cours du développement. L'étude d'Aluru (2016) montre que l'expression des DNMTs (et de leurs variants) change au cours du développement embryonnaire de manière importante, ce qui suppose des rôles spécifiques pour chacun d'eux. D'autres études récentes chez les mammifères par exemple, prouvent que l'intervention des DNMTs se ferait de manières successives : les DNMT3B pour les stades précoces et les DNMT3A pour les stades plus tardifs (Hirasawa et Sasaki 2009), la spécificité tissulaire des DNMTs a également été démontrée chez le zebrafish où les DNMT3a interviendraient dans la détermination des tissus (Takayama et al. 2014)

Nos résultats sur l'expression des DNMTs au cours du développement embryonnaire restent cependant préliminaires en raison du grand nombre d'échantillons dont l'amplification pour les gènes ciblés et les gènes de références donnent des résultats semblant anormaux. Il faudrait refaire l'ensemble des amplifications afin de vérifier les résultats actuels, et s'assurer que les Ct tardifs soient vraiment dus à un aléa technique ou du fait que les gènes ne se soient que peu exprimés.

Des analyses complémentaires comme les hybridations *in-situ* seront nécessaires afin de caractériser parfaitement le rôle des DNMTs comme cela a été fait chez le zebrafish (Takayama et al. 2014). Elles serviront à définir l'emplacement de l'expression des gènes au niveau des tissus lors des différents stades du développement.

4. Conséquences des expositions sur la biologie de l'espèce

Des embryons au stade gastrula et st 17-19 (formation de la tête et du système optique) ont été exposés à deux types de perturbateurs : un agent chimique- la 5-azacytidine, et un facteur environnemental.

Le stade gastrula a été choisi puisqu'il se situe dans la fenêtre de transition zygotique, correspondant à la fin de la phase de déméthylation et au début de la phase de reméthylation. A ce stade, les taux de méthylations sont extrêmement bas (environ 18%) (Fellous et al. 2016, in prep). Cette période a été caractérisée comme étant particulièrement sensible à l'influence

de perturbateurs. Différentes études montrent qu'une exposition lors de cette phase a des conséquences importantes sur l'embryogénèse : c'est notamment le cas chez *Danio rerio*, qui présente après des expositions à la 5-aza des anomalies morphologiques et physiologiques (peu de développement des tissus, et de la queue, pas de mise en place de la circulation chez des œufs exposés au stade blastula) (Bouwmeester et al. 2016; Martin et al. 1999).

Cette phase de transition est relativement tardive chez le rivulus des mangroves comparée à d'autres espèces. Celle de *Danio rerio* (Mhanni et McGowan 2004) ou de la souris (Saitou, Kagiwada, et Kurimoto 2012) est déjà terminée au stade gastrula, alors que dans le cadre de notre espèce, cette dernière ne s'achève qu'au stade 25 (stade présentant la formation du foie) (Fellous et al. 2016, in prep) : c'est pourquoi le stade St17-19 a été choisi puisqu'il est encore en transition.

4.1. Expositions à la 5-azacytidine

Les embryons (au stade gastrula et St17-19) ont été exposés à la 5-azacytidine (100µM ou 1000µM) qui est un inhibiteur compétitif des DNMTs. Lors des différents time-points d'observation, nous n'avons observé aucun effet sur la morphologie ou sur la physiologie de ces œufs pourtant en pleine phase de reméthylation. Cette dernière est considérée comme très critique pour le développement chez de nombreuses espèces (mammifères, poissons, insectes, mollusques etc..). Des expositions à la 5-aza lors de la transition zygotique ont montré chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), par exemple, une diminution des taux globaux de méthylations induisant des phénotypes anormaux.

Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), il a été montré que ses œufs exposés après le stade blastula et la transition zygotique se développaient normalement (Bouwmeester et al. 2016; Potok et al. 2013). Cela montre bien l'importance de la phase de reméthylation dans le développement embryonnaire

L'explication de ce développement normal pour les embryons de *K.marmoratus* aurait pu provenir d'une dégradation rapide de la 5-azacytidine en milieu aqueux (10% de perte au bout de 2 à 3h à température ambiante) (Sigma-aldrich 2008). Mais dans différentes études l'eau des bains n'est pas renouvelée (Bouwmeester et al. 2016; Riviere et al. 2013)

Par précaution, un changement des bains d'exposition a été réalisé toutes les 24h pour palier à cette altération : cependant les résultats sont restés identiques. Nous nous sommes interrogés sur l'efficacité de passage de la 5-azacytidine au travers du chorion des œufs.

Pour continuer les expositions et visualiser des effets, nous avons mis en place un traitement à la pronase (enzyme) afin de déchorioniser partiellement les œufs. Une déchorionisation totale aurait été trop violente à ces stades là et n'aurait pas permis d'effectuer les expositions à des stades précis du développement (la durée du traitement étant de 6 heures) (Mourabit et al. 2011)

Malgré l'ajout de ces traitements à la pronase avant les expositions à la 5-aza (et l'utilisation de concentrations élevées de ces produits), il n'a été constaté aucun effet (le chorion est intact et les embryons se développent tout à fait normalement). Il en ressort donc que le chorion épais semble être une barrière protectrice importante face à l'action de la pronase et de la 5-azacytidine durant le développement. A l'avenir pour pouvoir évaluer l'action de cet inhibiteur de la méthylation et obtenir des informations sur le rôle des différentes DNMTs chez *K.marmoratus*, la technique de micro-injections semble être requise afin de se soustraire à l'action protectrice du chorion (Mourabit et al. 2011).

4.2. Expositions à la température

La température est un facteur abiotique connu pour influencer la vie des organismes vivants qui sont adaptés pour vivre selon des gradients particuliers (Pörtner et Farrell 2008). Il a été prouvé que certains processus de développement sont dépendants de cette dernière, c'est notamment le cas pour la vernalisation chez les plantes. Celles-ci ont besoin de froid durant un temps assez long afin d'induire la floraison (Amasino 2004). Les changements de températures peuvent également influencer le développement morphologique. Par exemple, chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) une diminution de la température à 18°C entraîne un retard du développement alors qu'une plus élevée occasionne des mortalités et des phénotypes anormaux (Fellous, Favrel, et Riviere 2015). Ces modifications phénotypiques sont connues pour être liées à la modification des patterns de méthylation (fluctuations des taux globaux de méthylation) (Schmitz, Sung, et Amasino 2008; Varriale et Bernardi 2006).

Les mangroves, le milieu de vie de *K.marmoratus* sont soumises à un gradient important de température (de 13°C à 29°C en moyenne) (Quisthoudt et al. 2012). Le rivulus des mangroves est un poisson parfaitement adapté à ce gradient puisqu'il est capable de vivre dans des gammes de températures de 7°C à 38°C (Taylor et al. 2008). C'est en prenant en compte ces éléments et le contexte du changement climatique que nous avons déterminé les températures haute et basse de l'exposition.

4.2.1. Impacts de la température sur le développement des œufs

L'exposition à une température froide (16°C) semble avoir pour effet à 6h de bloquer le développement des gastrulas : ces dernières devraient se trouver au stade 100% Epiboly. Alors qu'à la même durée d'exposition, les gastrulas exposés aux températures 25°C et 34°C avaient un développement normal. Ces effets ont déjà été notamment montrés chez plusieurs espèces d'oursins. Ces derniers suite à des expositions à différentes gammes de températures montrent des vitesses de développement dépendantes de ce facteur et des difficultés à se développer (Fujisawa 1989).

A 24h et 48h, les mortalités sont très importantes pour les gastrulas à 16°C et aucun œuf n'arrive à se développer contrairement aux œufs à 25°C. Les œufs à 34°C ont encore un faible taux de mortalité à 24h, mais qui augmente très largement à 48h. Dans le même temps peu d'œufs se développent. Ceux qui y arrivent présentent des malformations au niveau de la tête et des tissus du tronc.

Le fait que les gastrulas se trouvent dans la fenêtre critique du reprogramming peut expliquer ces mortalités et ces retards de développement. L'importance de cette phase a été exposée dans de nombreuses études où l'action d'un perturbateur (chimique, environnemental) avait une influence sur le développement (Bouwmeester et al. 2016; Fellous et al. 2016; Martin et al. 1999). De plus, Potok (2013) a montré que la déméthylation/reméthylation permettait la mise en place de la totipotence des cellules, étape obligatoire pour la mise en place de la morphogénèse.

Pour les œufs exposés au stade « formation de la tête et des yeux » (St17-19), un retard de croissance est observé à 16°C. A 34°C, les œufs ont globalement le même développement que les œufs exposés à 25°C. Par contre aucun stade n'a subi de mortalités. Ces derniers apparaissent au bout de 24h et 48h notamment pour les œufs à 16°C. Nous retrouvons ici sensiblement les mêmes résultats que pour le stade gastrula. Cependant, la mortalité est moins importante pour ce stade 17-19 et est moins rapide. La phase de reprogramming est déjà activée ce qui semble permettre à ces œufs de davantage supporter l'effet de la température (Potok et al. 2013).

Les œufs à 25°C se développent de manière tout à fait normale, alors que les œufs exposés à 34°C développent des malformations dès 24h après le début de l'expérience. Ces malformations sont de diverses sortes : battements de cœurs non réguliers (augmentation ou diminution du rythme cardiaque), éclatement des tissus du tronc, perte de des eurythrocytes dans le sac vitellin, alimentation par le sac vitellin semble difficile (changement de rythmes). Certains embryons n'ont plus le système neural visible ou totalement gonflé, peu de mouvements sont visibles et la circulation n'est pas toujours mise en place. L'ensemble de ces effets rappellent ceux observés pour les expositions à la 5-azacytidine chez *Danio rerio* où des malformations phénotypiques (développement de la queue, des tissus) et physiologiques (pas de circulation sanguine, déformation du cortex cérébral) ont été observées pour des œufs exposés dans la phase de reprogramming constituant la phase où les nouvelles méthylations se mettent en place (Bouwmeester et al. 2016; Martin et al. 1999) .

Ces résultats montrent qu'un optimum de température est nécessaire pour avoir un développement normal des œufs, et plus les écarts sont grands par rapport à cet optimal et plus le développement est incertain. D'autres études comme celle de Dixon (2009) démontrent la relation entre la température et le développement : pour des températures trop hautes ou trop basses le taux de développement est minimal voir nul.

4.2.2. Influence de la température sur l'expression des DNMTs

Les résultats montrent à 6h, une surexpression du gène DNMT3A-var1 pour l'exposition à 16°C alors que les deux autres températures ne semblent pas influencer l'expression de ce dernier. Pour le gène DNMT3B-var 3, son expression ne semble pas varier entre les différentes conditions.

Par contre à 24h, il est surexprimé pour la condition 34°C par rapport aux températures 25°C et 16°C. Le même pattern d'expression est retrouvé à 24h pour le gène DNMT3A-var1. La température influence l'expression des gènes de la méthylation au cours du développement comme le montre l'étude de Campos(2012) sur les œufs de poissons zèbre. Les DNMTs n'ont pas le même profil d'expression selon le stade et la température.

C'est ce qui est retrouvé pour les stades 17-19 6h après le début de l'exposition où l'expression de DNMT3A-var1 et DNMT3B-var1 est plus importante pour les œufs exposés à 34°C contrairement aux œufs exposés à 16°C ou 25°C.

Toutefois chez d'autres espèces comme la sole sénégalaise il a été montré que les DNMT3B avaient une expression plus importante pour des températures à 15°C. Il semblerait donc qu'une différence d'expression puisse exister entre les espèces. Un changement d'activités de ces gènes ou un changement du pattern entre les espèces est une hypothèse à ce différentiel d'expression mais qui reste à confirmer.

Conclusion

Kryptolebias marmoratus est un poisson aux capacités adaptatives exceptionnelles mais dont les rouages génétiques et épigénétiques sont encore peu connus. Le but de ce stage était de caractériser les DNMTs (enzymes intervenant dans les méthylations de l'ADN) et d'obtenir leurs expressions dans l'ensemble du cycle de vie pour envisager un rôle et leur importance dans le développement embryonnaire et au cours du reprogramming. Pour cela, nous avons utilisé une approche biomoléculaire, et macrobiologique avec des expositions à différents facteurs.

Malgré un manque de résultats pour l'expression des gènes au cours du cycle de vie, quelques hypothèses quant à leurs rôles ont été mises en évidence comme l'action des DNMT3 dans la mise en place des nouvelles méthylations et leurs rôles potentiels dans le développement des tissus. Ce qui est sûr, c'est que la température est un facteur limitant pour la croissance des œufs de *K.marmoratus*.

Néanmoins beaucoup d'études restent à faire pour déterminer le rôle des DNMTs chez *K.marmoratus*. L'établissement des expressions de l'ensemble des gènes et de leurs variants devra être mis en place. Ces profils devront être couplés à des hybridations *in-situ*, pour faire le lien entre l'expression et la spécificité de chaque gène et de chaque variant dans le développement des tissus et des organes, ainsi que dans la morphogénèse globale.

Les études épigénétiques concernant le rivulus des mangroves sont encore peu nombreuses et l'obtention de ces résultats serait un atout pour la compréhension de sa biologie.

Il serait intéressant d'observer comment ces embryons s'adaptent à différents perturbateurs environnementaux lorsqu'ils sont exposés à différents stades du développement (à l'intérieur de la phase critique du reprogramming mais aussi lorsqu'ils ont leur nouveau pattern de méthylation mis en place). Ces études apporteraient des informations cruciales pour la compréhension de la grande adaptabilité de cette espèce à son environnement.

Bibliographie, sitographie, ouvrage

Bibliographie

- Abel, DC, SS Koenig, et WP Davis. 1987. « Immersion in the mangrove forest fish, *Rivulus marmoratus*: a unique response to hydrogen sulfide. » *Environ Biol Fishes* 18:67-72.
- Aluru, Neelakanteswar et al. 2016. « Developmental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters DNA methyltransferase (dnmt) expression in zebrafish (*Danio rerio*) ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 284(2):142-51.
- Amasino, Richard. 2004. « Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter ». *The Plant cell* 16(10):2553-59.
- Angers, Bernard, Emilie Castonguay, et Rachel Massicotte. 2010. « Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after ». *Molecular Ecology* 19(7):1283-95.
- Arand, Julia et al. 2012. « In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases ». *PLoS Genetics* 8(6).
- Bañuelos, S., M. Saraste, et K. Djinović Carugo. 1998. « Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. » *Structure* 6(11):1419-31.
- Biosystems, Applied. 2013. « Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR ». *Gene Expression* 2009:1-70.
- Bird, Adrian. 2002. « DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory ». *Genes & Development* 6-21.
- Bird, Adrian P. 1986. « CpG-rich islands and the function of DNA methylation ». *Nature* 321(6067):209-13.
- Bouwmeester, Manon C. et al. 2016. « Zebrafish embryos as a screen for DNA methylation modifications after compound exposure ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 291:84-96.
- Callebaut, Isabelle, Jean-Claude Courvalin, et Jean-Paul Mornon. 1999. « The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation ». *FEBS Letters* 446(1):189-93.
- Campos, Catarina, Luisa M. P. Valente, Luis E. C. Conceição, Sofia Engrola, et Jorge M. O. Fernandes. 2013. « Temperature affects methylation of the myogenin putative promoter, its expression and muscle cellularity in Senegalese sole larvae ». *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 8(4):389-97.
- Campos, Catarina, Luisa M. P. Valente, et Jorge M. O. Fernandes. 2012. « Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development ». *Gene* 500(1):93-100.
- Cheng, Ying, Nina Xie, Peng Jin, et Tao Wang. 2015. « DNA methylation and hydroxymethylation in stem cells. » *Cell biochemistry and function* (February):161-73.
- Cooper, C. A., S. L. Litwiller, C. L. Murrant, et P. A. Wright. 2012. « Cutaneous vasoregulation during short- and long-term aerial acclimation in the amphibious mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus* ». *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 161(3):268-74.
- Davis, William P., D. Scou Taylor, et Bruce J. Turner. 1990. « Field observations of the ecology and habits of mangrove rivulus ». *Ecology* 1(2).
- Dixon, Anthony F. G. et al. 2009. « Relationship between the minimum and maximum

- temperature thresholds for development in insects ». *Functional Ecology* 23(2):257-64.
- Fellous, Alexandre, Pascal Favrel, et Guillaume Riviere. 2015. « Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas* ». *Marine Genomics* 19:23-30.
- Fellous, Alexandre, Tiphaine Labed-veydert, Anne-sophie Voisin, et Mélodie Locrel. 2016. « Global DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the self-fertilizing mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*). » *Soumis* 1-28.
- Fujisawa, Hirosuke. 1989. « Differences in Temperature Dependence of Early Development of Sea Urchins with Different Growing Seasons ». *The Biological Bulletin* 176(June 1988):96-102.
- Goldberg, Aaron D., C. David Allis, et Emily Bernstein. 2007. « Epigenetics: A Landscape Takes Shape ». *Cell* 128(4):635-38.
- Gruenbaum, Yosef, Reuven Steint, Aharon Razin, et Howard Cedart. 1981. « Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA ». *North-Holland Biomedical Press* 124(11):67-71.
- Harrington, R. W. 1961. « Oviparous Hermaphroditic Fish with Internal Self-Fertilization ». *Science* 134(3492):1749-50.
- Harrington, R. W. 1975. « Sex Determination and Differentiation among Uniparental Homozygotes of the Hermaphroditic Fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontidae: Atheriniformes) ». P. 249-62 in *Intersexuality in the Animal Kingdom*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Head, Jessica A. 2014. « Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective ». *Integrative and Comparative Biology* 54(1):77-86.
- Hirasawa, Ryutaro et Hiroyuki Sasaki. 2009. « Dynamic transition of Dnmt3b expression in mouse pre- and early post-implantation embryos ». *Gene Expression Patterns* 9(1):27-30.
- Hirose, Kentaro, Nobuyoshi Shimoda, et Yutaka Kikuchi. 2013. « Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin ». *Epigenetics* 8(9):899-906.
- Huehner, MK, ME Schramm, et MD Hens. 1985. « Notes on the behavior and ecology of the killifish *Rivulus marmoratus* Poey 1880 (Cyprinodontidae). » *Pla Sci* 48:1-6.
- Iyer, Lakshminarayan M., Saraswathi Abhiman, et L. Aravind. 2011. « Natural History of Eukaryotic DNA Methylation Systems ». P. 25-104 in.
- Jaenisch, Rudolf et Adrian Bird. 2003. « Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. » *Nature genetics* 33 Suppl(march):245-54.
- Jeltsch, Albert, Wolfgang Nellen, et Frank Lyko. 2006. « Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases ». *Trends in Biochemical Sciences* 31(6):306-8.
- Kelley, Joanna L. et al. 2016. « The Genome of the Self-Fertilizing Mangrove Rivulus Fish, *Kryptolebias marmoratus* : A Model for Studying Phenotypic Plasticity and Adaptations to Extreme Environments ». *Genome Biology and Evolution* 8(7):2145-54.
- Kim, Bo-Mi et al. 2016. « Correlation between the DNA methyltransferase (Dnmt) gene family and genome-wide 5-methylcytosine (5mC) in rotifer, copepod, and fish ». *Genes & Genomics* 38(1):13-23.
- Kristensen, I. 1970. « Competition in three cyprinodont fish species in the Netherlands Antilles. » *Stud Fauna Curacao Carib Isl* 119:82-101.
- Lee, J. S., S. Raisuddin, et D. Schlenk. 2008. « *Kryptolebias Marmoratus* (Poey, 1880): A

- Potential Model Species for Molecular Carcinogenesis and Ecotoxicogenomics ». *Journal of Fish Biology* 72(8):1871-89.
- Life Technologies. 2012. « Life Technologies Real-time PCR handbook ». 1-20.
- Liu, Sen, Keping Sun, Tinglei Jiang, et Jiang Feng. 2015. « Natural epigenetic variation in bats and its role in evolution. » *The Journal of experimental biology* 218(Pt 1):100-106.
- Martin, C. C., L. Laforest, M. a Akimenko, et M. Ekker. 1999. « A role for DNA methylation in gastrulation and somite patterning. » *Developmental biology* 206(2):189-205.
- Massicotte, Rachel et Bernard Angers. 2012. « General-Purpose Genotype or How Epigenetics Extend the Flexibility of a Genotype ». *Genetics Research International* 2012:1-7.
- McIvor, Carole C. et Noah L. Silverman. 2010. « Modifications to the bottomless lift net for sampling nekton in tidal mangrove forests ». *Wetlands Ecology and Management* 18(6):627-35.
- Mhanni, A. A. et R. A. McGowan. 2004. « Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo ». *Development Genes and Evolution* 214(8):412-17.
- Mourabit, Sulayman, Mathew Edenbrow, Darren P. Croft, et Tetsuhiro Kudoh. 2011. « Embryonic development of the self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* ». *Developmental Dynamics* 240(7):1694-1704.
- Pörtner, H. O. et A. Farrell. 2008. « Physiology and climate change ». *Science* 322(October):690-92.
- Potok, Magdalena E., David A. Nix, Timothy J. Parnell, et Bradley R. Cairns. 2013. « Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern ». *Cell* 153(4):759-72.
- Pronko, Alexander J., Benjamin M. Perlman, et Miriam a Ashley-Ross. 2013. « Launches, squiggles and pounces, oh my! The water-land transition in mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*). » *The Journal of experimental biology* 216(Pt 21):3988-95.
- Qiu, Chen, Ken Sawada, Xing Zhang, et Xiaodong Cheng. 2002. « The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds ». *Nature Structural Biology*.
- Quisthoudt, Katrien et al. 2012. « Temperature variation among mangrove latitudinal range limits worldwide ». *Trees - Structure and Function* 26(6):1919-31.
- Rai, Kunal et al. 2008. « DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45 ». *Cell* 135(7):1201-12.
- Regan, Kelly S., Michael G. Jonz, et Patricia a Wright. 2011. « Neuroepithelial cells and the hypoxia emersion response in the amphibious fish *Kryptolebias marmoratus*. » *The Journal of experimental biology* 214(Pt 15):2560-68.
- Richards, Travis M., Justin M. Krebs, et Carole C. McIvor. 2011. « Microhabitat associations of a semi-terrestrial fish, *Kryptolebias marmoratus* (Poey 1880) in a mosquito-ditched mangrove forest, west-central Florida ». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401(1-2):48-56.
- Riviere, Guillaume et al. 2013. « DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas* ». *Marine Biotechnology* 15(6):739-53.
- Saitou, M., S. Kagiwada, et K. Kurimoto. 2012. « Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells ». *Development* 139(1):15-31.
- Sakakura, Yoshitaka, Kiyoshi Soyano, David L. G. Noakes, et Atsushi Hagiwara. 2006. « Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus* ». *Ichthyological Research* 53(4):427-30.

- Schmitz, Robert J., Sibum Sung, et Richard M. Amasino. 2008. « Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(2):411-16.
- Sigma-aldrich. 2008. « Product information : 5-Azacytidine ». 11-12.
- Takai, Daiya et Peter A. Jones. 2002. « Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6):3740-45.
- Takayama, Kazuya, Nobuyoshi Shimoda, Shunsuke Takanaga, Shunya Hozumi, et Yutaka Kikuchi. 2014. « Expression patterns of dnmt3aa, dnmt3ab, and dnmt4 during development and fin regeneration in zebrafish ». *Gene Expression Patterns* 14(2):105-10.
- Tammen, Stephanie A., Simonetta Friso, et Sang Woon Choi. 2013. « Epigenetics: The link between nature and nurture ». *Molecular Aspects of Medicine* 34(4):753-64.
- Tatarenkov, Andrey, Ryan L. Earley, D. Scott Taylor, et John C. Avise. 2012. « Microevolutionary distribution of isogenicity in a self-fertilizing fish (*Kryptolebias marmoratus*) in the florida keys ». *Integrative and Comparative Biology* 52(6):743-52.
- Tatarenkov, Andrey, Sergio M. Q. Lima, D. Scott Taylor, et John C. Avise. 2009. « Long-term retention of self-fertilization in a fish clade. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(34):14456-59.
- Taylor, D. S. 2000. « Biology and ecology of *Rivulus marmoratus*: new insights and a review ». *Fla Sci* 63:242-55.
- Taylor, D. S. 2012. « Twenty-Four Years in the Mud: What Have We Learned About the Natural History and Ecology of the Mangrove *Rivulus*, *Kryptolebias Marmoratus*? » *Integrative and Comparative Biology* 52(6):724-36.
- Taylor, D. Scott, William P. Davis, et Bruce J. Turner. 1995. « *Rivulus marmoratus* : Ecology of distributional patterns in Florida and the Central Indian Tiver Lagoon ». *Bulletin of marine science* 57(1):202-7.
- Taylor, D. Scott, Bruce J. Turner, William P. Davis, et Ben B. Chapman. 2008. « A novel terrestrial fish habitat inside emergent logs. » *The American naturalist* 171(2):263-66.
- Turek-Plewa, Justyna et Paweł P. Jagodziński. 2005. « The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. » *Cellular & molecular biology letters* 10(4):631-47.
- Turko, A. J., R. L. Earley, et P. A. Wright. 2011. « Behaviour drives morphology: voluntary emersion patterns shape gill structure in genetically identical mangrove *rivulus* ». *Animal Behaviour* 82(1):39-47.
- Vandegheuchte, Michiel B. et Colin R. Janssen. 2011. « Epigenetics and its implications for ecotoxicology ». *Ecotoxicology* 20(3):607-24.
- Varriale, Annalisa et Giorgio Bernardi. 2006. « DNA methylation and body temperature in fishes ». *Gene* 385(April):111-21.
- Weeks, Stephen C. 2012. « The role of androdioecy and gynodioecy in mediating evolutionary transitions between dioecy and hermaphroditism in the animalia ». *Evolution* 66(12):3670-86.
- Ziller, Michael J. et al. 2011. « Genomic distribution and Inter-Sample variation of Non-CpG methylation across human cell types ». *PLoS Genetics* 7(12).

Sitographie

IUCN. 2012. *Kryptolebias Marmoratus*: NatureServe: *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014: e.T19735A19034633. Consulté 2 mars 2016 (<http://www.iucnredlist.org/details/19735/0>).

Ouvrage

Watson, James et al. 2009. *Biologie moléculaire du gène*. 6ème édit. édité par Pearson. Paris.

Annexe 1 : Schéma de synthèse du fonctionnement des DNMTs

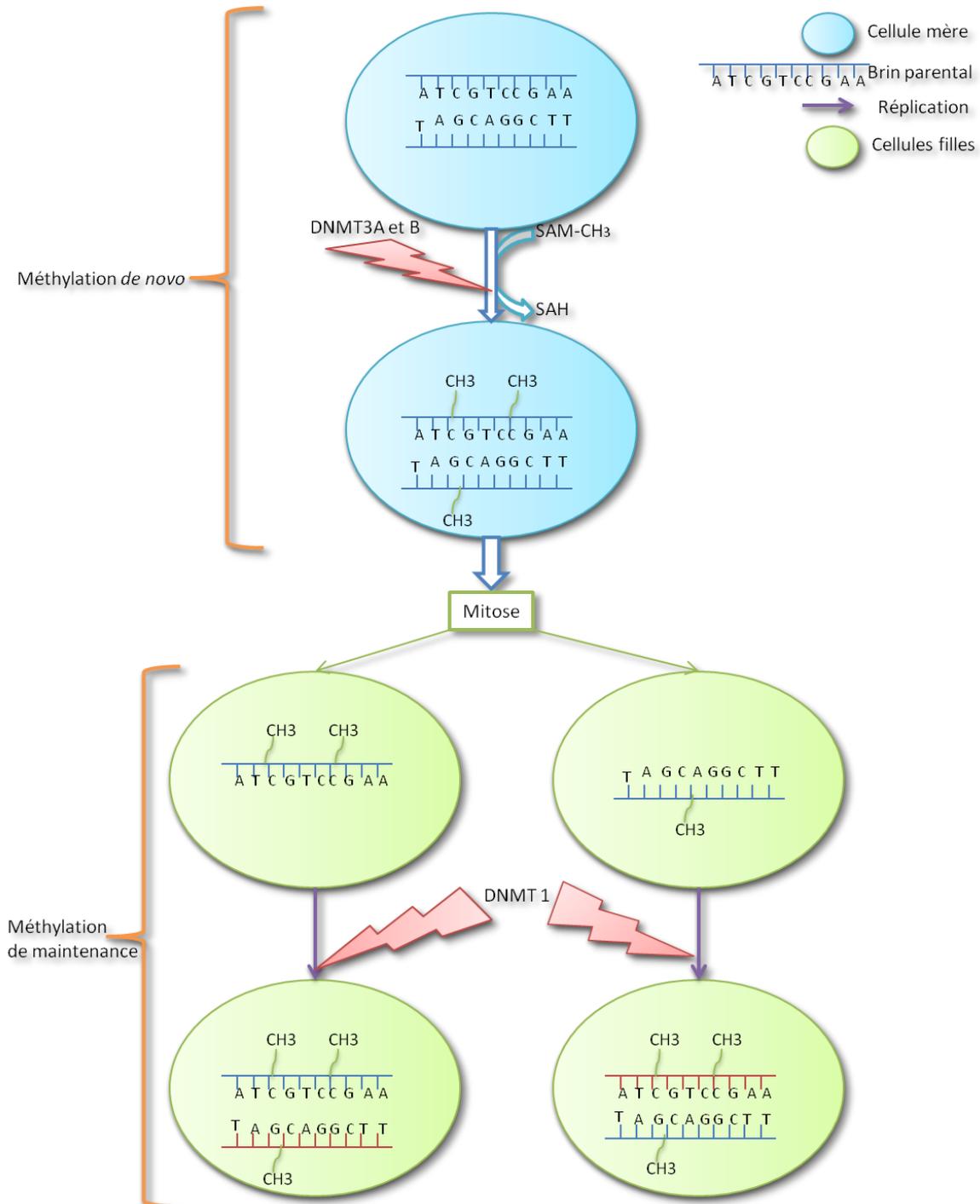


Figure 7 : Schéma simplifié des processus de méthylation. Les DNMT3 sont responsables de la mise en place des nouvelles méthylations de l'ADN, alors que les DNMT1 interviennent dans le maintien des patterns de méthylations (Schéma personnel).

✚ **Annexe 2 :** Tableau récapitulatif des gènes ayant la plus grande homologie avec *K.marmoratus*

Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence	
DNMT 1	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100%	100 %	ALA55860.1	
	<i>Xiphophorus maculatus x</i>	100%	88%	AAF73200.1	
	<i>Xiphophorus helleri</i>				
	<i>Danio rerio</i>		100%	80 %	AAI63893.1
					AAI63894.1
					NP_571264.2
			100%	80%	AAL86596.1
	<i>Carassius auratus</i>	100%	80%	ACJ04671.1	
	<i>Scleropages formosus</i>	97 %	78%	KPP68489.1	
	<i>Alligator mississippiensis</i>	99 %	72 %	KYO47915.1	
	<i>Modelphis domestica</i>	99 %	72%	NP_001028141.1	
	<i>Gallus gallus</i>	99%	71 %	NP_996835.1	
<i>Xenopus laevis</i>		99 %	72 %	AAH72774.1	
				NP_001084021.1	

Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence
DNMT 3A – like 1 protein	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100%	100 %	ALA55861.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	97 %	94 %	KKF23097.1

Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence
DNMT 3A – like 2 protein	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100%	100 %	ALA55862.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	99%	88%	KKF13382.1

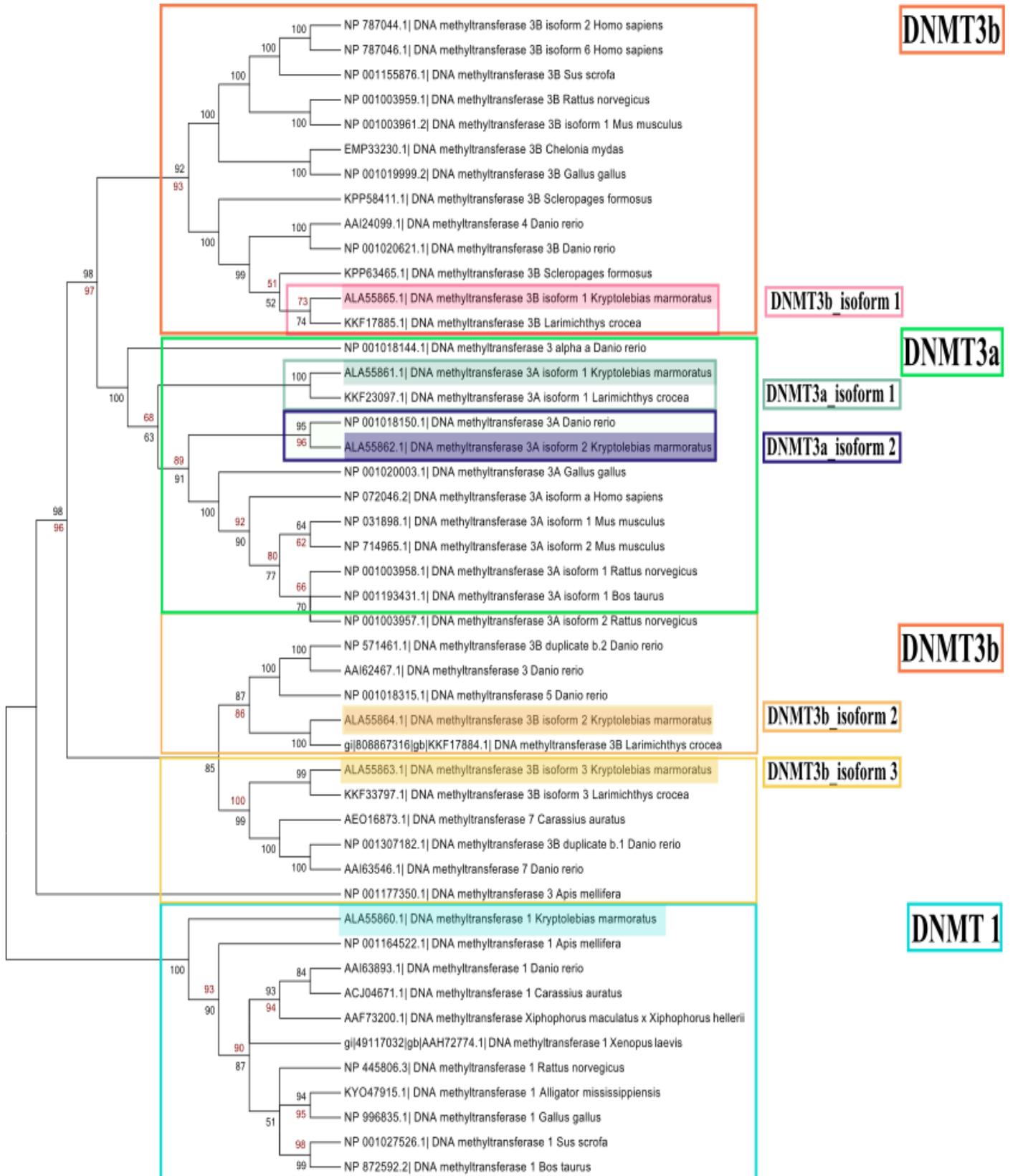
Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence	
DNMT 3B – like 1 protein	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100%	100 %	ALA55865.1	
	<i>Larimichthys crocea</i>	100%	84 %	KKF17885.1	
	<i>Danio rerio</i>		100%	77%	NP_001020621.1
		<i>Danio rerio (DNMT 4)</i>			AAI24099.1
	<i>Scleropages formosus</i>		100%	74 %	KPP63465.1
			98 %	69%	KPP58411.1
	<i>Chelonia mydas</i>	96 %	59 %	EMP33230.1	
	<i>Homo sapiens(isoform 6)</i>	79 %	69 %	NP_787046.1	
	<i>Homo sapiens(isoform 2)</i>			NP_787044.1	

Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence	
DNMT 3B – like 2 protein	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100 %	100 %	ALA55864.1	
	<i>Danio rerio</i>	82 %	54 %	AAI62467.1	
	<i>Danio rerio (DNMT3 beta duplicate b.2)</i>		82 %	54 %	NP_571461.1
		<i>Danio rerio (DNMT3 beta duplicate a isoform 1)</i>	77 %	64 %	NP_001307182.1
	<i>Danio rerio (DNMT7)</i>	77 %	64 %	AAI63546.1	
	<i>Danio rerio (de novoDNMT3)</i>	50 %	54 %	AAD32631.1	
	<i>Danio rerio</i>	77 %	64 %	BAD95481.1	
	<i>Danio rerio (DNMT5)</i>	50 %	54 %	NP_001018315.1	
	<i>Carassius auratus(DNMT 7)</i>	87 %	64 %	AEO16873.1	

DNMT 3B – like 2 protein	<i>Larimichthys crocea</i>	73 %	66 %	KKF33797.1
		93 %	48 %	KKF17884.1
	<i>Kryptolebias marmoratus</i> (DNMT 3B –like 3protein)	75 %	65 %	ALA55863.1

Gènes	Espèces	Coverage	Identification	Référence
DNMT 3B – like 3 protein	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	100 %	100 %	ALA55863.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	98 %	65 %	KKF33797.1
	<i>Carassius auratus</i> (DNMT 7)	98 %	50 %	AEO16873.1
	<i>Danio rerio</i> (DNMT7)	98 %	49 %	AAI63546.1
	<i>Danio rerio</i> (DNMT3 beta duplicate a isoform 1)	98 %	49 %	NP_001307182.1
	<i>Danio rerio</i>	98 %	49 %	BAD95481.1
	<i>Danio rerio</i> (DNMT4)	45 %	54 %	AAI24099.1
	<i>Danio rerio</i> (DNMT3B)	45 %	54 %	NP_001020621.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	45 %	55 %	KKF17885.1
	<i>Scleropages formosus</i>	45 %	53 %	KPP58411.1
	<i>Kryptolebias marmoratus</i> (DNMT 3B –like 1protein)	45 %	52 %	ALA55865.1

Annexe 3 : Arbres phylogénétiques (Minimum Evolution Tree et Neighbor-joining Tree) combinés.
 Les valeurs du Minimum Evolution Tree sont en rouge sur l'arbre



Annexe 4 : Sortie numérique des résultats statistiques sous GraphPad

Pour les tests de significativité de la mortalité pour les œufs exposés au stade gastrula:

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Adjusted P Value
6h				
Control (25°C) vs. 16°C	0	-0,2711 to 0,2711	No	0,9999
Control (25°C) vs. 34°C	-0,09812	-0,3692 to 0,1729	No	0,6188
24h				
Control (25°C) vs. 16°C	-0,74	-1,011 to -0,4689	Yes	0,0001
Control (25°C) vs. 34°C	-0,2272	-0,4983 to 0,04383	No	0,1098
48h				
Control (25°C) vs. 16°C	-1,134	-1,405 to -0,8625	Yes	0,0001
Control (25°C) vs. 34°C	-0,7067	-0,9778 to -0,4357	Yes	0,0001

Pour les tests de significativité de la mortalité pour les œufs exposés au stade St17-19 :

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff,	Significant?	Adjusted P Value
à 6h			
Control (25°C) vs. 16°C	0	No	>0,9999
Control (25°C) vs. 34°C	0	No	>0,9999
à 24h			
Control (25°C) vs. 16°C	-8	Yes	0,0228
Control (25°C) vs. 34°C	-1	No	>0,9999
à 48h			
Control (25°C) vs. 16°C	-6	No	0,1156
Control (25°C) vs. 34°C	-1,5	No	>0,9999

Pour les tests de significativité du développement morphologique pour les œufs exposés au stade gastrula :

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff,	Significant?	Adjusted P Value
à 6h			
Control (25°C) vs. 16°C	7,5	Yes	0,0354
Control (25°C) vs. 34°C	0	No	>0,9999
à 24h			
Control (25°C) vs. 16°C	10	Yes	0,0031
Control (25°C) vs. 34°C	5	No	0,2277
à 48h			
Control (25°C) vs. 16°C	7,5	Yes	0,0354
Control (25°C) vs. 34°C	7,5	Yes	0,0354

Pour les tests de significativité du développement morphologique pour les œufs exposés au stade St17-19 :

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Adjusted P Value
6h				
Contrôle (25°C) vs. 16°C	0,6188	0,461 to 0,7766	Yes	0,0001
Contrôle (25°C) vs. 34°C	0,033	-0,1248 to 0,1908	No	0,8466
24h				
Contrôle (25°C) vs. 16°C	0,8833	0,7255 to 1,041	Yes	0,0001
Contrôle (25°C) vs. 34°C	0,6444	0,4866 to 0,8022	Yes	0,0001
48h				
Contrôle (25°C) vs. 16°C	1	0,8422 to 1,158	Yes	0,0001
Contrôle (25°C) vs. 34°C	1	0,8422 to 1,158	Yes	0,0001

Annexe 5 : Calculs de l'expression relative des gènes par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$

Calculs pour les stades St17-19 exposés

	Sample Name	Target Name	Moyenne DNMTs CT	Moyenne Beta-actin CT	ΔCT DNMT3AV1-Beta-actin = ΔCT	ΔCT Echantillon - ΔCT Echantillon de référence = $\Delta\Delta CT$	Fold Change
S1	St17-19-16°C-6h	DNMT3AV1	30,84384282	17,9295483	12,91429456	-0,001595815	1,001106747
S2	St17-19-25°C-6h		29,91068014	16,9947898	12,91589038	0	1
S3	St17-19-34°C-6h		29,24528631	18,6055597	10,63972664	-2,276163737	4,843882055
S1	St17-19-16°C-6h	DNMT3BV3	27,68732643	17,9295483	9,757778168	-0,097747167	1,070101146
S2	St17-19-25°C-6h		26,85031509	16,9947898	9,855525335	0	1
S3	St17-19-34°C-6h		26,82686361	18,6055597	8,22130394	-1,634221395	3,104199749

Calculs pour les stades Gastrula exposés

	Sample Name	Target Name	Moyenne DNMTs CT	Moyenne Beta-actin CT	ΔCT DNMT3AV1-Beta-actin = ΔCT	ΔCT Echantillon - ΔCT Echantillon de référence = $\Delta\Delta CT$	Fold Change des DNMT3A-V1
G1	G-16°C-6h	DNMT3AV1	35,1570549	25,2885653	9,86848958	-1,7726841	3,4168907
G2	G-25°C-6h		33,99475861	22,3535849	11,6411737	0	1
G3	G-34°C-6h		33,98645782	22,8695577	11,1169001	0,52427355	1,43820921
G4	G-16°C-24h		36,0851059	23,4419333	12,6431726	0,76692518	0,58766864
G5	G-25°C-24h		36,0851059	24,2088585	11,8762474	0	1
G6	G-34°C-24h		29,73111216	19,3935076	10,3376045	1,53864288	2,90521087

	Sample Name	Target Name	Moyenne DNMTs CT	Moyenne Beta-actin CT	Δ CT DNMT3BV3-Beta-actin = Δ CT	Δ CT Echantillon - Δ CT Echantillon de référence = $\Delta\Delta$ CT	Fold Change des DNMT3B-V3
G1	G-16°C-6h	DNMT3BV3	27,84010633	22,0149536	5,82515272	0,03923543	0,97317055
G2	G-25°C-6h		28,29046567	22,5045484	5,78591728	0	1
G3	G-34°C-6h		29,23114459	22,978405	6,25273959	0,46682231	0,72355656
G4	G-16°C-24h		26,55559858	18,4704024	8,08519618	1,79418818	0,28833379
G5	G-25°C-24h		27,15709496	20,866087	6,291008	0	1
G6	G-34°C-24h		35,08345795	29,9151007	5,16835721	-	2,17746689