HAL
open science

Modification génétique des facteurs de transcription chez Phaeodactylum tricornutum

Romain Perdoux

To cite this version:

Romain Perdoux. Modification génétique des facteurs de transcription chez Phaeodactylum tricornutum. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02370974

HAL Id: dumas-02370974

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02370974v1

Submitted on 19 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS OUEST

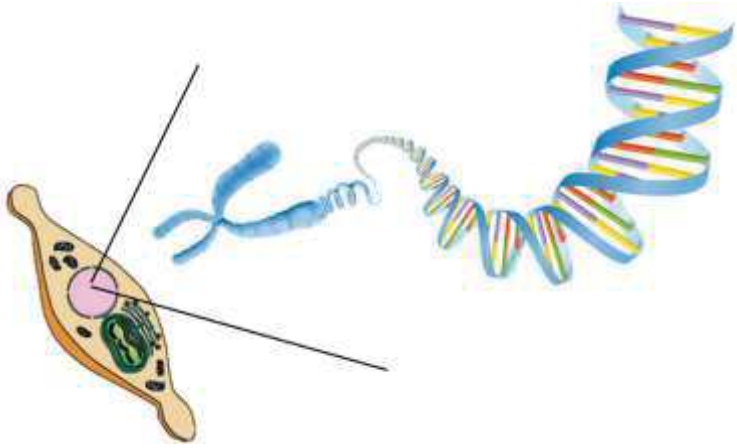
☐ CFR Angers

☑ CFR Rennes

Année universitaire : 2018-2019 Master Biologie, Agrosciences Parcours Amélioration, Production, Valorisation du végétal Option : Physiologie moléculaire et adaptation aux stress.	Rapport de stage ☐ 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)

Modification génétique des facteurs de transcription chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Par : Romain PERDOUX



Soutenu à Rennes le 26/06/2019
Devant le jury composé de :

Président : Marie-Françoise NIOGRET

Autres membres du jury (Antoine GRAVOT, Rapporteur)

Maître de stage : Justine MARCHAND et Matteo SCARSINI

Enseignant référent : Alain BOUCHEREAU

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1

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

AGROCAMPUS OUEST

☐ CFR Angers

☑ CFR Rennes

Année universitaire : 2018-2019 Master Biologie, Agrosciences Parcours Amélioration, Production, Valorisation du végétal Option : Physiologie moléculaire et adaptation aux stress.	Rapport de stage ☐ 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)

Modification génétique des facteurs de transcription chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Par : Romain PERDOUX

Soutenu à Rennes le 26/06/2019
Devant le jury composé de :

Président : Marie-Françoise NIOGRET Autres membres du jury (Antoine GRAVOT, Rapporteur)

Maître de stage : Justine MARCHAND et Matteo SCARSINI

Enseignant référent : Alain BOUCHEREAU

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1

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

Table des matières

I. Introduction 1
I.1 Le laboratoire d'accueil 1
I.2 Histoire des microalgues 1
I.3 La microalgue, une usine de fixation du CO_2 2
I.4 Intérêt biotechnologique, et application des microalgues 2
I.5 Le modèle utilisé, *Phaeodactylum. tricornutum* 3
I.6 Implication des facteurs de transcription dans la transcription des eucaryotes 4
I.7 Objectif du stage 4
II. Matériels et méthodes 5
II.1 Analyse des données de séquençage ARN 5
II.2 Culture des microaglues 5
a) Les milieux de culture 5
b) La mise en culture 5
c) Extraction des ARNs totaux et transcription inverse 6
II.3 Constructions plasmidiques pour les techniques de sur et sous-expression 6
a) Description du plasmide utilisé 6
b) Recherche et manipulation des séquences géniques 7
c) Design des amorces d'amplification pour les techniques de sur et sous-expression 7
d) Amplification et purification des fragments 7
e) Restriction du plasmide, de l'insert et ligation 8
II.4 Constructions plasmidiques pour le knock-out 9
a) Description du plasmide utilisé 9
b) Restriction du plasmide Cas9 9
c) Design et hybridation des oligonucléotides 9
d) Ligation de l'insert dans le plasmide coupé 10
II.6 Vérification des constructions plasmidiques et multiplication des plasmides construits 10
a) Réalisation de bactéries compétentes 10
b) Transformation bactérienne 10
c) Vérification des plasmides contenus dans les colonies bactériennes 11
d) Multiplication et extraction des plasmides 11
e) Analyse des données de séquençage 11
II.7 Techniques de transformation de *Phaeodactylum tricornutum* 12
a) Techniques d'électroporation 12
b) Technique de conjugaison 12
III. Résultats 13
III.1 Sélection des facteurs de transcription 13

III.2 Extraction des ARNs totaux et transcription inverse 13
a) Les ARNs totaux 13
b) Transcription inverse 14
III.3 Amplifications des segments géniques 14
a) Amplification des fragments de surexpression et sous-expression 14
b) Purification et amplification des fragments 14
III.4 Recherche, isolation et séquençage des plasmides 14
a) Le criblage de plasmides recombinés en sur et sous-expression 14
b) Le criblage des plasmides recombinés pour la technique de conjugaison 14
c) Isolation des plasmides recombinés 14
d) Séquençage des plasmides 15
III.5 Les transformations 15
IV. Discussion 15
IV.1 Sélection des FTs à partir des données de séquençage des ARNs. 15
IV.2 Réalisation des plasmides recombinés induisant des modifications génétiques 17
IV.3 Les transformations 18
V. Conclusion 19
VI. Bibliographie 20

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribo-Nucléique
ARN : Acide Ribo-Nucléique
BET : Bromure d'éthidium
β-ME : Beta Mercapto-Ethanol
CCCH : Cysteine 3 Histidine
CCM : Carbon Concentration Metabolism
CO_2 : dioxyde de carbone
COMPL : Séquence complémentaire
CPI : Complexe de Pré-Initialisation de la transcription
DHA : Docosahexaénoique
DO : Densité optique
E.coli : *Escherischia coli*
EPA : Eicosapentaénoïque
FT : Facteur de Transcription
FTIR : Infra Rouge à Transformée de Fourier
HSF : Heat Shock Factor
HTH : Helix Turn Helix
K : Potassium
KO : Knock-Out
L : Litre
LA : Long Amplification
Mg^{2+} : Magnésium
MIMMA : Métabolisme, bio-Ingénierie des Molécules de Microalgues et Applications
mL : millilitre
MMS : Mer, Molécule, Santé
MYB : Myéloblastome
NHEJ : Non-Homologous End-Joining
NLS : Signal de localisation nucléaire
OE : Overexpression (Surexpression)
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
OriT : Origine de Transfert
PAM : Protospacer Adjacent Motif
Pb : Paires de Bases
Pt : *Phaeodactylum tricornutum*
RNase : Ribonucléase
RNAseq : Séquençage ARN
rSAP : Shrimp Alkaline Phosphatase (Alkaline Phosphatase de crevette)
RT : Room Temperature (Température ambiante)
SA : Acide salicylique
SI : Silencing (Sous-expression)
TAZ : Transcription Adaptator putative Zinc finger
TS : Target sequence (séquence cible)
µL : microlitre

I. Introduction

I.1 Le laboratoire d'accueil

Le laboratoire Mer, Molécule, Santé (MMS) m'a accueilli pour mon stage de fin d'étude. C'est au sein de l'équipe MIMMA (Métabolisme, bio-Ingénierie des Molécules de Micro-algues et Applications) que ce stage de recherche s'est déroulé entre le 7 Janvier et le 28 Juin 2019.

L'équipe MIMMA étudie les mécanismes contrôlant le métabolisme du carbone chez les microalgues, en particulier en réponse aux stress abiotiques. Ces organismes réagissent aux conditions de stress en modifiant leur métabolisme vers la production de métabolites tels que des lipides et des caroténoïdes. Les compétences de l'équipe s'étendent de l'étude du transcriptome à la physiologie des microalgues en passant par la protéomique et l'analyse des métabolites lipidiques et des pigments.

Ce stage s'insère également au sein de la thèse de Mattéo Scarsini ayant pour but d'étudier l'implication des facteurs de transcription dans la réorientation métabolique chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* (*Pt*).

I.2 Histoire des microalgues

L'hypothèse d'endosymbiose proposée par Lynn Margulis est à la base de l'histoire de la microalgue (Lazcano, Peretó, 2017). Il y a 1,8 milliards d'années, un organisme photo-autotrophe similaire aux cyanobactéries actuelles, aurait été phagocyté par une cellule hétérotrophe. Le procaryote photosynthétique phagocyté n'a pas été entièrement digéré mais domestiqué par la cellule hétérotrophe via des phénomènes de perte et d'échange de gènes, de remaniements structuraux et de communication avec la cellule hôte. C'est ainsi que l'organite emblématique du règne végétal, le chloroplaste aurait vu le jour. Trois lignées de microalgues auraient ensuite vu le jour (Delwiche, 1999) : les glaucophytes, les rhodophytes (algues rouges), et les chlorophytes (algues vertes). Les chlorophytes sont les microalgues desquelles les organismes photosynthétiques terrestres auraient divergés il y a 900 millions d'années (Hedges et al., 2004).

De nos jours, il existe une grande diversité de microalgues Cela proviendrait d'une série d'endosymbioses secondaires, tertiaires ou encore quaternaires, même si l'ordre et le nombre de ces endosymbioses n'est pas encore défini (Keeling, 2013). La figue 1 retrace les principales endosymbioses et permet de résumer la longue histoire évolutive des microalgues (Figure 1). Les différentes endosymbioses sont encore visibles au niveau des membranes du chloroplaste. Bien qu'il existe des exceptions au niveau du nombre de membranes autour du chloroplaste, ces membranes témoignent des endosymbioses successives au cours de l'histoire de cet organisme eucaryote, unicellulaire et photosynthétique. En effet un chloroplaste issu d'une endosymbiose primaire ne sera entouré que par les deux membranes de l'organisme phagocyté de départ. Alors qu'un chloroplaste issu d'une endosymbiose secondaire, comme chez les diatomées, va être entouré par quatre membranes, les deux membranes de l'organisme phagocyté à l'origine, la membrane de l'algue phagocytée et la membrane phagosomale (McFadden, 1999).

Les diatomées font parties du groupe des algues brunes ou encore algues rouges, et selon les données elles semblent dériver d'une endosymbiose secondaire. Ce sont des microalgues du groupe des hétérocontes, dont la sous classe est celle des straménopiles. Elles sont nommées dans la littérature comme des « microalgues brunes » du fait de leur couleur. Cette couleur est due à un pigment, la fucoxanthine qui masque les pigments chlorophylliens de cet organisme photosynthétique. C'est le pigment accessoire majeur des diatomées (Devaki, Grossman, 1993). Les diatomées sont aussi caractérisées par la présence d'une paroi cellulaire en silice, nommée frustule, même si chez certaines diatomées sa formation est facultative.

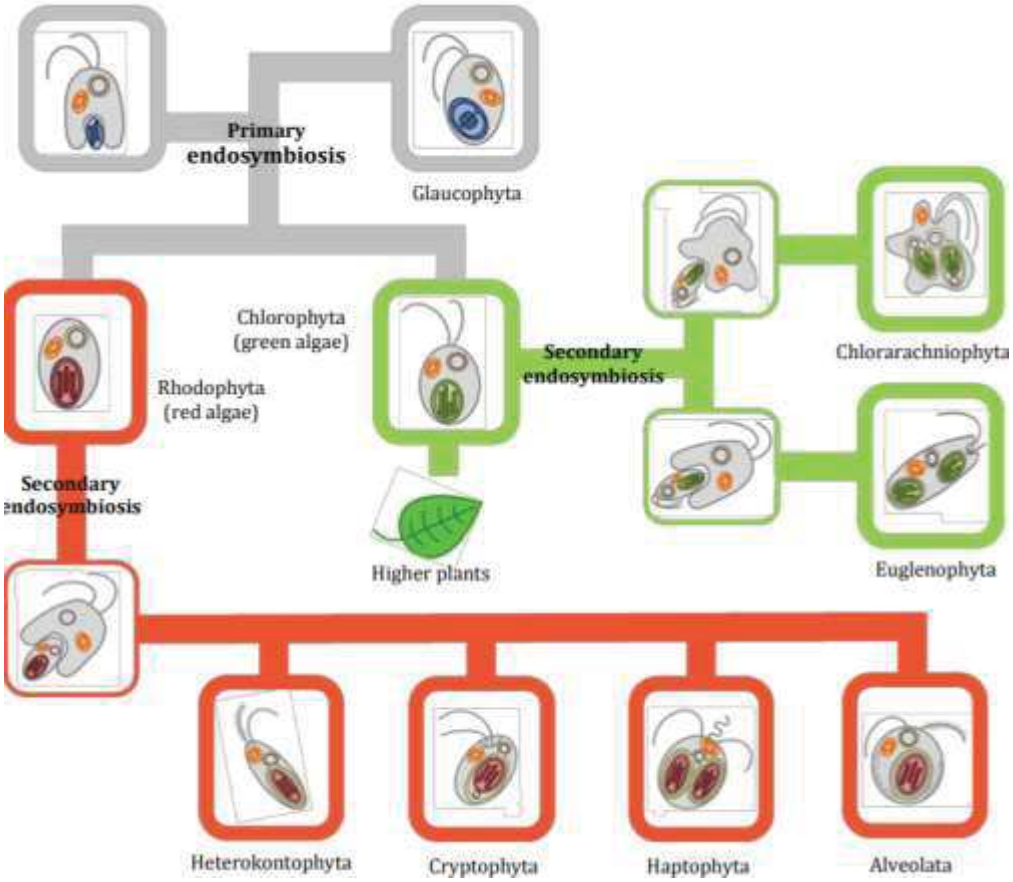


Figure 1 : Arbre schématique représentant les différentes endosymbioses donnant naissance aux microalgues (Heydarizadeh, 2015).

I.3 La microalgue, une usine de fixation du CO_2

Les microalgues sont considérées comme faisant partie d'un grand groupe, celui du phytoplancton. Ce groupe ne représente que seulement 1% de la biomasse photosynthétique sur Terre, mais joue un rôle majeur dans le bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques. En effet, le phytoplancton est impliqué dans 45% de la production primaire de la planète et dans plus de 90% de celle des milieux aquatiques (Geider et al., 2001). La microalgue est un organisme autotrophe, c'est-à-dire qu'elle est capable de créer de la matière organique à partir de matière inorganique. Elle va donc fixer le dioxyde de carbone (CO_2), qui est un élément minéral et grâce à de l'énergie, ce CO_2 va entrer dans le métabolisme afin d'alimenter les différentes voies métaboliques. La microalgue étant un organisme phototrophe, elle tire l'énergie nécessaire à son fonctionnement de l'énergie lumineuse qu'elle va transformer en énergie chimique. Ces organismes sont capables de fixer une grande partie du CO_2 atmosphérique, et requièrent une quantité d'eau plus faible que les arbres pour la même quantité de carbone fixée (Chelf et al., 1993). Il existe de nombreux groupes de microalgues, mais les plus abondantes dans le milieu océanique sont les diatomées. Elles participeraient à la fixation de 20% du carbone atmosphérique via leur activité photosynthétique (Field, 1998). C'est grâce à son mécanisme de concentration du carbone (CCM) que cet organisme fixe le carbone (Haimovich-Dayan et al., 2013). Ce métabolisme concentre le CO_2 autour de l'enzyme clé, la RubisCo, permettant un rendement de conversion de l'énergie solaire en biomasse très élevé, bien supérieur à celui des plantes terrestres (Cadoret, Bernard, 2008). Ce qui rend la microalgue d'un grand intérêt pour la production en grande quantité de molécules à haute valeur ajoutée et en fait un organisme d'intérêt pour la lutte contre le réchauffement climatique.

I.4 Intérêt biotechnologique, et application des microalgues

Grâce à leur évolution longue et complexe, les microalgues se sont diversifiées de par leur forme, et leur métabolisme. En effet il en existe des sphériques, ovoïdes, fusiformes, cylindriques, pyramidales, et elles sont capables de coloniser de nombreux milieux différents, même des milieux extrêmophiles (Schonknecht et al., 2013). Leur métabolisme très diversifié est source de nombreuses molécules d'intérêt pour les différentes industries (Figure 2) (Koller et al., 2014).

Les microalgues sont très utilisées dans le domaine de la nutrition animale, notamment en aquaculture, car elles permettent un apport optimal d'acides aminés essentiels, vitamines et acides gras poly-insaturés à longue chaîne (Brown et al., 1997). Aucun régime de substitution n'est aussi performant. La consommation de microalgues est cependant freinée par le cout de production restant élevé, car il faudrait produire de grosses quantités de microalgues afin de l'utiliser en tant que fourrage ou en aliment principal. Les microalgues sont utilisées en tant que complément alimentaire du fait de la forte teneur en protéines et lipides, notamment en acide éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoique (DHA), qui ne sont pas synthétisés par notre organisme (Mendes et al., 2009). Aujourd'hui en France, seulement trois microalgues sont utilisées et autorisée par la règlementation en vigueur. Il s'agit de la spiruline (en réalité une cyanobactérie mais dont le fonctionnement est similaire à celui d'une microaglue), *Chlorella vulagaris* et *Ondontella aurita*.

Dans le domaine de la santé, les microalgues sont aussi d'un grand intérêt, du fait des nombreux métabolismes existants et donc des nombreuses molécules qui en découlent. Elles sont capables de produire des molécules d'une grande diversité dont certaines intéressantes pour l'industrie de la santé. Des composés trouvés communément au sein des microalgues présentent des propriétés anti-bactériennes, anti-fongicides et même anti-oxydantes (Arun et al., 2012). Des composés comme l'astaxanthine, un caroténoïde à haute valeur ajouté, se présente comme ayant des propriétés dans la lutte contre le cancer, les maladies cardiovasculaires, gastro-intestinales, le diabète et présente même une action anti inflammatoire et anti-oxydante (Gateau et al., 2017 ; Yuan et al., 2011).

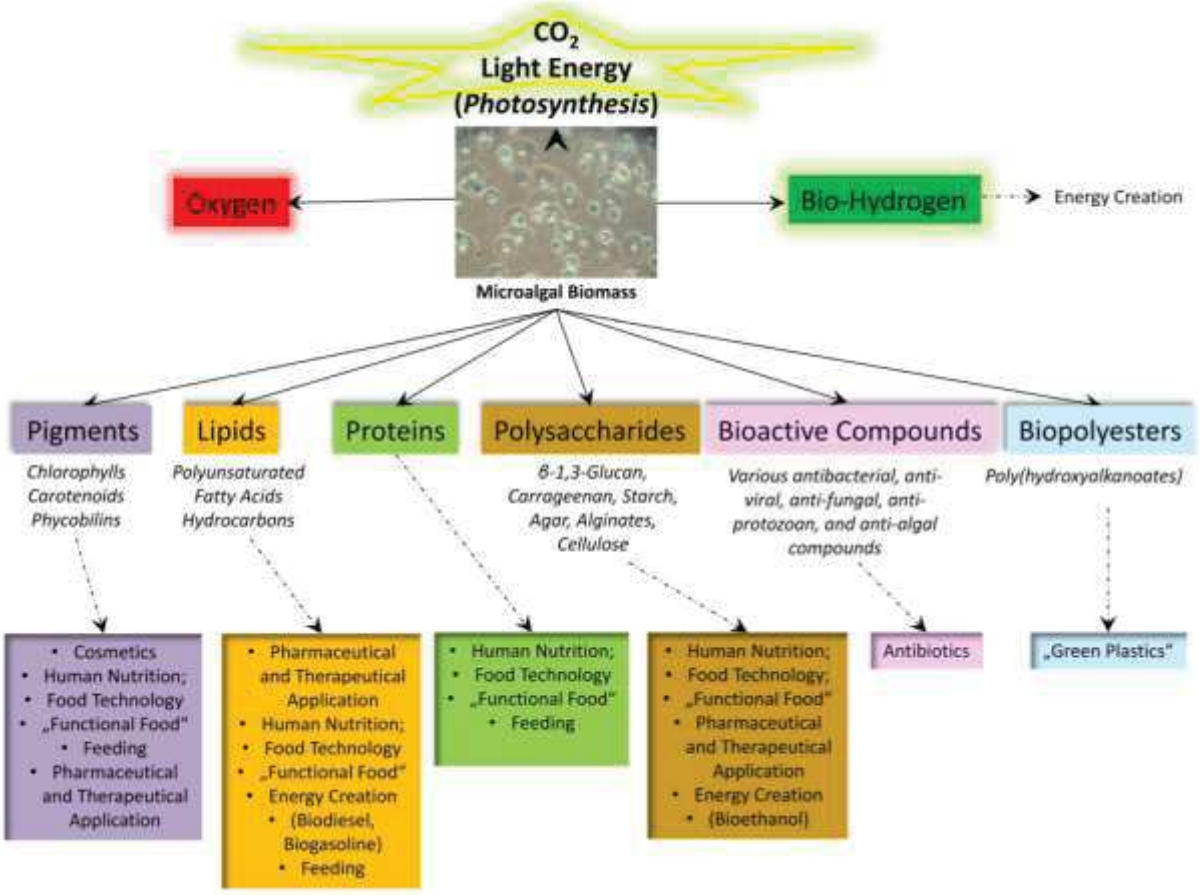


Figure 2 : Vue d'ensemble des différents composés produits par les microalgues, et leurs secteurs d'application (Koller et al., 2014).

La microalgue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est également utilisée pour la production de protéines recombinantes qui conduisent à la production d'anticorps monoclonaux à simple chaine humain de type IgA (Mayfield, Franklin, 2005). Ils sont dits monoclonaux car ils ne reconnaissent qu'un épitope donné. Les IgA sont très utilisés en biologie et en médecine comme outils de diagnostic et aussi à but thérapeutique. Cette nouvelle alternative de production d'anticorps via une microalgue permet une réduction des coûts de production et, pour des raisons d'éthiques évite leur production par le modèle animal. La facilité à éditer du génome de cette algue la rend très attractive pour de nombreuses applications (Cadoret et al., 2012).

Les microalgues sont aussi utilisées dans une optique de protection de l'environnement via la bio-remédiation. En effet, elles ont développé au cours de leur évolution plusieurs mécanismes d'absorption, qui leur permettent de se développer dans des milieux pollués et même de participer à leur dépollution. Dans un milieu contenant 50µM de cadmium, une souche de *Chlorella*, une microalgue marine verte, se montre comme étant capable d'absorber 48,7% du cadmium total. Après 12 jours d'incubation 67% du cadmium absorbé est séquestré dans la cellule et 25% est adsorbé sur la surface de la membrane de l'algue (Matsunaga et al., 1999). Les microalgues se retrouvent impliquées dans de nombreux processus de décontamination des eaux usées en absorbant les toxines, les pesticides, ou encore les composés radioactifs (Abdel-Raouf et al., 2012 ; Rath, 2012).

La production de biocarburants par les microalgues est un secteur en plein essor. Les triglycérides produits par les microalgues servent pour la production de biodiesel. L'amidon lui va être utilisé dans la production de bioéthanol, et la microalgue est même utilisée dans la production de biogaz par méthanisation. Les biocarburants issus de microalgues, sont regroupés dans les biocarburants de 3ème génération. Ces organismes possèdent des rendements de production de biomasse et d'huile par hectare qui sont bien supérieurs à ceux réalisés par les plantes terrestres, ce qui rend leur utilisation pour la production de biocarburants très prometteuse et avantageuse (Cadoret, Bernard, 2008). L'extraction des lipides ou autres composés par broyage mécanique puis par séparation et purification sont des étapes très couteuses et induisent des pertes de matériaux, ce qui rend le biocarburant produit au final encore coûteux par rapport aux prix du marché des carburants fossiles. Afin de faire baisser les coûts et donc les prix finaux, plusieurs voies de recherche sont envisagées. La première consiste à développer des techniques d'extraction des lipides beaucoup moins coûteuses que les techniques actuelles. Les étapes les plus coûteuses dans ce processus sont la récolte des microalgues par centrifugation, le séchage et le broyage mécanique. Deuxièmement des études de criblage de la diversité naturelle des microalgues peuvent être réalisées, afin d'essayer de trouver des souches qui produisent naturellement plus de lipides, ou des souches plus ou moins sensibles aux stress abiotiques (Taleb, 2015). La troisième voie d'augmentation de la quantité de lipides est la définition des conditions de culture. Il est prouvé que les conditions de culture influent sur la composition et la quantité lipidique au sein des microalgues, notamment les carences comme la carence azotée (Msanne et al., 2012). La dernière voie d'amélioration est l'ingénierie génétique. C'est cette voie qui est investiguée au sein de l'équipe MIMMA du laboratoire MMS. La caractérisation d'acteurs géniques jouant sur la quantité de lipides en réponse à une carence ou au sein de souches hyperaccumulatrices permettrait par la suite de développer des organismes génétiquement modifiés avec la capacité de produire des quantités de lipides bien supérieures aux souches naturelles.

I.5 Le modèle utilisé, *Phaeodactylum. tricornutum*

Lors de ce stage, c'est la diatomée *Pt* qui a été utilisée. Cette microalgue est une diatomée pennée et se présente sous forme triradiée, ovale ou fusiforme, d'environ 2 µm à 1 mm (Figure 3). C'est une microalgue considérée comme un organisme modèle car son génome est séquencé (Bowler et al., 2008). Elle est très utilisée en recherche, notamment en biotechnologies (Daboussi et al., 2014) et également pour comprendre le cycle global du carbone (Kroth et al., 2008). De nombreuses données transcriptomiques sont disponibles pour

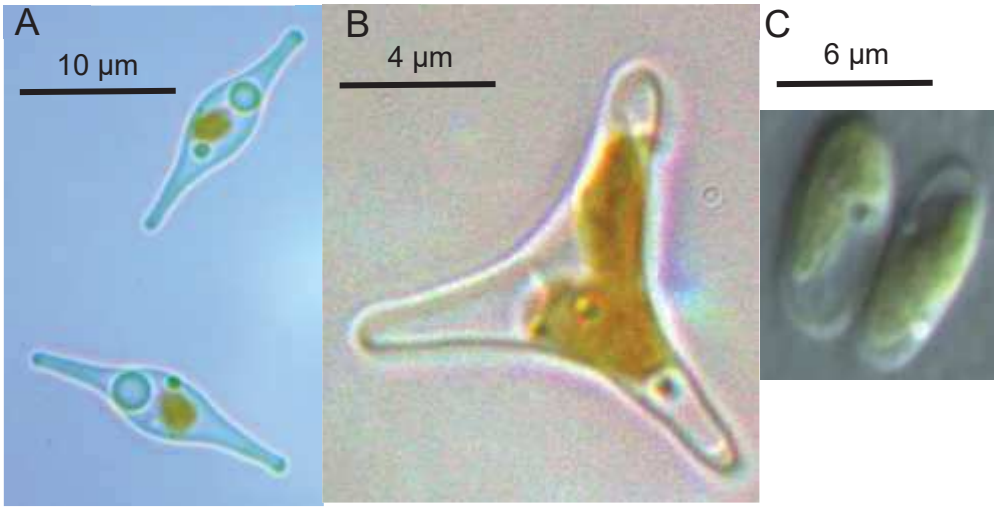


Figure 3 : Photographies des différentes formes de Phaeodactylum tricornutum. (A) *Pt* fusiforme. (B) *Pt* triradiée ou tricornée. (C) *Pt* ovoïde.

cet organisme (Kroth et al., 2008 ; Rastogi et al., 2018) ainsi que de nombreux outils de transformation (Karas et al., 2015 ; Miyahara et al., 2013 ; Zaslavskaia et al., 2000).

I.6 Implication des facteurs de transcription dans la transcription des eucaryotes

A la base de la réorientation métabolique il y a les facteurs de transcription. Ce sont des protéines impliquées dans les phénomènes d'initiation ou de régulation de la transcription d'un gène. Ces protéines interagissent avec l'ADN et l'ARN polymérase. L'ADN étant une molécule contenant toutes les informations d'un organisme, sa lecture aboutie à l'expression de gènes et par la suite à l'expression de protéines fonctionnelles. Cette lecture du génome est réalisée par des ARN polymérases, qui vont permettre la première étape dans l'expression d'un gène, la transcription.

Les facteurs de transcription sont des activateurs ou répresseurs du complexe transcriptionnel formé autour de l'ARN polymérase et qui agissent en se fixant à des séquences régulatrices présentes sur la séquence d'ADN en amont des gènes à transcrire. Chez les eucaryotes la transcription est assurée par 3 ARN polymérase principales impliquées dans la transcription de classes de gènes différentes (Haag, Pikaard, 2011). L'ARN polymérase la plus étudiée est l'ARN polymérase II. Elle assure la transcription des ARN messagers (Kornberg, 2007), et donc la production de protéines fonctionnelles. La transcription dépend pour cette polymérase de la présence d'un complexe multi-protéique, le complexe de pré-initialisation de la transcription (CPI). La polymérase ne reconnaît pas le promoteur c'est le CPI qui a ce rôle. Le CPI est composé de facteurs de transcription (FTs) généraux, car ils interviennent dans la transcription de tous les gènes ciblés par l'ARN polymérase II.

Les FTs généraux sont ceux qui vont être impliqués dans la transcription de nombreux gènes, mais la cellule doit activer la transcription de gènes particuliers de façon rapide lors d'un changement brutal de son environnement, comme un changement de la composition de son milieu. Cette réponse spécifique est assurée par des FTs, ou encore facteurs Trans, du fait qu'ils interagissent avec une séquence Cis de l'ADN. Ces FTs sont composés par un domaine de liaison à l'ADN, présent en une seule ou plusieurs copies (Charoensawan et al., 2010) et par un domaine d'interaction protéine-protéine. La grande diversité de domaine de liaison à l'ADN permet de classer les FTs. Chaque famille se caractérise par une séquence protéique conservée au sein de son site de liaison à l'ADN.

Pt se montre comme étant une candidate de bonne qualité afin de mener des recherches sur des facteurs de transcription impliqués dans la réorientation métabolique des flux carbonés pour induire la formation de lipides. De plus des études sur les FTs impliqués dans l'accumulation de lipides chez les microalgues ont déjà été réalisées (Rayko et al., 2010 ; Thiriet-Rupert, 2017). Afin d'étudier les facteurs de transcription impliqués dans cette réorientation métabolique, il faut l'induire chez la microalgue. Il est connu depuis plusieurs années qu'un stress, comme le stress azoté est capable d'induire cette réorientation métabolique et permet une suraccumulation de lipides au sein de la microalgue (Illman et al., 2000 ; Miller et al., 2010). La compréhension de l'impact de ce stress sur la microalgue et le processus de réorientation métabolique qui en découle permettra par la suite de produire une quantité plus importante d'huile de microalgue, ce qui pourra faire de cet organisme un matériel de choix pour les différentes industries qui utilisent les huiles végétales comme matière première.

I.7 Objectif du stage

Ce stage de recherche s'insère dans la thèse de Mattéo Scarsini. Celle-ci porte sur la recherche des FTs impliqués dans la réorientation métabolique chez la microalgue *Pt*.

Lors de sa thèse Mattéo Scarsini a réalisé une expérimentation de culture de *Pt* en photobioréacteur pendant 2 mois. De nombreuses données ont été produites pendant cette expérimentation. Une partie de ces données fait l'objet de ce stage. Pendant 15 jours la culture a été maintenue en milieu F/2 classique puis carencée en azote. Des prélèvements ont été

effectués quotidiennement afin de suivre la croissance des microalgues, la quantité de protéines, de nitrate, de lipides, de carbohydrates, la concentration en CO_2 et en O_2, la quantité d'ARN, de chlorophylle a et c, la quantité de caroténoïdes, la concentration en azote et carbone (Figure 4). Les résultats indiquent, comme attendu, que la quantité de lipides augmente au cours de l'expérimentation. Les prélèvements réalisés chaque jour ont permis d'effectuer une extraction des ARNs totaux. Ces ARNs ont ensuite été lyophilisés pour être conservés et envoyés à la plateforme de séquençage Annoroad (Chine).

Les objectifs de ce stage ont été :

1) De travailler sur les données de séquençage des ARN afin de sélectionner les FTs présentant une expression différentielle marquée.
2) De construire les plasmides recombinés pour différentes méthodes de recombinaison génétique.
3) De réaliser une transformation des microalgues afin d'étudier l'effet d'un changement d'expression de ces FTs.

II. Matériels et méthodes

II.1 Analyse des données de séquençage ARN

Les données de séquençage ARN (RNAseq) ont été traitées par Mattéo Scarsini. Afin de mettre en évidence les variations d'expression de tous les gènes au cours de l'expérience. L'objectif de ce stage a été, dans un premier temps de mettre en évidence l'expression différentielle uniquement des FTs et d'en faire ressortir des candidats potentiels pour réaliser des mutants.

Un traitement bio-informatique, par l'outil WGCNA, pour Weighted Correlation Network Analysis a également été effectué avec les données de RNAseq (Langfelder, Horvath, 2008). Cet outil permet de classer les différents gènes par leur profil d'expression selon différents clusters, et de corréler leur expression avec le changement des variables mesurées au cours de l'expérience. Seuls les gènes ayant une corrélation forte pour la même variable vont composer le même cluster, que cette corrélation soit positive ou négative. Les deux variables les plus intéressantes pour notre projet sont les lipides et le ratio N/C. L'outil génère une matrice de corrélation des clusters avec les variables et ne sont retenus que ceux qui ont une forte corrélation avec les variables souhaitées. Dans ces clusters sont recherchés les facteurs de transcription qui ont été retenus précédemment afin d'effectuer une sélection plus fine.

II.2 Culture des microalgues

a) Les milieux de culture

Les FTs sélectionnés étant sur ou sous-exprimés en condition de carence azotée, il est nécessaire de réaliser l'extraction des ARNs totaux en milieu carencé et non carencé afin d'amplifier les gènes codant les FTs. La souche Pt1 a donc été cultivée dans les 2 milieux de culture F/2 (Annexe 1 et 2). Le milieu N^- a relativement la même composition que le milieu N^+, les sources d'azote étant éliminées dans le milieu N^-. L'azote n'étant présent que dans le KNO_3, c'est ce composant qui est retiré de la préparation du milieu, mais cela implique aussi que le potassium (K) soit retiré du milieu. La perte de K est compensée par un apport de KCl.

b) La mise en culture

Les milieux N^+ et N^- sont ensemencés avec la souche Pt1 de *Pt* et sont mis en salle de culture à 21°C sur un plateau d'agitation, avec une photopériode de 12 heures. Quand la densité cellulaire est suffisante, une partie de cette culture est prélevée afin de réaliser une culture de 150 mL à une densité optique à 735 nm de 0,3 (soit environ $5*10^8$ cellules/mL). Les cultures

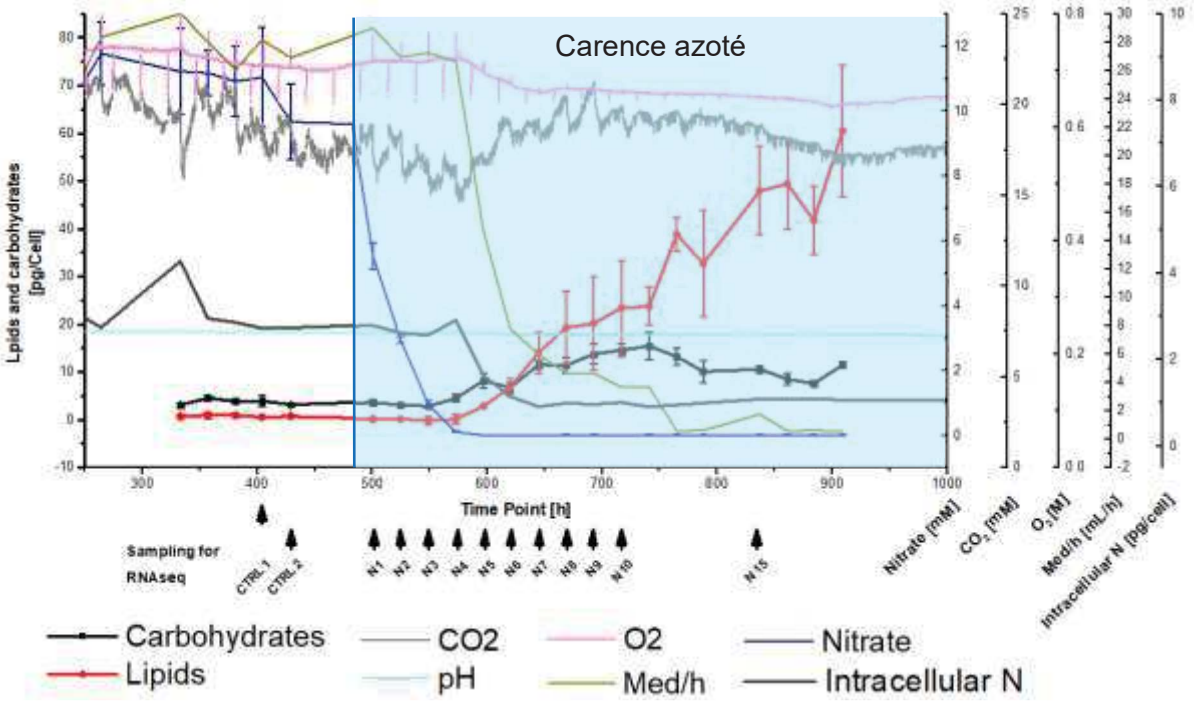


Figure 4 : Graphique d'évolution des variables d'une culture de Phaeodactylum tricornutum en bioréacteur suite à une carence azoté. Les variables suivies sont les carbohydrates, les lipides, le pH, la consommation de milieu, la concentration en CO_2, en O_2 et en nitrate dans le milieu, ainsi que la concentration en azote intracellulaire.

de 150 mL dans les deux conditions sont mises en salle de culture sous agitation pendant 5 jours, et les ARNs totaux extraits.

c) Extraction des ARNs totaux et transcription inverse

L'extraction des ARN totaux a été réalisée grâce au Kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich®). 20 mL de la culture sont prélevés puis centrifugés à 4500 rotation par minute (rpm) pendant 10 minutes. Le culot resuspendu dans 1 mL est centrifugé à 16 000 G pendant 5 minutes. Il est broyé mécaniquement dans un agitateur à bille (Bead Beater) à l'aide de microbilles de verre et de la solution de lyse complémentée avec du β-Mercapto éthanol (β-ME). Ce composé permet d'éliminer les ribonucléases (RNases) relâchées par les cellules. Le surnageant a été transféré dans une colonne de filtration et centrifugé 1 min afin d'éliminer les débris résiduels. 750 µL de solution d'accrochage (Binding Solution) a été ajouté dans le lysat clarifié et mélangé par pipetage. Le tout a été passé au travers d'une colonne d'accrochage (binding column) retenant les ARN après centrifugation. Après lavage avec 300 µL de solution de lavage (Wash Solution I), 80 µL de solution de DNase (10 µL DNase I + 70 µL tampon de digestion) ont été ajoutés directement sur la colonne et incubé 15 min à température ambiante afin d'ôter les traces d'ADN génomique. La colonne a été lavée successivement avec 2 solutions de lavage (Wash Solution I et Wash Solution II diluée dans éthanol), puis séchée par centrifugation. 50 µL de solution d'élution ont ensuite été ajoutés à la colonne, incubés 1 min à 4°C, centrifugés puis l'échantillon est conservé à -80°C.

La quantité et la pureté des extraits ARN ont été déterminées au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000c, en mesurant l'absorbance à 260 nm (une unité d'A_{260nm} correspond à 40 µg d'ARN/ml), 280 nm (contamination protéique) et 230 nm (contamination par les solvants utilisés). Un rapport A_{260nm} /A_{280nm} compris entre 1,8 et 2,2 indique une pureté suffisante pour les manipulations suivantes. Un ratio A_{260nm} /A_{230nm} supérieur au ratio précédent est synonyme d'une bonne pureté.

La transcription inverse a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARNm présents dans les ARN totaux. 1 µg d'ARN totaux ont été mélangés avec 250 ng d'amorces oligo$(dT)_{15}$ et 250 ng d'amorces aléatoires (random primers), ajusté à 12,25 µL avec de l'eau RNase-free. L'ensemble a été incubé à 70°C pendant 5 min afin de dénaturer les ARN, puis placé sur la glace. Aux 12,25 µL précédents ont été ajoutés : 5 µL de tampon MMLV 5X, 6,25µL de dNTP (2 mM), 20 U RNAsin® inhibiteur et 200 U transcriptase inverse (MMLV RT, Promega®), ajusté à 25 µL avec de l'eau RNase-free. Le milieu réactionnel a été incubé à 37°C pendant 90 min pour permettre de synthétiser les brins d'ADNc, puis à 70°C pendant 5 min afin de bloquer les activités enzymatiques. Les ADNc ont été conservés à -20°C.

II.3 Constructions plasmidiques pour les techniques de sur et sous-expression

a) Description du plasmide utilisé

Le plasmide pPha-T1 (Zaslavskaia et al., 2000) (Figure 5) est utilisé pour transformer *Pt.* Il possède :

- Un promoteur endogène fcpA nécessaire à l'expression du fragment ou gène d'intérêt dans la microalgue.
- Une boîte MCS (Multiple Cloning Site). Cette boîte se caractérise par la présence de nombreux sites uniques de restrictions, ce qui permet l'insertion des fragments d'intérêts derrière le promoteur.
- Un terminateur fcpA, permettant la terminaison de la transcription du fragment.
- Un promoteur endogène couplé au gène sh ble, donnant la résistance à la Zéocine. La Zéocine est une formulation d'un antibiotique glycopeptidique (la phléomycine D1) avec une des phléomycines de *Streptomyces verticillus* appartenant à la famille des

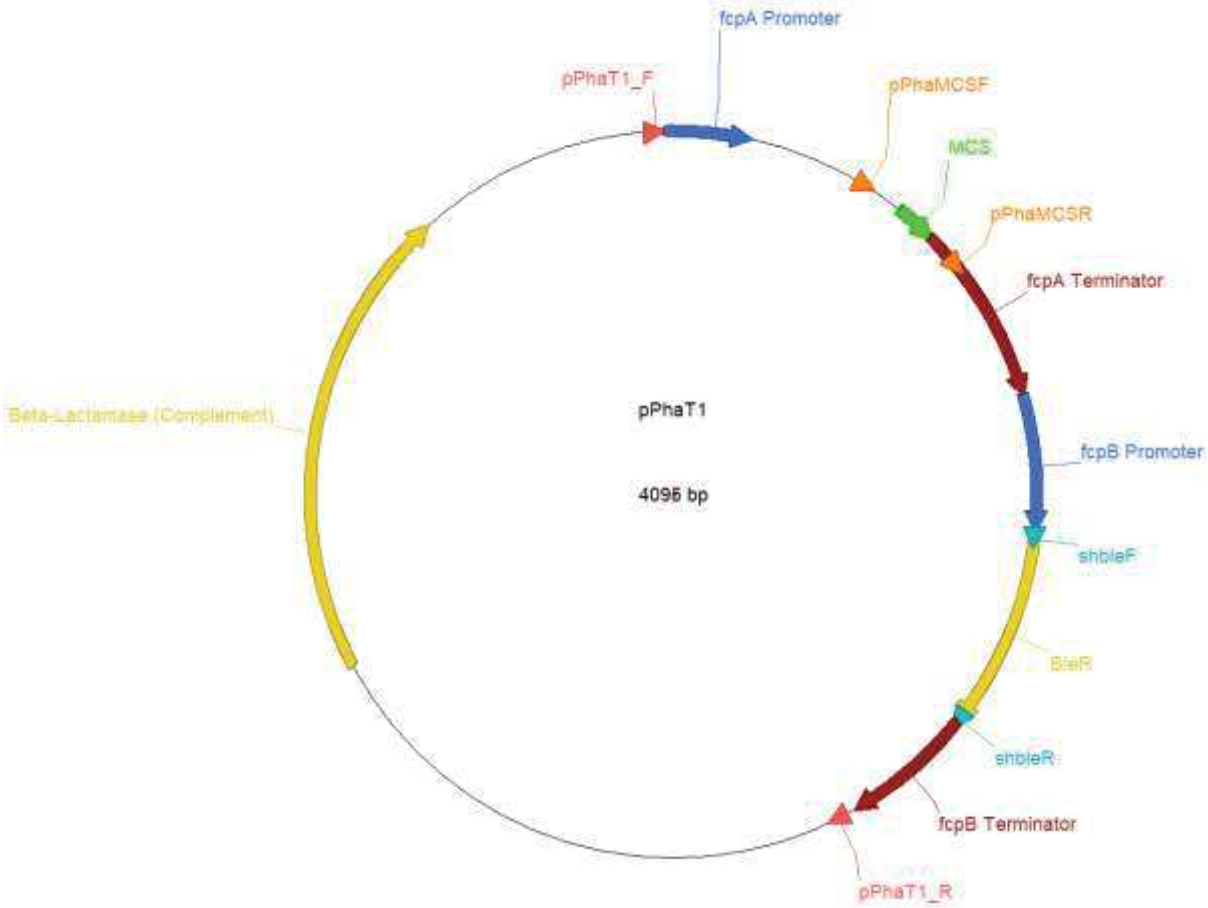


Figure 5 : Carte du plasmide pPha-T1. Ce plasmide est composé d'un promoteur et un terminateur fcpA entourant la boîte MCS. Un gène de résistance à la zéocine (BleR) encadré par un promoteur et un terminateur fcpB. La résistance à l'ampicilline est réalisée par le gène de la bêta-lactamase (Zaslavskaia et al., 2000). Les différentes amorces sont aussi disponibles sur cette carte.

- antibiotiques bléomycine. Ce gène permet la sélection des microalgues transformées dans un milieu contenant cet antibiotique.
- Un gène de résistance à l'ampicilline, ce fragment génique est formé de telle façon à ce qu'il ne soit exprimé que dans les bactéries. Cela permet la transformation de bactéries, et une sélection simplifiée des mutants ayant intégrés le plasmide.

b) Recherche et manipulation des séquences géniques

Les séquences des gènes des FTs sélectionnés sont recherchées sur la base de données Ensembl (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Search/New?db=core). C'est uniquement la séquence codante du FT qui est utilisée. Les séquences des différents gènes sont manipulées avec le logiciel ApE (A plasmid Editor). Ce logiciel permet de rechercher des séquences dans le gène et détecte les sites de restriction potentiels. Les cartes simplifiées de plasmides ou de gènes peuvent aussi être effectuées.

c) Design des amorces d'amplification pour les techniques de sur et sous-expression

➢ Technique de surexpression :

Environ 20 nucléotides sont sélectionnés au début du premier exon, afin de dessiner l'amorce Forward. Cette séquence doit être unique dans la séquence codante afin d'éviter les amplifications aspécifiques. Pour l'amorce Reverse, le même principe est appliqué mais sur les derniers nucléotides du dernier exon et de manière complémentaire (Figure 6A).

Sur chacune des amorces, afin de permettre l'insertion dirigée du fragment amplifié par les amorces il est nécessaire de rajouter les sites de restriction en bout d'amorces (au début de l'amorce Forward et à la fin de l'amorce Reverse).

Le logiciel ApE possède les sites de restriction de plusieurs enzymes dans sa base de données, il est donc possible de vérifier quelles enzymes possèdent un site de restriction dans la séquence à amplifier. Le but est de sélectionner des sites de restriction étant présents dans la boîte MCS du plasmide et non dans la séquence codante du gène qui va être inséré. Un site en amont de la boîte MCS est placé sur l'amorce forward et un site en aval est placé sur l'amorce Reverse. De plus, pour stabiliser l'action des enzymes de restriction, il faut ajouter certains nucléotides supplémentaires pour permettre une bonne fixation de l'enzyme de restriction.

Les amorces ainsi dessinées doivent être contrôlées pour éviter une auto-dimérisation, un repliement en épingle à cheveux, ainsi qu'une formation d'hétérodimères entre les amorces. Le contrôle de ces structures est possible sur le site OligoCalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html), ainsi que sur le logiciel Primer Express de Applied Biosystems.

➢ Technique de sous-expression :

Le même protocole que précédemment est utilisé, à l'exception de la séquence à amplifier. Seulement 300 à 400 nucléotides dans la séquence codante sont sélectionnés pour être amplifiés (Figure 6B). De plus, il faut placer les sites de restriction de manière inverse par rapport à la technique précédente : le site en amont de la boîte MCS est placé sur l'amorce Reverse et celui en aval est placé sur l'amorce Forward.

d) Amplification et purification des fragments

Le mélange réactionnel de 50 µL se compose du tampon de la polymérase Phusion, de dNTPs, des amorces Forward et Reverse (décrites précédemment), de l'ADNc issu de *Pt* et de la polymérase Phusion. Le mélange est amené à 50 µL avec de l'eau dépourvue de nucléases. L'amplification se fait dans un thermocycleur, appareil permettant de réaliser des PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle commence par une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes. Puis 35 cycles composés de 3 étapes :

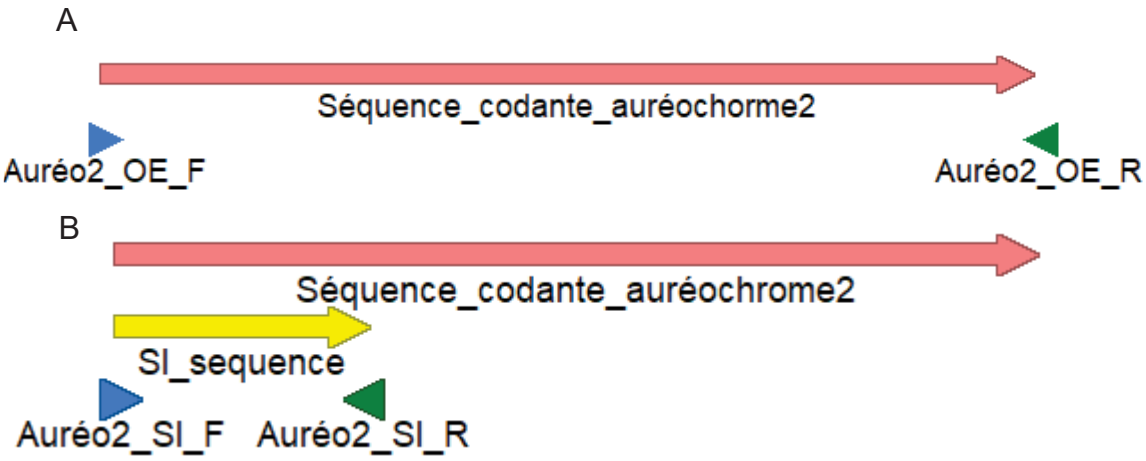


Figure 6 : Schéma de la cible des amorces Auréochrome 2 pour la méthode de sur et sous-expression. (A) Technique de surexpression. (B) Technique de sous-expression. L'amorce bleue a la même séquence que la séquence codante alors que la verte est la complémentaire de la séquence codante.

- La dénaturation (98°C pendant 10 secondes).
- L'hybridation des amorces (la température dépend du couple d'amorces).
- L'élongation (72°C, le temps de l'étape d'élongation est lui aussi variable, car il dépend de la taille du fragment à amplifier).

Les séquences sont disponibles tableau 1, et les températures d'hybridation des amorces ainsi que les tailles des amplifications servant à définir le temps d'amplification sont visualisables dans le tableau 2. Une extension finale à 72°C pendant 5 minutes est réalisée, puis les échantillons sont refroidis à 4°C.

La vérification de l'amplification des gènes se fait sur gel d'agarose 1% contenant du Bromure d'éthidium (BET). Seulement 2 µL du produit de PCR avec un tampon de chargement sont utilisés pour la vérification sur gel. Un puit est utilisé pour le marqueur de taille, permettant de discriminer des fragments entre 100 et 3 000 paires de bases (pb).

Quand les produits de PCR présentent des amplifications aspécifiques, les bandes des gels sont alors purifiés à l'aide du kit Gel and PCR clean up system (Promega). Les bandes sont découpées et solubilisées en chauffant à 65°C dans la solution d'accrochage. Le mélange placé dans une colonne de filtration est centrifugé, puis le filtre est lavé en plusieurs étapes par la solution de lavage lors de centrifugations. L'ADN retenu sur le filtre est alors élué avec de l'eau dépourvue de nucléases chauffée à 65°C. Les concentrations sont alors mesurées au Nanodrop™ 2000c. Les fragments purifiés sont alors utilisés pour l'amplification par PCR, afin d'augmenter leur concentration et éviter les amplifications aspécifiques survenant avec l'échantillon d'ADNc. Si l'amplification aspécifique est toujours présente malgré la PCR sur gel purifié, c'est alors le fragment du gel purifié qui est gardé pour la suite des expériences.

e) Restriction du plasmide, de l'insert et ligation

1 µg de plasmide et 5 µL du tampon adapté au couple d'enzyme sont mélangés. La sélection du tampon adapté au couple d'enzyme se fait grâce au logiciel NEBcloner (https://nebcloner.neb.com/#!/redigest). 10 unités des enzymes (XbaI, KpnI, BamHI, SalI, SphI et SbfI) sont ensuite ajoutées, et le volume final du milieu réactionnel est ajusté à 50 µL. L'Alkaline Phosphatase de crevette (rSAP) est aussi ajoutée afin de déphosphoryler l'extrémité 5' de l'ADN, et donc éviter une fermeture prématurée du plasmide. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure. Dans la majorité des cas la double restriction peut se réaliser en une seule réaction. Quand ce n'est pas possible (HSF 1.3b silencing), elle est réalisée en plusieurs étapes : première restriction, inactivation de l'enzyme et ajustement du tampon par une solution de NaCl, puis deuxième restriction. A la fin de chaque restriction il est nécessaire d'inactiver les enzymes. L'inactivation se fait à 65°C pour XbaI, SalI et SphI, et à 80°C pour SbfI pendant 20 minutes.

Les inserts aussi doivent subir une restriction. L'insert se compose du fragment double brin amplifié précédemment par PCR. Le protocole est le même que pour la restriction du plasmide, sauf que la rSAP n'est pas nécessaire. De même si besoin la restriction peut se réaliser en plusieurs étapes, et il est nécessaire d'inactiver les enzymes.

Les différents couples d'enzymes ainsi que les tampons utilisés sont résumés en Annexe 3. Les restrictions sont utilisées directement ou stockées à -20°C.

L'étape de ligation se réalise en mélangeant le plasmide et l'insert coupés. C'est le ratio 1:5 (plasmide/insert) qui est utilisé, ce ratio étant calculé sur NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation). Dans le mélange sont aussi ajoutés le tampon de la ligase T4 et la ligase T4. Le tout est ajusté à un volume de 20 µL. La réaction de ligation se fait pendant 3 heures à température ambiante (RT), puis le mélange est utilisé directement ou stocké à -20°C.

Tableau 1 : Séquences des amorces d'amplification Forward (F) et Reverse (R) pour les techniques de surexpression (OE) et sous-expression (SI).

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
Auréochrome 2 OE F	AAGGTACCGTATGAATAATCGGCGATCAAT
Auréochrome 2 OE R	GCTCTAGAAAGTAGGACCGAGTTGTC
CCCH11 OE F	ATAGGTACCTTACCAGAATGGCAACGCCA
CCCH11 OE R	GCAGTCGACTCATCTCCGCTTTTGCTTGA
HSF1.3b OE F	TGTGGTACCATGGAGGCGAACTCTAC
HSF1.3b OE R	CTGGTCGACCTATTTTGACGCAGATTCTC
HSF1b OE F	CTGGTACCATGAACGACCTCGAAAATGT
HSF1b OE R	AATGGATCCTCAGATGGTAACTCCTGC
HSF4.3b OE F	GCTGGTACCAACGTTTATTCTTCAAATTCG
HSF4.3b OE R	GGTCTAGACAGAGAATGCTCACAACA
MYB1RSF3 OE F	AAGGTACCGTAAGATGACGACTGCCTCT
MYB1RSF3 OE R	CTGCATGCTTATTCAAACCGTGCTCGTTTG
TAZ 2 OE F	TAGGTACCATGGTTGATAGAATAGATCC
TAZ 2 OE R	CGTCTAGATCAACGAGCCAAATCAATAT
Auréochrome 2 SI F	GGCCTGCAGGATGAATAATCGGCGATCAAT
Auréochrome 2 SI R	AAGGTACCTGCGTTGCCGAGTTCGGGAT
CCCH11 SI F	AACCTGCAGGAACGCCAGAGCCGTACTTTG
CCCH11 SI R	ACAGGTACCGTCCGCGTGTGTCCCCAA
HSF1.3b SI F	AACCTGCAGGATGGAGGCGAACTCTACGAC
HSF1.3b SI R	CGAGTCGACCCTGTGCTGAAGGTAGCATC
HSF1b SI F	CCGCATGCATTTATCATTGGATCAGATC
HSF1b SI R	GGCCTGCAGGTGTCTGAATTGTCATCG
HSF4.3b SI F	CCGCATGCCGCTTACATTGACTGTGAAT
HSF4.3b SI R	ATCCTGCAGGCCTCATCATCGCTTATCATA
MYB1RSF3 SI F	GCGCATGCGGCTGGTACAAAAGATACC
MYB1RSF3 SI R	ACCCTGCAGGTGTATCAAGAAGTAGAGTGG
TAZ 2 SI F	CGGCATGCAACTTGTGCTGCTGGAGTCG
TAZ 2 SI R	CGGCATGCAACTTGTGCTGCTGGAGTCG

Tableau 2 : Liste des températures d'hybridation et des tailles d'amplification pour les couples d'amorces (Forward/Reverse) de la technique de surexpression (OE) et de sous-expression (SI).

Amorces	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplification (pb)
Auréochrome 2 F/R OE	60	1543
CCCH11 F/R OE	63	1076
HSF1.3b F/R OE	62	1491
HSF1b F/R OE	60	1548
HSF4.3b F/R OE	59	1485
MYB1RSF3 F/R OE	62	1628
TAZ2 F/R OE	57	1212
Auréochrome 2 F/R SI	65	390
CCCH11 F/R SI	66	442
HSF1.3b F/R SI	66	355
HSF1b F/R SI	60	313
HSF4.3b F/R SI	62	320
MYB1RSF3 F/R SI	63	352
TAZ2 F/R SI	66	347

II.4 Constructions plasmidiques pour le knock-out

a) Description du plasmide utilisé

Le plasmide utilisé pour le knock-out est le plasmide PtPuc3-diaCas9 (Figure 7). Ce plasmide est composé de :

- Un promoteur (HIS3 promoter) suivi de la nucléase Cas9. Cette nucléase permet lorsqu'elle est couplée à une ARN guide, de faire des coupures doubles brin de façon ciblée induisant par la suite des mutations lors de la réparation de cette région.
- Des signaux de localisation nucléaire (NLS) autour de la Cas9. Ces signaux permettent à la nucléase d'entrer dans le noyau.
- Un terminateur de la transcription.
- La séquence de l'ARN guide (gRNA scaffold). Elle permet à la Cas9 de cibler le gène ayant la séquence complémentaire de la séquence cible de l'insert et donc de couper cette séquence dans le génome de *Pt*.
- Deux sites de restriction BsaI sont accolés à la séquence de l'ARN guide afin de pouvoir insérer un fragment qui permettra la modification du gène voulu.
- Une origine de réplication (Ori), permettant la réplication du plasmide.
- Une résistance à la kanamycine (KanR) qui ne s'exprime que dans les bactéries, permettant la sélection des clones transformés.
- Une résistance à la Zéocine (BleoR) qui s'exprime dans la microalgue.
- Une région CEN/ARS qui permet le maintien du plasmide en épisome au sein de la microalgue.
- Une région oriT (origine de tranfert), permettant le transfert par conjugaison en présence du plasmide pTA-Mob.

b) Restriction du plasmide Cas9

Le plasmide PtPuc3-diaCas9 est coupé par l'enzyme BsaI. Le mélange réactionnel se compose de 1 µg de plasmide, 5 µL de tampon CutSmart, 10 unités d'enzyme BsaI. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure puis l'enzyme est inactivée à 65°C pendant 20 minutes.

c) Design et hybridation des oligonucléotides

L'outil PhytoCRISPex (https://www.phytocrispex.biologie.ens.fr/CRISP-Ex/) a été utilisé pour obtenir les séquences cibles pour un gène (Rastogi et al., 2016). C'est une base de données qui permet de trouver les séquences cibles spécifiques pour la technologie d'édition génomique, CRISPR-Cas9. L'outil sélectionne sur le génome des séquences uniques de 19 pb suivie d'une séquence PAM (protospacer adjacent motif). La PAM est une sequence essentielle pour la reconnaissance provenant du système immunitaire bactérien. Une des conditions pour la sélection des séquences cible par PhytoCRISPex, est qu'une séquence homologue du PAM est située avant celle-ci. Ces séquences doivent posséder un taux faible voir nul d'hybridation hors cible (off-target). Après analyse de la séquence génique, l'outil donne un fichier sur lequel différentes séquences cibles sont proposées. Une séquence est sélectionnée et sa complémentaire est aussi dessinée. La séquence sélectionnée ainsi que sa séquence complémentaire subissent les mêmes vérifications que pour les méthodes précédentes concernant l'auto-dimérisation et la formation d'épingles à cheveux, et ceci avant et après l'ajout des séquences supplémentaires. Ces séquences supplémentaires sont complémentaires des extrémités laissées lors de la coupure du plasmide par BsaI, 5' TCGA (séquence cible) 3' et 3' (séquence complémentaire) CAAA 5'.

L'insert se compose de la séquence cible (Target Sequence ; TS) et de la séquence complémentaire (COMPL) hybridée en un fragment double brin. L'hybridation se réalise avec 1 µg de TS et de COMPL dans du tampon de ligase T4, le tout amené à 50 µL dans de l'eau dépourvue de nucléase. Le mélange est chauffé à 85°C pendant 10 minutes afin de dénaturer

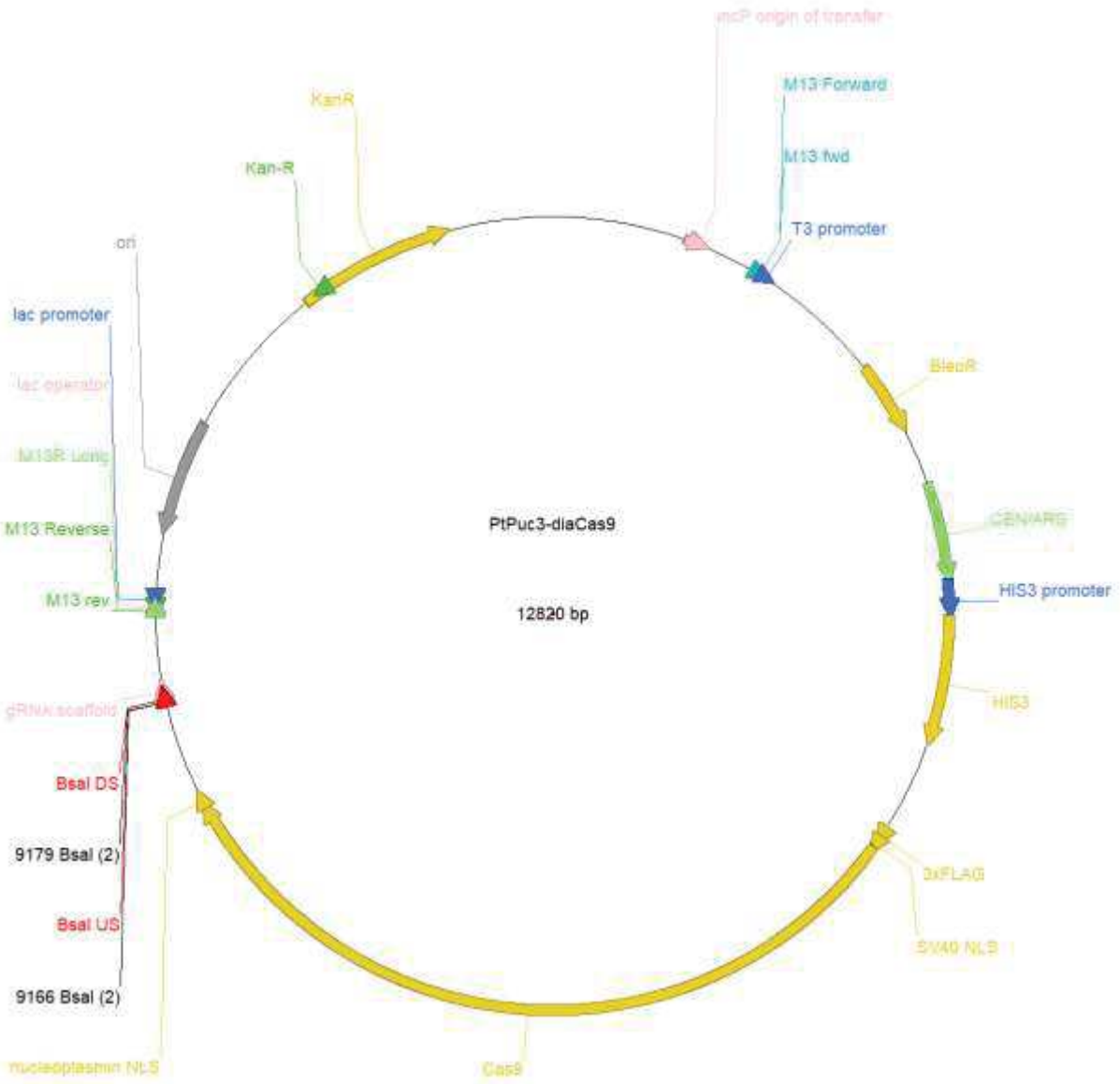


Figure 7 : Carte du plasmide PtPuc3-diaCas9. Ce plasmide possède une résistance à la zéocine et à la kanamycine. La séquence CEN/ARS permet une réplication autonome du plasmide et donc un maintien de celui-ci en tant qu'épisome. L'élément le plus important de ce plasmide est le gène de la nucléase Cas9 avec ses séquences de localisation nucléaire (NLS). Ce gène est suivi par les sites de restriction BsaI permettant l'insertion du fragment avant la séquence de l'ARN guide afin de la modifier.

les fragments, puis laissé à refroidir lentement pendant environ 60 à 90 minutes, permettant l'hybridation de la TS et de la COMPL.

d) Ligation de l'insert dans le plasmide coupé

La ligation se fait avec 100 ng de plasmides et 40 ng d'insert (double brin) dans 2 µL de tampon de la ligase T4 avec 0,6 µL de ligase T4. Le tout est complété à 20 µL avec de l'eau dépourvue de nucléase. Le mélange réactionnel reste à température ambiante pendant 3 heure, puis est stocké à -20°C.

II.6 Vérification des constructions plasmidiques et multiplication des plasmides construits

a) Réalisation de bactéries compétentes

Les bactéries utilisées pour être rendues compétentes sont les bactéries *Escherichia coli* (*E.coli*) de souche DH5α pour les techniques de surexpression et de sous-expression et les souches DH10β pour la technique de conjugaison. La souche DH5α possède une efficacité de transformation élevée et possède un rapport qualité/prix élevé. La souche DH10β est une souche efficace pour le clonage de plasmide de grande taille, elle est donc utilisée pour la technique de conjugaison nécessitant le plasmide pTA-Mob de 52,7 kb. Elle montre aussi une efficacité de transformation élevée et un rapport qualité/prix élevé.

Une pré-culture bactérienne est réalisée sur milieu SOC (Annexe 4). Ce milieu est similaire au milieu LB mais est complémenté avec du Magnésium (Mg^{2+}) pour l'équilibre physico-chimique des cellules et du glucose, permettant une reprise de la croissance ainsi qu'une croissance plus rapide, le glucose étant une source d'énergie pour les cellules bactériennes. La pré-culture est incubée à 37°C sous agitation (180 rpm) pendant toute une nuit. 100 mL de milieu SOB sont ensemencés avec 1 mL de pré-culture, cette culture étant alors placée à 37°C pendant environ 3 heures à 180 rpm pour atteindre une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 0,5 ($5*10^8$ cellules/mL).

La pré-culture est ensuite transférée dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifugée à 3 000 rpm pendant 20 minutes. Le culot est resuspendu dans 10 mL de solution froide (Annexe 5) pour bactéries compétentes, puis est complétée à 19 mL avec cette solution. Cette solution se caractérise par la présence d'ions Ca^{2+}. Ces ions vont induire une fragilisation de la membrane des bactéries et même former de micropores, permettant le passage de petites molécules d'ADN telles que des plasmides. Toutes ces étapes sont réalisées dans la glace pour éviter tout choc thermique.

Une centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 minutes est réalisée et le surnageant éliminé. Le culot est resuspendu dans 3 mL de solution froide pour bactéries compétentes, et le mélange est aliquoté à 100 µL dans des microtubes de 1,5 mL puis déposé dans l'azote liquide afin de figer les bactéries dans leur état. Tous les microtubes sont ensuite placés à -80°C pour être stockés.

b) Transformation bactérienne

Il s'agit d'insérer les plasmides recombinés dans les bactéries afin de les multiplier. 10 et 100 ng de plasmide sont ajoutés aux 100 µL de bactéries compétentes. Le tube est alors placé dans la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique à 42°C est ensuite effectué pendant 45 secondes. Le tube est placé dans la glace pendant 3 minutes et 250 µL de milieu SOC sont ensuite ajoutés. Ce tube est incubé pendant 60 à 90 minutes à 37°C sous agitation. 20 à 100 µL de la culture de bactéries issue de la transformation sont alors étalés sur des boîtes de Pétri avec de l'Ampicilline (surexpression, sous-expression) ou Kanamycine et Gentamycine (conjugaison). En conjugaison, les bactéries possèdent deux plasmides après transformation. Le plasmide recombiné avec une résistance à la Kanamycine et le plasmide pTA-Mob possédant une résistance à la Gentamycine. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit.

c) Vérification des plasmides contenus dans les colonies bactériennes

Quelques colonies présentes sur les boîtes de Pétri sont analysées par PCR pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Pour cela une colonie est prélevée et placée dans un microtube contenant 200 µL de milieu SOC. Ce microtube est placé toute la journée sous agitation à 37°C. En fin de journée il est utilisé pour réaliser la PCR.

La PCR peut être réalisée avec différents couples d'amorces :

- Les amorces MCS, qui ciblent des séquences présentes sur le plasmide de part et d'autre de la boîte MCS où est inséré notre fragment.
- Les amorces qui ont servi à amplifier les gènes pour les techniques de surexpression et de sous-expression.
- L'amorce M13 couplée à la TS pour la technique de conjugaison avec le plasmide Cas9. La M13 cible en amont du site d'insertion de l'oligonucléotide, avec comme deuxième amorce, la séquence cible utilisée pour former les oligonucléotides.

La PCR peut se réaliser avec différentes polymérases, comme la Phusion, la Long Amplification (LA) ou la GoTaq, le protocole changeant en fonction des polymérases.

Les produits de PCR sont mis à migrer sur gel puis visualisés sur une plaque UV. Une amplification de la bonne taille signifie que le mutant bactérien possède bien le plasmide construit.

d) Multiplication et extraction des plasmides

La colonie bactérienne avec le plasmide recombiné est alors mise en culture. Il suffit de reprendre la culture utilisée pour le criblage. Les derniers microlitres du microtube sont ajoutés dans un tube de culture contenant 6 mL de milieu SOC et 6 µL d'Ampicilline. La culture est incubée à 37°C sous agitation (180 rpm) pendant environ 8 heures ou toute la nuit. Le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) est utilisé. Il permet de réaliser l'extraction des plasmides contenus dans les bactéries. La première étape de ce protocole est la centrifugation de 5 mL de la culture à 4 500 rpm pendant 10 minutes. Le dernier mL de culture est lui placé dans un microtube avec 1 mL de glycérol puis placé à -80°C pour conserver le clone transformé. Le surnageant est éliminé, le culot resuspendu dans un fond de surnageant est placé dans un microtube de 2 mL, puis centrifugé à 16 000 G pendant 5 minutes. Le culot resuspendu dans 250 µL de solution de resuspension, puis 250 µL de solution de lyse sont ajoutés ainsi que 10 µL de Protéinase K. Après 5 minutes, 350 µL de solution de neutralisation sont ensuite ajoutés et le tube est mélangé puis centrifugé à 16 000 G pendant 3 minutes. Le surnageant est transféré dans une colonne ayant pour but de retenir l'ADN sur son filtre et il est centrifugé. Deux étapes de lavage sont réalisées avec la solution de lavage. La solution est mise dans la colonne puis centrifugée pour éliminer les impuretés. Une étape d'élution avec 50 µL d'eau dépourvue de nucléases chauffée à 65°C permet de récupérer le plasmide contenu sur le filtre. Une deuxième élution est réalisée dans la foulée.

Les concentrations et la pureté des échantillons sont déterminées à l'aide du Nanodrop 2000c. Les plasmides sont envoyés à la plateforme de séquençage Genewiz Europe afin de vérifier la bonne insertion de l'insert.

e) Analyse des données de séquençage

Les données de séquençage sont comparées à la séquence de l'insert qu'il était souhaité d'intégrer dans le plasmide grâce à l'outil Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Cet outil permet de trouver les similarités entre deux séquences. Si aucune similarité de séquence n'est trouvée alors un Blast est réalisé sur la séquence du plasmide vide pour valider que le plasmide séquencé n'est pas construit.

II.7 Techniques de transformation de *Phaeodactylum tricornutum*

a) Techniques d'électroporation

Cette technique consiste à faire entrer de l'ADN dans la microalgue en créant des pores dans sa membrane par des impulsions électriques. Une culture de *Pt* à $2,4*10^6$ cellules/mL est utilisée pour cette technique. *Pt* est cultivée dans un milieu F/2 sans silicium (F/2-Si) afin de limiter la formation de frustule, facilitant l'accès à la membrane. Le plasmide est linéarisé et chauffé 90°C pour stériliser le mélange. Le plasmide et la culture sont mis en mélange dans une cuve d'électroporation et placé dans l'électroporateur. Des pores dans la membrane sont réalisés par 3 à 6 cycles d'impulsion, puis 5 cycles de d'impulsion transfert sont réalisés. Les impulsions de transferts se font par inversion de polarité mettant en mouvement l'ADN, qui est une molécule chargée négativement. Le mélange de culture électroporé est repiqué dans un tube de milieu F/2 avec du silicium et laissé en salle de culture pendant au minimum 3 semaines.

Pour la surexpression le plasmide linéarisé rentre dans la microalgue par électroporation et va s'insérer de façon aléatoire dans le génome de l'organisme. Cette insertion aléatoire peut induire la modification d'expression d'autres gènes voir leur inactivation. Une fois inséré, la construction génique va s'exprimée de façon constitutive dans la microalgue, induisant une surexpression du gène (Figure 8).

De même le plasmide de la technique de sous-expression va s'inséré aléatoirement dans le génome. Pouvant induire comme précédemment des changements d'expression ou des inactivations de gènes. Le fragment exprimé par la construction génique va interférer par homologie de séquence avec les ARNm. Ce qui induit une dégradation par le protéasome des ARNm doubles brins et un blocage de la traduction de nombreux ARNm issu de la transcription du gène de FT ciblé, conduisant à une sous-expression de ce gène (Figure 9).

b) Technique de conjugaison

Une culture de *Pt* en milieu liquide L1 (Annexe 6) est réalisée jusqu'à obtenir une concentration de cellule de 10^8 cellules par mL. Le milieu L1 est fait à partir d'eau de mer. Sur une boîte de Pétri contenant du milieu L1 à 50% avec 1% d'agar, 250 µL de la culture sont étalés et laissés en salle de culture pendant 4 jours. Deux mL de microalgues sont récupérés dans du L1 et ajusté à $5*10^8$ cellules. En parallèle une culture d'E.coli DH10β contenant le plasmide pTA-Mob et le plasmide recombiné, de 50 mL à une DO_{600} comprise entre 0,8 et 1 est réalisée. Le plasmide pTA-Mob est un plasmide de transfert. Il se compose de :

- Un gène de résistance à la Gentamycine.
- Une origine de réplication.
- Les régions Tra1 et 2 codants les protéines nécessaires au transfert par conjugaison du plasmide possédant la région oriT.

Cette culture est centrifugée et resuspendue dans du milieu SOC. Deux cents µL de microalgues et de bactéries sont mélangés et étalés sur boîte de Pétri 5% LB 50% L1 1% agar, incubée 90 minutes à 30°C puis 48°C en salle de culture. Les microalgues sont récupérées dans 1,5 mL de L1 et 500 µL sont étalés sur boîte de Pétri 50% L1 1% agar 50 µg/mL de zéocine, puis placés en salle de culture pendant 14 jours. Le plasmide de transfert va permettre de réaliser un transfert par conjugaison du plasmide recombiné, qui une fois dans la microalgue va se maintenir en tant qu'épisome. Le plasmide transféré va permettre l'expression de la Cas9 dans la microalgue, puis par homologie de séquence avec son ARNg la nucléase va couper dans le gène cible (Figure 10).

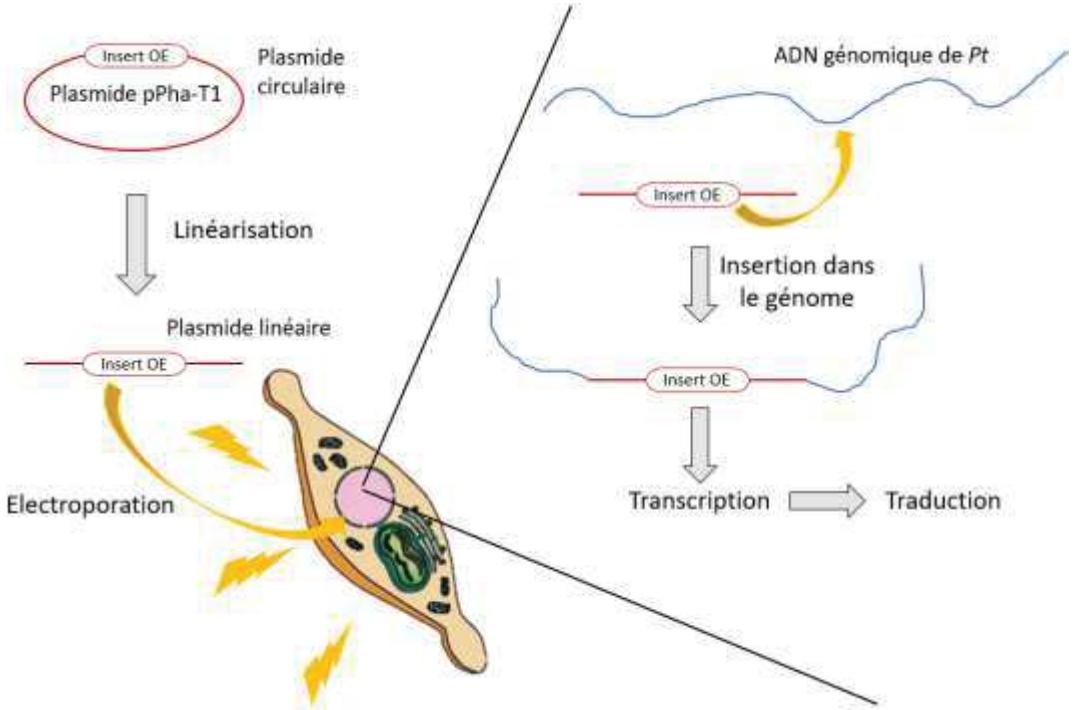


Figure 8 : Schéma de la technique de surexpression d'un gène au sein de Pt. Le plasmide circulaire est linéarisé puis introduit dans la microalgue par électroporation. Ce fragment linéaire s'insère aléatoirement dans le génome de l'algue, est transcrit puis traduit, conduisant à une surexpression de ce gène dans l'algue.

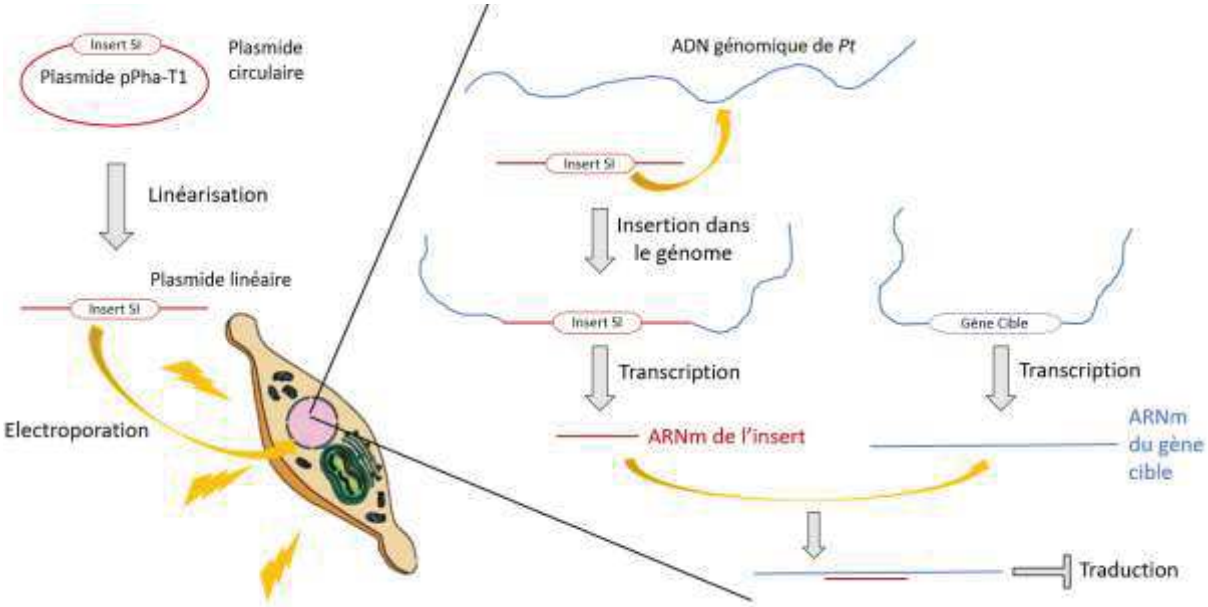


Figure 9 : Schéma de la technique de sous-expression d'un gène au sein de Pt. Le plasmide circulaire est linéarisé puis introduit dans la microalgue par électroporation. Ce fragment s'insère aléatoirement dans le génome de l'algue puis est transcrit. L'ARNm issu de la transcription de l'insert va aller s'hybrider par homologie de séquence sur l'ARNm du gène cible. Induisant une conduction de cet ARN double brin au protéasome où il sera dégradé, ou induisant un blocage de la transcription. La plupart des ARNm du gène cible sont affectés par l'ARNm de l'insert, conduisant à une sous-expression du gène cible.

III. Résultats

III.1 Sélection des facteurs de transcription

Un certain nombre de FTs présentant une expression très différente en carence azotée par rapport au milieu N^+ ont été sélectionnés. Les résultats sont présentés en figure 11. Certains sont surexprimés et d'autres sont sous-exprimés :

- Les surexprimés :

Les FTs CCCH11 et MYB1R SHAQKYF3 (MYB1R SF3) sont tous deux surexprimés dans la condition de stress azoté. Au 5ème jour, ils sont 2,8 fois plus exprimés qu'en condition non stressante et même jusqu'à plus de 7 fois plus exprimés au 10ème jour. HSF1.3b possède un profil différent des autres FTs. Il est surexprimé durant ce stress mais montre deux plateaux. Premièrement il est 2,3 fois plus exprimé au 6ème jour, et le second plateau intervient au 10ème jour ce qui induit une expression 4,6 fois supérieure à la condition contrôle.

- Les sous-exprimés :

Le FT auréochrome 2 est 3,4 fois moins exprimé (Log2FoldChange de -1,752 = Expression de $2^{-1.752}$, soit 0,297) en condition de stress azoté à partir du 5ème jour et se retrouve même 8 fois moins exprimé au 9ème jour d'expérience en photobioréacteur. Ce FT reste sous-exprimé dans cette condition de stress. HSF1b est un FT qui se retrouve sous-exprimé durant le stress azoté dès le 5ème jour, et jusqu'à 18,7 fois le 9ème jour.

- Les FTs à expression différentielle transitoire :

Le FT HSF4.3b possède lui aussi une expression atypique. Il est qualifié de transitoire au vu de son expression. Il est 2,6 fois plus exprimé au 5ème jour et reste à peu près constant avant de voir son expression chuter au 10ème jour. TAZ2 quant à lui possède deux pics d'inhibition de son expression. Au 5ème jour, ce FT se retrouve 4,8 fois moins exprimé avant de retomber à une expression similaire au contrôle au 8ème jour. Puis il est de nouveau exprimé à partir du 9ème jour et est 3,63 fois moins exprimé au 10ème jour avant de retomber à une différence d'expression nulle.

L'outil WGCNA a permis de mettre en évidence 3 clusters de gènes co-régulés (positivement et négativement) et associés à la variation des lipides et du ratio N/C. Seulement les gènes qui possèdent une corrélation forte (supérieur à 0,8) pour la variable lipides ou pour le ratio N/C ont été sélectionnés. Une valeur de KME (eigengene-based connectivities) est donnée par l'outil. Cette valeur comprise entre 0 et 1 permet de dire, si le gène est essentiel à la régulation (KME proche de 1). Un gène au centre de la régulation est qualifié de gène hub, que l'on peut traduire littéralement par plaque tournante. Pour les FTs sélectionnés ces valeurs sont comprises entre 0,75 et 0,99. Les corrélations sont un bon indicateur pour les FTs qui sont sur ou sous-exprimés constamment lors du stress. Mais pour les FTs possédants une expression différentielle transitoire l'outil n'arrive pas à donner une corrélation forte du fait que l'expression retombe à 0 alors que la variable est toujours en mouvement.

Les FTs auréochrome 2, CCCH11, HSF1b, HSF1.3b, HSF4.3b, MYB1R SF3 et TAZ2 ont donc été sélectionnés pour être investigués au cours de ce stage.

III.2 Extraction des ARNs totaux et transcription inverse

a) Les ARNs totaux

Une forte concentration d'ARN totaux est obtenue en condition N^+. De plus les ratios A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{280nm} montrent que les échantillons sont de bonne qualité. La concentration des ARN totaux pour la condition N^- est plus faible mais les ratios indiquent

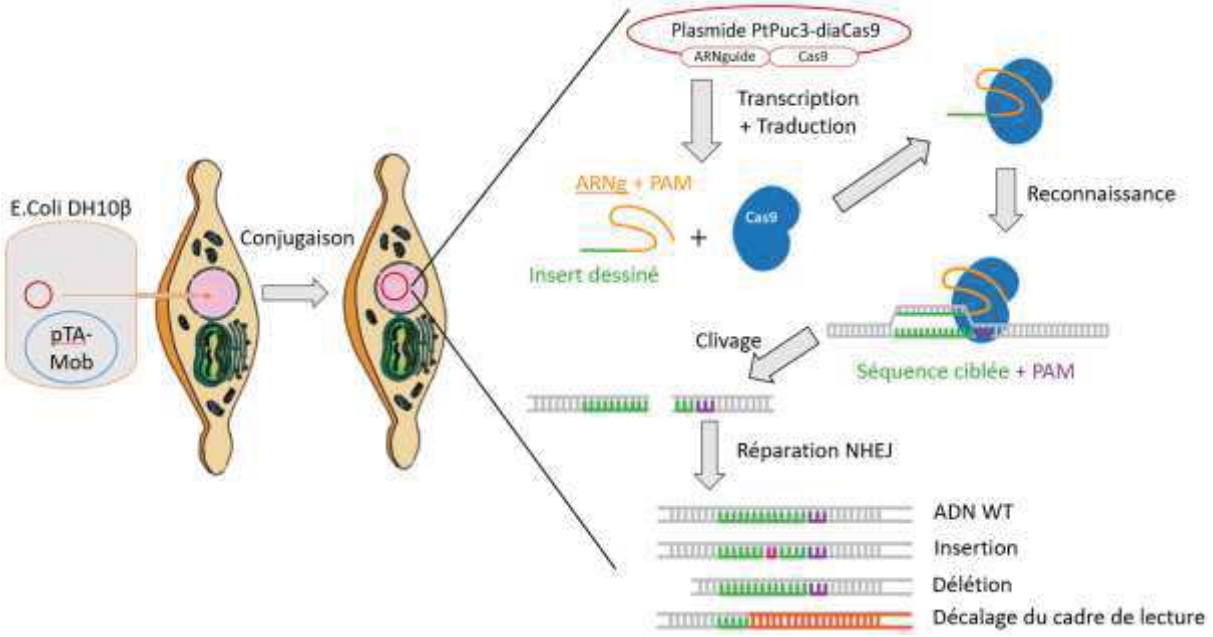


Figure 10 : Schéma de la technique de transfert de plasmide dans Pt par conjugaison bactérienne. Le plasmide recombiné est transféré dans la microalgue grâce au plasmide pTA-Mob. Le transfert s'effectue au travers du pilus bactérien. Le plasmide une fois dans la microalgue se maintien sous forme d'épisome. Il est transcrit puis traduit, permettant à la Cas9 de s'exprimer avec son ARN guide modifié. Par homologie de séquence entre l'ARNg et le gène ciblé, la Cas9 va couper ce gène. La coupure double brin active les mécanismes de réparation de l'ADN NHEJ (Non-Homologous End-Joining). Cette réparation n'est pas parfaite et induit des mutations dans la séquence du gène, conduisant à son inactivation.

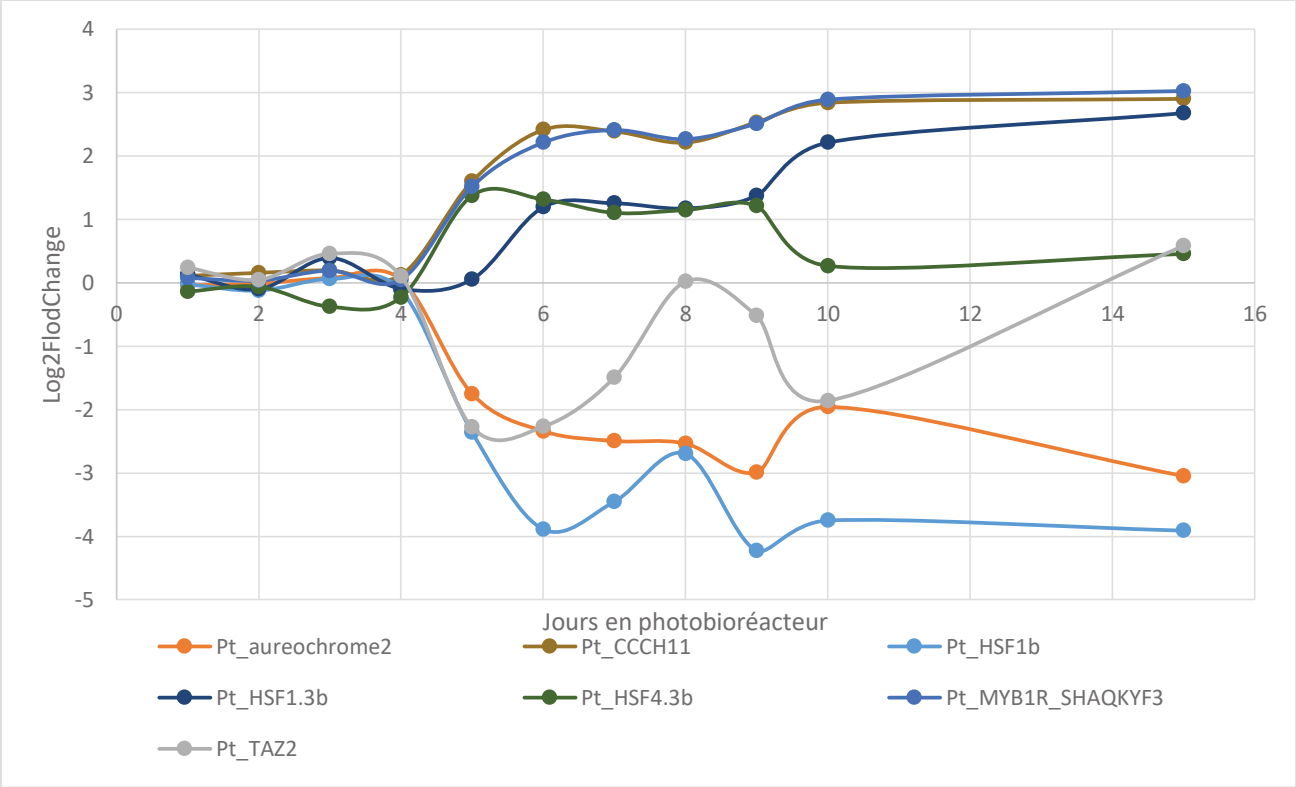


Figure 11 : Graphique d'expression en Log2FoldChange des FTs sélectionnés.

toujours une bonne qualité. La deuxième élution pour chaque condition possède des concentrations plus faibles avec le même ordre de grandeur de ratio. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

b) Transcription inverse

Pour les deux conditions, les transcriptions inverses des ARNs permettent d'avoir des ADN complémentaire (ADNc) concentrés à environ 1500 ng/µL avec des ratios proches de 2. Ces données sont disponibles dans le tableau 4.

III.3 Amplifications des segments géniques

a) Amplification des fragments de surexpression et sous-expression

Tous les fragments ont été correctement amplifiés, à l'exception de HSF1b dont l'amplification était trop faible pour les deux techniques (Figure 12 et 13). Le tableau 2 résume les tailles attendues des fragments de surexpression.

b) Purification et amplification des fragments

La purification des fragments de sur et sous-expression indique des concentrations de fragments faibles pour tous les FTs de surexpression, avec un ratio A_{260nm} /A_{280nm} de bonne qualité et un ratio A_{260nm} /A_{230nm} faible (Tableau 5). Une PCR a été effectuée sur les fragments purifiés afin d'en augmenter les concentrations, mais les deux ratios sont diminués (Tableau 6).

De même pour les FTs de sous-expression, les concentrations après la purification des gels sont faibles et les ratios de qualité moyenne. Après la PCR sur les fragments purifiés les concentrations sont augmentées et les ratios sont de meilleure qualité (Tableau 5 et 6).

III.4 Recherche, isolation et séquençage des plasmides

a) Le criblage de plasmides recombinés en sur et sous-expression

Les colonies des boîtes de Pétri sont testées par PCR et plusieurs amplifications sont visibles pour auréochrome 2 en surexpression. L'amplification réalisée avec les amorces MCS (amorces ciblant le plasmide de chaque côté de l'insert, ajoutant 216 pb au fragment de départ) indique une amplification vers 1800 pb (attendue à 1759 pb) (Figure 14A). De même une amplification avec les amorces MCS est visible vers 1500 pb pour les colonies TAZ2 en surexpression (attendue à 1428 pb) (Figure 14B). Avec les amorces d'amplification pour les gènes de surexpression, plusieurs clones recombinés ont été trouvés : CCCH11 à 1076 pb et plusieurs HSF4.3b à 1485 pb. Une amplification est visible pour les clones HSF1.3b mais elle n'est pas à la taille attendue (1491 pb). De même avec les amorces d'amplification pour les gènes sous-exprimés, deux clones TAZ2 recombinés ont été trouvés à 347 pb, ainsi que CCCH11 à 442 pb et HSF4.3b à 320 pb, même si des amplifications aspécifiques sont visualisables (Figure 14C).

b) Le criblage des plasmides recombinés pour la technique de conjugaison

Le criblage des colonies bactériennes possédant le plasmide recombiné avec l'insert formé de la TS et de la COMPL est réalisé. Il se fait à l'aide de l'amorce M13 ciblant une séquence du plasmide en aval des sites de restriction BsaI où se trouve l'insert et de la TS de cet insert. Le criblage indique des amplifications aux alentours de 500 pb (Figure 15).

c) Isolation des plasmides recombinés

Les plasmides extraits sont en concentration plus ou moins fortes et des ratios de relativement bonne qualité que ce soit pour les plasmides en surexpression ou sous-expression (Tableau 7).

Tableau 3 : Résultats des analyses au Nanodrop 2000c des extractions d'ARN.

Nom	Concentration en ng/µL	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Type d'échantillon
Pt1_N^+ élution 1	927,1	2,15	2,32	ARN
Pt1_N^- élution 1	349,1	2,20	2,39	ARN
Pt1_N^+ élution 2	185,9	2,16	2,25	ARN
Pt1_N^- élution 2	43,4	2,21	2,45	ARN

Tableau 4 : Résultats des analyses au Nanodrop 2000c de la transcription inverse.

Nom	Concentration en ng/µL	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Type d'échantillon
Pt1_N^+	1473,2	1,72	1,95	ADN
Pt1_N^+	1697,8	1,73	1,98	ADN
Pt1_N^-	1672,5	1,73	1,97	ADN
Pt1_N^-	1775,5	1,73	1,98	ADN

Figure 12 : Gel d'amplification des gènes de FTs sur l'ADN complémentaire pour la technique de surexpression. Les bandes d'amplification d'auréochrome 2, CCCH11, HSF1.3b, HSF1b, HSF4.3b, MYB1RSF3 et TAZ2 sont ici visibles.

d) Séquençage des plasmides

Seulement deux constructions plasmidiques possèdent leur insert suite au séquençage. auréochrome 2 en surexpression s'aligne sur la séquence de son insert, et de même pour TAZ2 en surexpression.

Les plasmides CCCH11, HSF1.3b, HSF4.3b en surexpression et auréochrome 2 , CCCH11, HSF4.3b, TAZ2 en sous-expression ne s'alignent pas sur la séquence de l'insert. Ils se retrouvent parfaitement alignés sur la séquence du plasmide pPha-T1 vide. La boîte MCS est bien retrouvée ainsi que les séquences après celle-ci. Les plasmides sont donc dépourvus d'insert (Figure 16).

III.5 Les transformations

La technique d'électroporation n'a pas donné de résultats lors du premier essai. Les résultats du second essai ne sont pas encore disponibles.

Le premier essai de la technique de conjugaison avec la souche DH5α n'a pas permis l'obtention de mutants. Lors du nouvel essai avec la souche DH10β, des spots de microalgues sont visibles sur les boites de Pétri (Figure 17).

IV. Discussion

Les microalgues sont des organismes d'intérêt pour la production de biocarburants. Mon stage s'insère dans une optique de modification génétique de souches de microalgues avec pour but 1) de faire surproduire des lipides à la microalgue et 2) de mieux comprendre le rôle des FTs dans la réorientation métabolique. Cette réorientation métabolique se produit en effet dans la cellule lors d'un stress azoté, réorientation qui aboutit à la formation de lipides, des molécules de stockage très énergétiques. Dans la cadre de ces recherches, la majorité des modifications génétiques effectuées à ce jour chez les microalgues concerne les gènes codant une enzyme de la voie de biosynthèse des lipides ou des voies compétitrices (Ma et al., 2014 ; Zhu et al., 2018). En travaillant sur les FTs, l'idée est d'avoir un impact sur une voie entière de biosynthèse, soit en la surexprimant soit en l'inhibant. En effet, les FTs régulent la plupart des processus cellulaires et permettent à l'organisme d'ajuster son métabolisme en fonction des conditions environnementales. Chez *Pt*, notre modèle, deux études bio-informatiques sur les FTs ont permis d'identifier environ 200 gènes codant des FTs dans le génome (Rayko et al., 2010 ; Thiriet-Rupert, 2017). Néanmoins, très peu de recherches ont été effectuées à ce jour concernant le rôle de ces différents FTs chez *Pt*. Des recherches chez *Nannochloropsis salina* ont montré que l'expression hétérologue du FT WRI1 d'*Arabidopsis thaliana* dans cette microalgue, induisait une augmentation de la quantité de lipides (Kang et al., 2017). Dans ce même organisme, une surexpression d'un FT bZIP induit une augmentation de la biomasse et de la productivité en lipides (Kwon et al., 2018). Ces deux exemples sont d'intérêt et montrent que les FTs ont un rôle important. De nouvelles études de génomique fonctionnelle doivent être réalisées, particulièrement chez *Pt*, afin de mettre en évidence le rôle de ces FTs dans les cellules.

IV.1 Sélection des FTs à partir des données de séquençage des ARNs.

En se basant sur l'expression différentielle et la co-régulation des gènes, les candidats présentant une forte sur et sous-expression, ainsi qu'un KME élevé (indiquant un gène placé haut dans la pyramide de contrôle) ont été choisis. Quatre familles ont été sélectionnées : Auréochrome, CCCH (Cysteine 3 Histidine), HSF (Heat Shock Factor), MYB (Myéloblastome) et TAZ (Transcription Adaptator putative Zinc finger). Plus particulièrement ce sont les FTs auréochrome 2, CCCH11, HSF1.3b, HSF1b, HSF4.b, MYB1R SHAQKYF3 et TAZ2 qui ont été étudiés.

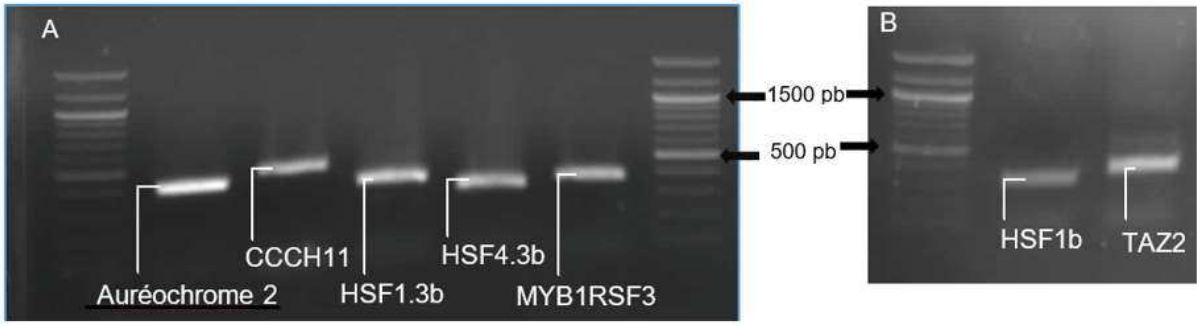


Figure 13 : Gel d'amplification des gènes de FTs sur l'ADN complémentaire pour la technique de sous-expression. (A) Visualisation des bandes d'amplification d'auréochrome 2, CCCH11, HSF1.3b, HSF4.3b et MYB1RSF3. (B) Visualisation des bandes d'amplification de HSF1b et TAZ2.

Tableau 5 : Résultats des analyses au Nanodrop 2000c de la purification des gels pour les fragments en surexpression (OE) et sous-expression (SI).

Nom	Concentration en ng/µL	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Type d'échantillon
Auréochrome 2 OE	16,0	1,83	0,97	ADN
CCCH11 OE	38,8	1,83	1,31	ADN
HSF1.3b OE	17,9	1,85	1,14	ADN
HSF4.3b OE	23,3	1,86	0,69	ADN
MYB1R SF3 OE	34,7	1,81	0,81	ADN
TAZ2 OE	43,1	1,87	1,07	ADN
Auréochrome 2 SI	24,7	1,94	1,10	ADN
CCCH11 SI	10,4	1,73	0,85	ADN
HSF1.3b SI	14,4	1,95	1,35	ADN
HSF4.3b SI	40,2	1,20	0,66	ADN
MYB1R SF3 SI	8,4	2,04	0,66	ADN
TAZ2 SI	8,6	1,89	0,90	ADN

Tableau 6 : Résultats des analyses au Nanodrop 2000c de l'amplification des purifications sur gel des fragments en surexpression (OE) et sous-expression (SI).

Nom	Concentration en ng/µL	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Type d'échantillon
Auréochrome 2 OE	389,3	1,55	0,78	ADN
CCCH11 OE	388,6	1,56	0,78	ADN
HSF1.3b OE	434,0	1,50	0,74	ADN
HSF4.3b OE	394,9	1,53	0,79	ADN
MYB1R SF3 OE	384,5	1,53	0,75	ADN
TAZ2 OE	387,7	1,52	0,75	ADN
Auréochrome 2 SI	50,0	1,91	0,94	ADN
CCCH11 SI	113,2	1,90	1,95	ADN
HSF1.3b SI	98,8	1,86	1,93	ADN
HSF4.3b SI	99,6	1,83	1,81	ADN
MYB1R SF3 SI	98,8	1,88	1,57	ADN
TAZ2 SI	111,1	1,86	1,99	ADN

Les Auréochromes ne sont retrouvés que chez les straménopiles photosynthétiques (Ishikawa et al., 2009 ; Takahashi et al., 2007). Ils sont connus pour être des récepteurs à la lumière. Ils possèdent un domaine basique-leucine-Zipper (bZIP) et un domaine senseur Light, Oxygen, Voltage (LOV). Le domaine LOV suite à une irradiation par la lumière bleue change de conformation et s'associe à un FAD (flavine adenine dinucleotide) ou un FMN (flavine mononucleotide) qui joue le rôle de chromophore (Salomon et al., 2000). La longueur d'onde bleue étant la seule à pouvoir parcourir de longue distance dans l'eau, elle est donc supposée jouer un rôle important chez les microalgues. Il a notamment été montré que l'auréochrome1a était impliqué dans des mécanismes tels que le cycle cellulaire (Huysman et al., 2013). Aucune étude n'a été publiée jusqu'à ce jour sur l'auréochrome 2. Les données de RNAseq montrent que de nombreux gènes codants des protéines impliqués dans le cycle cellulaire sont différentiellement exprimés durant la carence. Dans notre étude l'auréochrome 2 est sous-exprimé dès le début de la carence et tout au long de celle-ci. Ceci peut indiquer un rôle inhibiteur de ce FT, réprimant l'expression de gènes en condition contrôle.

Les CCCH sont des protéines avec un domaine de liaison de type zinc-finger composé par des motifs de type C3H, formés par 3 cystéines et une histidine. Une étude génomique des protéines de type CCCH-zinc finger a révélé qu'il existait 68 et 67 familles de CCCH chez Arabidopsis et le riz, respectivement. Les profils d'expression de ces protéines suggèrent qu'elles interviennent dans les réponses aux stress abiotique et biotique et qu'elles seraient impliquées dans la tolérance aux stress (Wang et al., 2008). En effet SZF1 et SZF2 chez Arabidopsis, des protéines de type CCCH-zing finger, ont un lien avec la tolérance au stress salin (Sun et al., 2007). Une surexpression de la protéine de type CCCH-zing finger, ZFP1 chez Arabidopsis induit chez la plante mutée une tolérance accrue au stress salin, en maintenant la balance ionique et en limitant le stress oxydatif et osmotique (Han et al., 2014). Chez le riz plusieurs protéines de type CCCH-zinc finger se montrent comme étant impliquées dans le retardement de la sénescence ainsi que dans la tolérance aux stress (Jan et al., 2013 ; Kong et al., 2006). La protéine CCCH12 du riz est impliquée dans la résistance à *Xanthomonas orizae*, qui cause la bactériose du riz. Une surexpression de cette protéine s'accompagne d'une accumulation accrue d'acide jasmonique et par une induction des gènes de réponse à l'acide jasmonique, conférant une résistance accrue à cette bactérie. Inversement, une sous-expression de cette protéine confère une plus forte sensibilité au pathogène (Deng et al., 2012). Dans notre étude CCCH11 est exprimé au début de la carence et reste surexprimé tout au long de celle-ci. Ceci semble indiquer que le FT intervient précocement dans la réponse à la carence et demeure important durant la totalité de cette carence.

La famille de FTs HSF, se caractérise par une partie très conservée qui se compose d'environ 100 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle se compose de 3 hélices alpha et de 4 feuillets β antiparallèles (Li et al., 2014 ; Scharf et al., 2012). Ces FTs sont impliqués dans les réponses aux stress abiotiques comme le choc thermique, en régulant l'expression de gènes de réponse aux stress. Les protéines les plus connues induites par les HSFs, sont les protéines chaperonnes. Ces protéines permettent lors d'un stress thermique de protéger les autres protéines afin qu'elles ne perdent pas leur structure tridimensionnelles, et qu'elles soient opérationnelles à la fin du stress. HSFA1 se montre être indispensable lors d'un choc thermique, et une surexpression de celui-ci permet même d'améliorer la tolérance du plant de tomate jusqu'à une heure à 51°C, alors que le génotype contrôle ne résiste pas (Fragkostefanakis et al., 2015). HSFA1 est un exemple typique des HSFs car il est essentiel à la réponse au choc thermique. Les études sur les HSFs suggèrent un rôle de régulation très important durant les chocs thermiques, mais ils jouent probablement un rôle important dans la réponse à d'autres stress abiotiques (Xue et al., 2014). Durant l'expérimentation HSF1b est sous-exprimé tout au long de la carence, indiquant un rôle inhibiteur de gènes en condition de contrôle. HSF1.3b et HSF4.3b sont tous deux surexprimés durant la carence. HSF1.3b est exprimé au début de la carence puis est exprimé plus fortement lorsque la carence perdure, indiquant un rôle sur le long terme dans la réponse. HSF4.3b est aussi exprimé au début de la carence puis son expression chute, indiquant un rôle au début du stress dans la mise en place de la réponse.

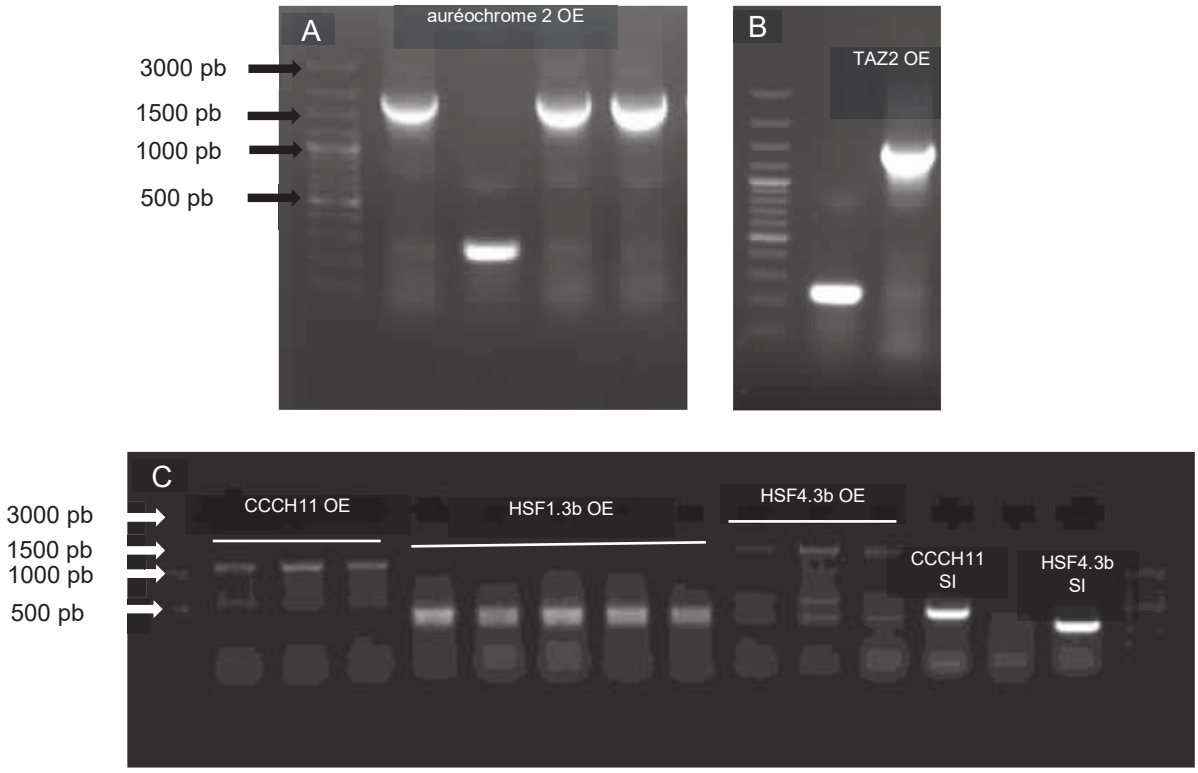


Figure 14 : Gels de criblage des colonies bactériennes après transformation. (A) Criblage de auréochrome 2 en surexpression. (B) Criblage de TAZ2 en surexpression. (C) Criblage de CCCH11, HSF1.3b et HSF4.3b en surexpression, ainsi que CCCH11 et HSF4.3b en sous-expression.

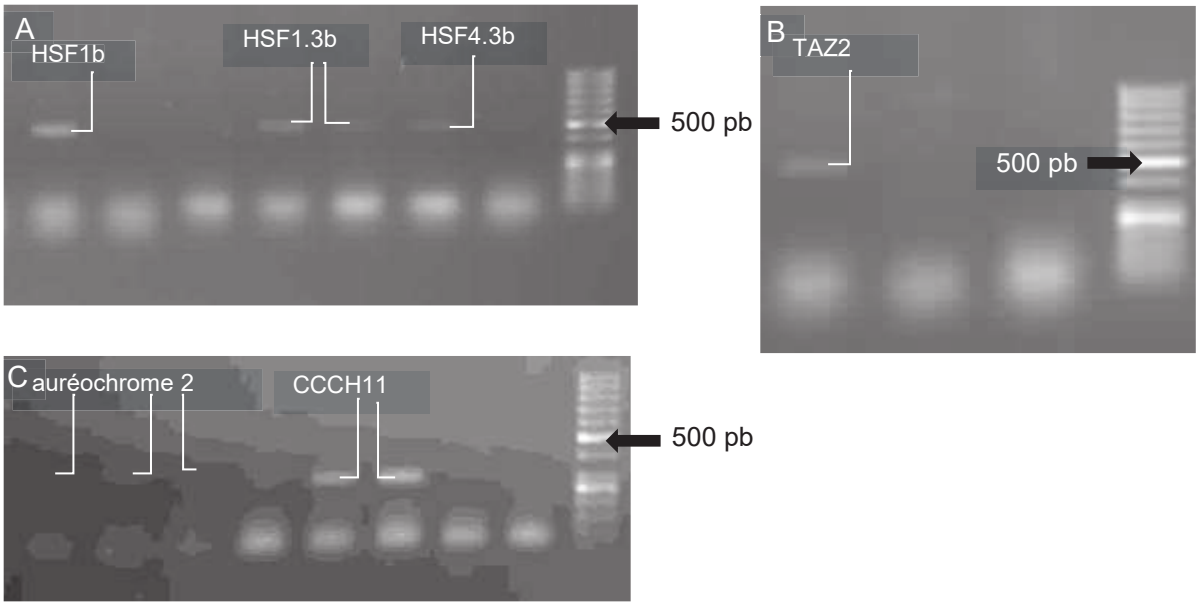


Figure 15 : Criblage des colonies bactériennes de la technique de conjugaison transformées avec le plasmide PtPuc3-diaCas9. (A) Criblage HSF1b, HSF1.3b et HSF4.3b. (B) Criblage de TAZ2. (C) Criblage de auréochrome 2 et CCCH11.

Les facteurs MYB se caractérisent par un domaine de liaison à l'ADN très conservé, le domaine MYB. Ce domaine comprend jusqu'à 4 répétitions imparfaites (R) d'environ 52 acides aminés, chacune formant trois hélices α. La deuxième et troisième hélice de chaque répétition forment une structure hélicoïdale de type helix-turn-helix (HTH) avec trois résidus tryptophane, ou hydrophobes, régulièrement espacés, permettant la formation d'un noyau hydrophobe dans la structure 3D HTH. C'est la troisième hélice de chaque répétition qui est l'hélice de « reconnaissance » et qui réalise un contact direct avec l'ADN (Dubos et al., 2010). Les FTs MYB sont classés en 3 sous-familles : MYB1R, MYBR2R3 et MYB3R en fonction du nombre de répétitions R dans le domaine de liaison à l'ADN. Les MYBs se retrouvent impliqués dans de nombreux mécanismes, dont le métabolisme primaire et secondaire, l'identité cellulaire, les processus développementaux, et les stress biotiques et abiotiques. Par exemples, plusieurs R2R3-MYB se retrouvent impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (Stracke et al., 2007), d'autres contrôlent la synthèse d'anthocyanes dans les tissus végétatifs (Gonzalez et al., 2008). Les MYBs se montrent essentiels pour un épaississement normal de la paroi secondaire des cellules de peuplier (McCarthy et al., 2010). Chez Arabidopsis certains sont même impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines au niveau de l'enveloppe de la graine (Lepiniec et al., 2006). Le FT MYB1RSF3 se comporte comme CCCH11, indiquant un rôle au début de la carence et tout au long de celle-ci.

Les facteurs TAZ se caractérisent par un domaine de liaison à l'ADN de type Zinc-finger ce qui implique des liaisons avec d'autres protéines (Cemanovic, 2014). Une vue d'ensemble des FTs chez Arabidopsis montre qu'il existe entre 8 et 9 locis de facteurs TAZ dans le génome de cet organisme (Mitsuda, Ohme-Takagi, 2009). Les protéines décrites possédant un domaine TAZ, sont les AtBT chez Arabidopsis, composées d'un domaine BTB et TAZ. Les gènes AtBTs montrent des réponses variables aux stress, mais ils répondent tous rapidement à un traitement par de l'H_2O_2 ou par de l'acide salicylique (SA). Cela suggère que ces protéines jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle et que des molécules signales comme le Ca^+, l'H_2O_2 et le SA affectent la machinerie transcriptionnelle et la conformation des AtBTs, qui interagissent avec d'autres facteurs de transcription (Du, Poovaiah, 2004). Ces facteurs de transcription semblent donc être impliqués dans la réponse aux stress, notamment avec le SA qui est impliqué dans les réponses de défense. Peu de données sont disponibles sur ces FTs de type TAZ, et leur rôle exact reste inconnu. Les études de RNAseq suggèrent un rôle dans la réponse au stress oxydant et au Ca^{2+}, donc un rôle de signalisation (signalling) notamment durant la carence en azote, faisant de ce FT un candidat particulièrement intéressant.

IV.2 Réalisation des plasmides recombinés induisant des modifications génétiques

L'objectif de ce stage était de construire des plasmides en insérant les séquences codants des FTs sélectionnés précédemment. Les constructions sont réalisées pour 3 techniques différentes (Surexpression, Sous-expression, KO). L'intérêt de modifier génétiquement la microalgue avec ces 3 techniques se justifie : en, effet, l'inactivation de gènes (KO) peut induire des phénotypes létaux alors que la sous-expression permet de garder une faible expression du gène. La surexpression quant à elle permet d'obtenir un phénotype opposé en comparaison des deux autres techniques.

La création des amorces ainsi que l'amplification des fragments géniques n'ont pas posé de problèmes. Tous les fragments ont été correctement amplifiés. Seul HSF1b a montré une faible expression. Une ré-amplification sera nécessaire soit sur un échantillon différent soit en effectuant à nouveau des PCR sur un fragment purifié.

Il y a 2 méthodes pour obtenir des plasmides recombinés :

1. La première méthode est la méthode « Golden Gate » (Figure 18). Cette technique a été utilisée au cours de mon stage pour la technique de KO. C'est une technique très récente (REF). Cette méthode repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction de type IIS qui coupent en dehors du site de reconnaissance non palindromique en laissant

Tableau 7 : Résultats des analyses au Nanodrop 2000c de l'isolation des plasmides de surexpression (OE) et sous-expression (SI) par Miniprep.

Nom	Concentration en ng/µL	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Type d'échantillon
Auréochrome 2 OE	327,8	1,92	1,88	ADN
CCCH11 OE	93,8	1,79	1,03	ADN
HSF1.3b OE	95,9	1,83	1,07	ADN
HSF4.3b OE	711,7	2,02	2,05	ADN
TAZ2 OE	817,5	1,88	1,72	ADN
Auréochrome 2 SI	117,5	1,87	1,07	ADN
CCCH11 SI	312,0	2,02	1,78	ADN
HSF4.3b SI	389,8	2,06	1,86	ADN
TAZ2 SI	116,4	1,80	0,97	ADN

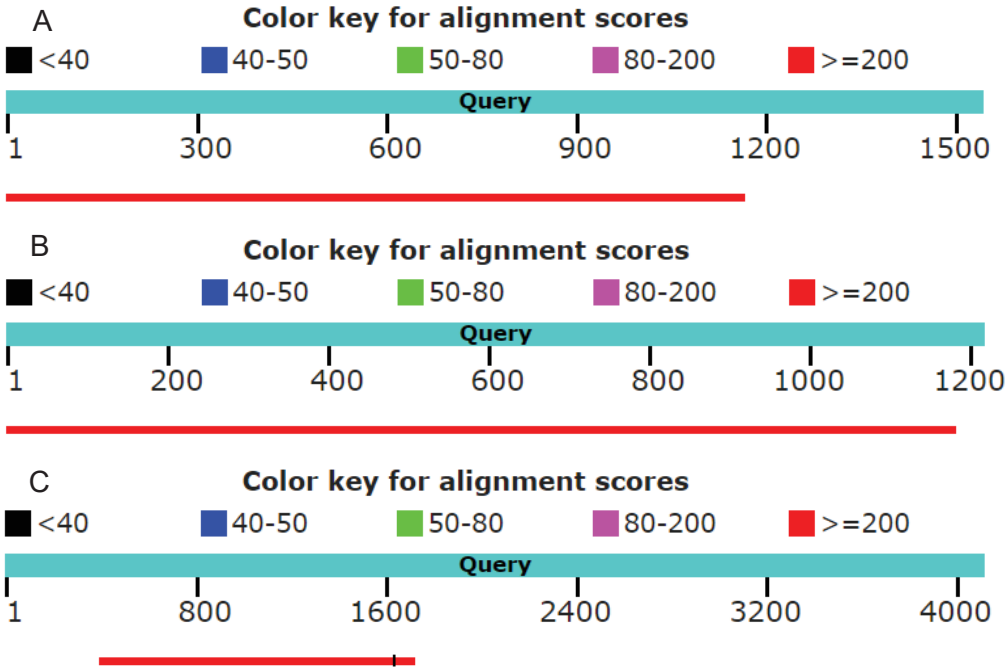


Figure 16 : Résultats du séquençage des plasmides extrait par Miniprep. (A) auréochrome 2 surexpression s'aligne sur la séquence de son insert (Query). (B) TAZ2 surexpression s'aligne sur la sequence de son insert (Query). (C) HSF1.3b surexpression est vide, et s'aligne sur la séquence du plasmide pPhaT1 (Query).

des extrémités monobrins. Le plasmide est dessiné avec deux sites BsaI en directions opposées afin de laisser deux extrémités monobrins. Les fragments sont dessinés avec les sites BsaI, de telle sorte à ce que leurs extrémités soient complémentaires des extrémités monobrins du plasmide. Les fragments vont alors s'insérer dans le plasmide à l'aide de la ligase. Le clivage des fragments et du plasmide et la ligation se fait en une seule étape dans le même tube. Le produit final est le plasmide recombiné sans les sites BsaI. Avec cette méthode il est possible d'incorporer plusieurs fragments dans un même plasmide (Engler et al., 2009 ; 2014). Cette méthode est particulièrement rapide et n'a posé aucun problème lors de la construction des 7 plasmides.

2. La deuxième méthode dite « classique » (qui en réalité est la plus ancienne). Elle est composée de plusieurs étapes (différentes coupures, purification, ligation) ce qui augmente la probabilité d'erreur, le temps de manipulation et diminue l'efficacité. Cette méthode a été utilisée pour la sur et sous-expression lors de mon stage car aucun plasmide « Golden Gate » spécifique à Pt n'est disponible. Certains laboratoires ont probablement construit ces plasmides mais ils ne sont pas à ce jour à disposition de la communauté scientifique.

L'étape de criblage des plasmides pour les techniques de surexpression et de sous-expression s'est montrée encore plus longue que prévu. Une contamination d'un tube d'amorces et/ou de tampon par le plasmide pPha-T1 a notamment été découverte au cours des criblages. Le criblage des plasmides recombinants s'effectuait par PCR avec les amorces MCS, amorces parfaites pour valider si le plasmide se compose de l'insert ou s'il est vide (amplification à 236 pb). Seulement le plasmide vide est visible sur gel au début du criblage et ceci même après plusieurs essais de construction de plasmides et de transformation bactérienne. C'est après un test PCR sur la polymérase ainsi que sur les amorces qu'une contamination par le plasmide pPha-T1 a été découverte. Cette contamination a ralenti énormément le travail et aura eu le mérite de mettre en évidence la nécessité 1) d'utiliser des cônes à filtre pour les tubes comme les amorces mères, les tampons, les plasmides et les polymérases et 2) de toujours effectuer des contrôles de PCR (« blancs ») permettant de détecter rapidement ces contaminations. Un nouveau lot d'amorces MCS a été recommandé. Pour continuer le criblage, un autre couple d'amorces a été utilisé : les amorces d'amplification du gène qui sont choisies, car complémentaires de la séquence de l'insert. Ces séquences permettent la mise en évidence de plusieurs clones positifs suite aux PCR. Néanmoins, après séquençage les plasmides se sont révélés vides. Le test des amorces et de la polymérase ne révèle aucune contamination. Les amplifications mises en évidence figure 13, sont peut-être dues au plasmide recombiné qui a été perdu par la suite ou aux amorces qui ciblent une séquence dans le génome bactérien de taille similaire à l'amplification attendue. Cette dernière hypothèse est peu probable mais jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé d'explication convaincante.

IV.3 Les transformations

Durant ce stage, deux techniques de transformation ont été testées : l'électroporation et la conjugaison.

- <u>L'électroporation :</u>

Deux publications ont été utilisées (Miyahara et al., 2013 ; Zhang, Hu, 2014). Le protocole de Zhang a été réalisé mais sans succès. Il a donc été essayé de changer le protocole. Le protocole de Miyahara est différent au niveau des impulsions électriques. Une première série d'impulsion permet de créer des trous dans la membrane et une deuxième série avec des inversions de polarité permet de mettre en mouvement le fragment d'ADN. Après le temps de récupération en salle de culture, la culture est étalée sur boîte de Pétri avec un antibiotique afin de sélectionner les clones recombinants. Comme le temps d'attente après l'électroporation est long (3 semaines), le résultat de cette tentative n'est pas encore disponible.

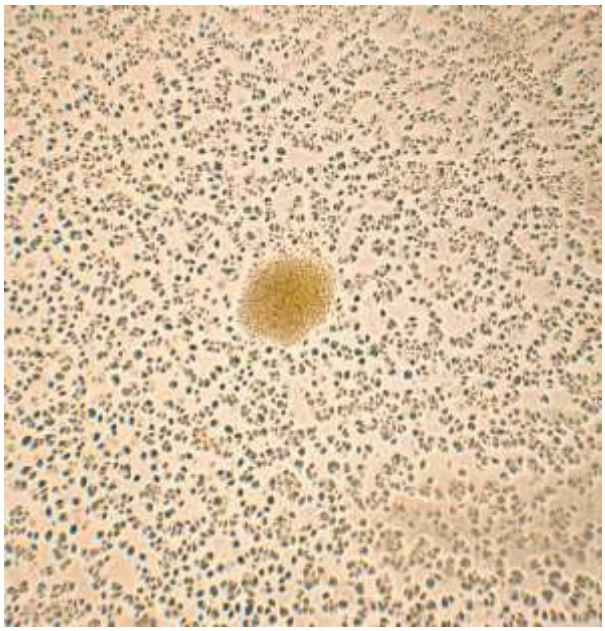


Figure 17 : Photographie par microscopie optique (x10) d'une colonie de Pt transformée par conjugaison avec le plasmide PtPuc3-diaCas9 – auréochrome 2, sur milieu zéocine. Autour du spot sont présents les restes des *Pt* non transformées par conjugaison.

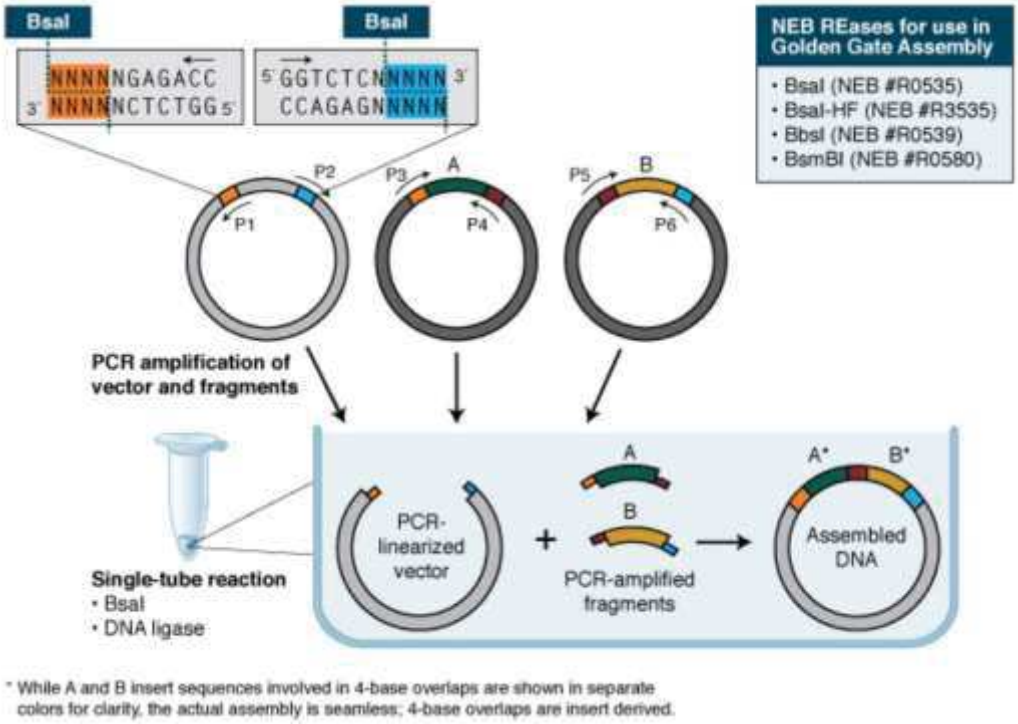


Figure 18 : Schéma de la technique de construction de plasmide « Golden Gate ». Le plasmide et les inserts sont coupés par BsaI puis mis en mélange dans le même tube avec une ligase. Ceci permet la formation de plasmide recombiné avec un insert ou plusieurs (https://www.neb-online.fr/neb/cloning-synthetic-biology/dna-assembly/golden-gate-assembly/).

- La conjugaison :

La conjugaison a tout d'abord été réalisée avec des souches DH5α dans lesquelles le plasmide pTA-Mob avait été préalablement inséré. Les bactéries ont bien intégré le plasmide pTA-Mob mais avaient une croissance faible. Ceci peut s'expliquer par le fait que les souches DH5α ne supportent pas les plasmides trop grands. pTA-Mob est en effet un plasmide de 52 ,7 kb. Le rôle du plasmide de transfert pTA-Mob est crucial dans la conjugaison car il permet le transfert de PtPuc3-diaCas9 au travers du pilus bactérien. Les souches DH5α ne supportant pas le plasmide, des bactéries DH10β ont été commandées. Ces bactéries sont plus adaptées à de grands plasmides. La conjugaison a été retentée. Les bactéries DH10β transformées avec le plasmide pTA-Mob ont effectivement eu une croissance bien supérieure à celle des DH5α. Le protocole de conjugaison a été réalisé et de légers spots de microalgues commencent à apparaitre sur les boite de Pétri avec l'antibiotique zéocine (Figure 17). La présence de spots de microalgues indique que ces microalgues ont intégré le plasmide PtPuc3-diaCas9 possédant le gène de résistance à la zéocine. L'avantage de cette technique est que le plasmide n'est pas intégré au génome de l'organisme. Il reste sous la forme d'un épisome, épisome qui peut être « perdu » au cours du temps dans un milieu non sélectif. Il n'est donc pas considéré comme un OGM. Ce plasmide contient les informations nécessaires à la fabrication de la nucléase Cas9 qui sera conduite au sein du noyau grâce aux signaux de localisation nucléaire puis guidée par l'ARN guide pour couper la cible (auréochrome 2 ; CCCH11 ; HSF1.3b ; HSF1b ; HSF4.3b ; MYB1RSF3 ; TAZ2). Lors de la réparation, la séquence codante ne sera plus fonctionnelle. Une vérification moléculaire est cependant nécessaire.

- Perspectives :

Au-delà des objectifs très précis qui m'ont été confiés lors de mon stage, j'ai pu participer à des tâches plus collectives, notamment le repiquage de cultures. De nombreux mutants pour différents facteurs de transcription (obtenus par biolistique) sont disponibles au laboratoire à la fois en milieu solide (milieu gélosé F2) et en milieu liquide (milieu F2). Ces repiquages sont réalisés tous les 2-3 mois et se font sous conditions stériles (PSM). Ils sont indispensables car ils permettent de conserver les mutants.

Mon sujet de stage s'intégrait bien évidemment dans un projet plus large qui vise à comprendre le rôle des facteurs de transcription dans la réorientation métabolique et la production de lipides. J'ai donc participé, sans que cela soit véritablement intégré à mon stage, aux expérimentations entreprises sur les mutants disponibles au laboratoire afin de déceler l'impact de la modification génétique sur l'accumulation de lipides. Des cultures de mutants ont été réalisées sur microplaques (Figure 19) et des expérimentations de carence azotée ont été réalisées. Des échantillons ont été prélevés afin de cribler les mutants. La méthodologie choisie par le laboratoire et qui sera utilisée sur les mutants obtenus, est un criblage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), technique d'analyse permettant d'obtenir le spectre d'absorption d'un échantillon. La spectroscopie FTIR mesure la quantité de lumière absorbée par un échantillon en fonction de la longueur d'ondes émise par un faisceau infrarouge. Dans notre cas, seulement 1 µl de culture de microalgues (30 millions de cellules) était déposé sur une plaque de silice (Figure 20) et le spectre d'absorption (Figure 21) obtenu en moins d'une minute. La spectroscopie FTIR permet ainsi d'obtenir une vision globale du contenu biochimique de la culture et cela de façon rapide, sans protocole particulier d'extraction et sur très peu de matériel. Les premiers résultats obtenus sur quelques mutants de facteurs de transcription sont très prometteurs.

V. Conclusion

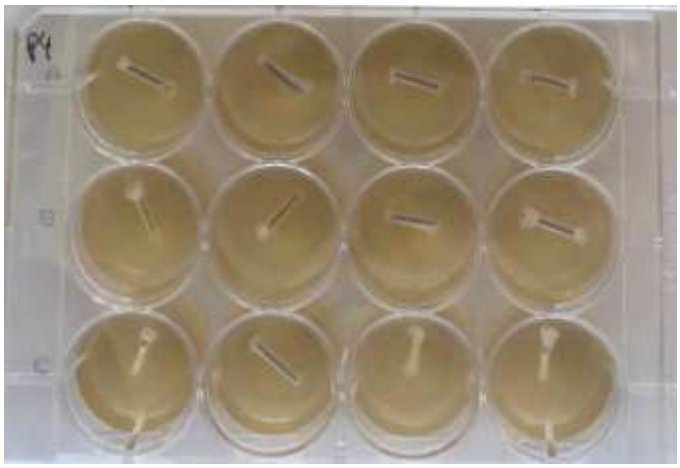


Figure 19 : Culture de microalgue sur microplaque 12 puits. Des agitateurs magnétiques sont présents dans les puits.

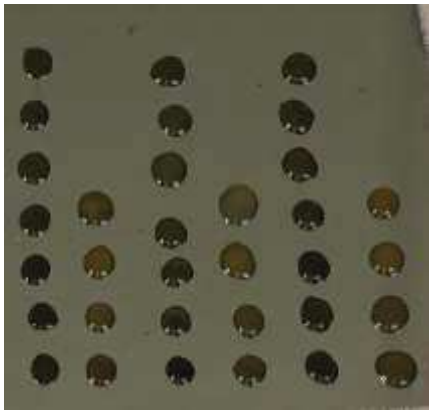


Figure 20 : Gouttes d'un microlitre de culture de Pt (30*10^{8} cellule/µL) disposées sur une plaque de silice.

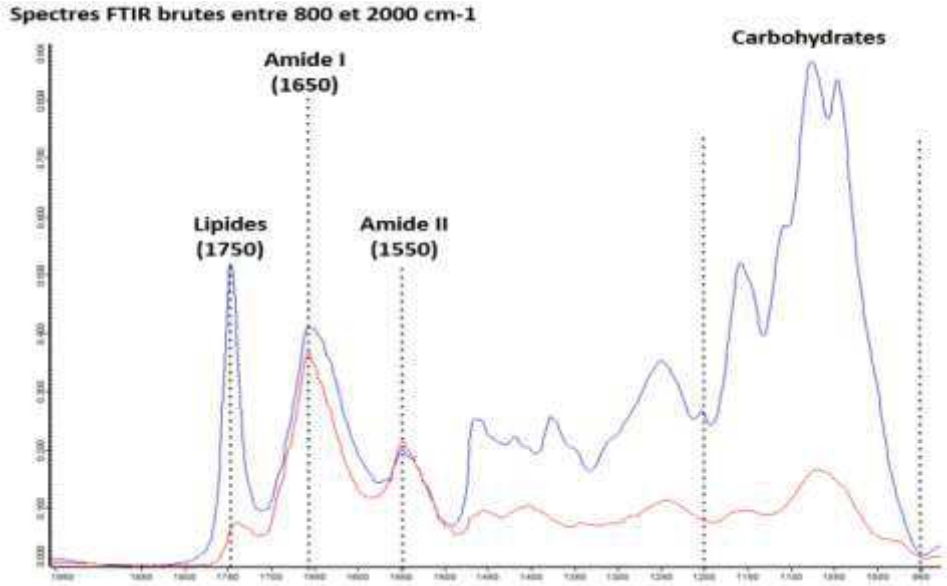


Figure 21 : Graphique de l'analyse FTIR d'échantillons de Pt sur plaque de silice. Cette analyse permet de discriminer les échantillons en fonction de la variable lipides.

L'objectif principal de mon stage a été de construire les vecteurs recombinants permettant de créer des mutants de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*. Les 3 types de constructions les plus connus ont été entreprises au cours de ce stage : knock out, sous-expression et surexpression. Cela a été effectué en ciblant 7 gènes codants des facteurs de transcription dont l'expression des ARNm indiquait une possible implication dans la réponse au stress azoté.

Aucun vecteur de type « Golden Gate » (assemblage ordonnée de fragments d'ADN en une seule réaction) n'étant disponible sur notre modèle de microalgue pour les constructions surexpresseur et silencing, il a fallu construire nos vecteurs de manière plus « classique » et surtout plus laborieuse. Sur les différentes constructions, seulement 2 se sont révélées positives. L'efficacité n'est pas très élevée et a révélée des problèmes de contamination par le vecteur. Cela a énormément ralenti les constructions qui, pour beaucoup, se sont révélées dépourvues de l'insert. La méthode de transformation par électroporation est une méthode fonctionnelle sur *Phaeodactylum tricornutum* dans d'autres laboratoires mais jusqu'ici cette méthode ne fonctionnait pas dans le laboratoire. Des ajustements ont été entrepris au cours de mon stage et nous attendons les résultats.

Les constructions KO ont été faites dans un système « Golden Gate » et n'ont posées aucun problème particulier. La transformation de *Phaeodactylum tricornutum* par conjugaison bactérienne a été choisie dans ce stage car elle évite une intégration des vecteurs dans le génome de la microalgue qui dès lors n'est plus considérée comme un OGM. Cette méthode mise au point très récemment n'avait encore pas été testée au laboratoire. Après un premier échec, les résultats obtenus indiquent un vraisemblable succès : des colonies de microalgues sont visibles sur la boîte indiquant une bonne intégration du vecteur. Les vérifications moléculaires n'ont pour l'instant pas été effectuées faute de temps.

De manière plus globale, ce stage m'a permis de me perfectionner en biologie moléculaire et d'apprendre énormément sur les techniques de génie génétique et sur les techniques de cultures de microalgues. J'ai ainsi acquis de solides bases pour la suite de mon parcours.

VI. Bibliographie

ABDEL-RAOUF, N., AL-HOMAIDAN, A.A. et IBRAHEEM, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. In : *Saudi Journal of Biological Sciences*. juillet 2012. Vol. 19, n° 3, p. 257-275. DOI 10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

ARUN, Neelam, GUPTA, Shalini et SINGH, D. P., 2012. Antimicrobial and antioxidant property of commonly found microalgae Spirulina platensis, Nostoc muscorum and Chlorella pyrenoidosa against some pathogenic bacteria and fungi. In : *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012. Vol. 3, n° 12, p. 4866.

BOWLER, Chris, ALLEN, Andrew E., BADGER, Jonathan H., et al., 2008. The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. In : *Nature*. novembre 2008. Vol. 456, n° 7219, p. 239-244. DOI 10.1038/nature07410.

BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., VOLKMAN, J. K. et DUNSTAN, G. A., 1997. Fish nutrition and feeding proceedings of the sixth international symposium on feeding and nutrition in fish nutritional properties of microalgae for mariculture. In : *Aquaculture*. 1997. Vol. 151, p. 315–331.

CADORET, Jean-Paul et BERNARD, Olivier, 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. In : *Journal de la Société de Biologie*. 2008. Vol. 202, n° 3, p. 201-211. DOI 10.1051/jbio:2008022.

CADORET, Jean-Paul, GARNIER, Matthieu et SAINT-JEAN, Bruno, 2012. Microalgae, functional genomics and biotechnology. In : *Advances in Botanical Research*. S.l. : Elsevier. p. 285–341.

CEMANOVIC, Amar, 2014. 3D structure prediction of histone acetyltransferase (HAC) proteins of the p300/CBP family and their interactome in Arabidopsis thaliana. In : *Network Biology*. 2014. Vol. 4, n° 3, p. 109.

CHAROENSAWAN, Varodom, WILSON, Derek et TEICHMANN, Sarah A., 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. In : *Nucleic Acids Research*. novembre 2010. Vol. 38, n° 21, p. 7364-7377. DOI 10.1093/nar/gkq617.

CHELF, P, BROWN, L.M et WYMAN, C.E, 1993. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. In : *Biomass and Bioenergy*. janvier 1993. Vol. 4, n° 3, p. 175-183. DOI 10.1016/0961-9534(93)90057-B.

DABOUSSI, Fayza, LEDUC, Sophie, MARÉCHAL, Alan, et al., 2014. Genome engineering empowers the diatom Phaeodactylum tricornutum for biotechnology. In : *Nature Communications* [en ligne]. décembre 2014. Vol. 5, n° 1. [Consulté le 29 mars 2019]. DOI 10.1038/ncomms4831. Disponible à l'adresse : http://www.nature.com/articles/ncomms4831.

DELWICHE, Charles F., 1999. Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. In : *The American Naturalist*. 1 octobre 1999. Vol. 154, n° S4, p. S164-S177. DOI 10.1086/303291.

DENG, H., LIU, H., LI, X., XIAO, J. et WANG, S., 2012. A CCCH-Type Zinc Finger Nucleic Acid-Binding Protein Quantitatively Confers Resistance against Rice Bacterial Blight Disease. In : *PLANT PHYSIOLOGY*. 1 février 2012. Vol. 158, n° 2, p. 876-889. DOI 10.1104/pp.111.191379.

DEVAKI, Bhaya et GROSSMAN, Arthur R., 1993. Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom Phaeodactylum tricornutum. In : *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, n° 19, p. 4458-4466. DOI 10.1093/nar/21.19.4458.

DU, Liqun et POOVAIAH, B.W., 2004. A Novel Family of Ca^{2+} /Calmodulin-Binding Proteins Involved in Transcriptional Regulation: Interaction with fsh/Ring3 Class Transcription Activators. In : *Plant Molecular Biology*. mars 2004. Vol. 54, n° 4, p. 549-569. DOI 10.1023/B:PLAN.0000038269.98972.bb.

DUBOS, Christian, STRACKE, Ralf, GROTEWOLD, Erich, WEISSHAAR, Bernd, MARTIN, Cathie et LEPINIEC, Loïc, 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. In : *Trends in Plant Science*. octobre 2010. Vol. 15, n° 10, p. 573-581. DOI 10.1016/j.tplants.2010.06.005.

ENGLER, Carola, GRUETZNER, Ramona, KANDZIA, Romy et MARILLONNET, Sylvestre, 2009. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. In : *PLOS ONE*. 14 mai 2009. Vol. 4, n° 5, p. e5553. DOI 10.1371/journal.pone.0005553.

ENGLER, Carola, YOULES, Mark, GRUETZNER, Ramona, EHNERT, Tim-Martin, WERNER, Stefan, JONES, Jonathan D. G., PATRON, Nicola J. et MARILLONNET, Sylvestre, 2014. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. In : *ACS Synthetic Biology*. 21 novembre 2014. Vol. 3, n° 11, p. 839-843. DOI 10.1021/sb4001504.

FIELD, C. B., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. In : *Science*. 10 juillet 1998. Vol. 281, n° 5374, p. 237-240. DOI 10.1126/science.281.5374.237.

FRAGKOSTEFANAKIS, Sotirios, RÖTH, Sascha, SCHLEIFF, Enrico et SCHARF, Klaus-Dieter, 2015. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat

stress transcription factor and heat shock protein networks. In : *Plant, Cell & Environment*. 2015. Vol. 38, n° 9, p. 1881-1895. DOI 10.1111/pce.12396.

GATEAU, Helene, SOLYMOSI, Katalin, MARCHAND, Justine et SCHOEFS, Benoît, 2017. Carotenoids of microalgae used in food industry and medicine. In : *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2017. Vol. 17, n° 13, p. 1140–1172.

GEIDER, Richard J., DELUCIA, Evan H., FALKOWSKI, Paul G., et al., 2001. Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. In : *Global Change Biology*. 2001. Vol. 7, n° 8, p. 849-882. DOI 10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x.

GONZALEZ, Antonio, ZHAO, Mingzhe, LEAVITT, John M. et LLOYD, Alan M., 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. In : *The Plant Journal*. 2008. Vol. 53, n° 5, p. 814-827. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x.

HAAG, Jeremy R. et PIKAARD, Craig S., 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. août 2011. Vol. 12, n° 8, p. 483-492. DOI 10.1038/nrm3152.

HAIMOVICH-DAYAN, Maya, GARFINKEL, Nitsan, EWE, Daniela, MARCUS, Yehouda, GRUBER, Ansgar, WAGNER, Heiko, KROTH, Peter G. et KAPLAN, Aaron, 2013. The role of C4 metabolism in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. In : *New Phytologist*. 1 janvier 2013. Vol. 197, n° 1, p. 177-185. DOI 10.1111/j.1469-8137.2012.04375.x.

HAN, Guoliang, WANG, Mingjie, YUAN, Fang, SUI, Na, SONG, Jie et WANG, Baoshan, 2014. The CCCH zinc finger protein gene AtZFP1 improves salt resistance in Arabidopsis thaliana. In : *Plant Molecular Biology*. octobre 2014. Vol. 86, n° 3, p. 237-253. DOI 10.1007/s11103-014-0226-5.

HEDGES, S. Blair, BLAIR, Jaime E., VENTURI, Maria L. et SHOE, Jason L., 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. In : *BMC Evolutionary Biology*. 28 janvier 2004. Vol. 4, n° 1, p. 2. DOI 10.1186/1471-2148-4-2.

HEYDARIZADEH, Parisa, 2015. Regulation of secondary compounds synthesis by photosynthetic organisms under stress. In : . 15 décembre 2015. p. 238.

HUYSMAN, Marie J.J., FORTUNATO, Antonio E., MATTHIJS, Michiel, et al., 2013. AUREOCHROME1a-Mediated Induction of the Diatom-Specific Cyclin *dsCYC2* Controls the Onset of Cell Division in Diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). In : *The Plant Cell*. janvier 2013. Vol. 25, n° 1, p. 215-228. DOI 10.1105/tpc.112.106377.

ILLMAN, A.M, SCRAGG, A.H et SHALES, S.W, 2000. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. In : *Enzyme and Microbial Technology*. novembre 2000. Vol. 27, n° 8, p. 631-635. DOI 10.1016/S0141-0229(00)00266-0.

ISHIKAWA, Mié, TAKAHASHI, Fumio, NOZAKI, Hisayoshi, NAGASATO, Chikako, MOTOMURA, Taizo et KATAOKA, Hironao, 2009. Distribution and phylogeny of the blue light receptors aureochromes in eukaryotes. In : *Planta*. août 2009. Vol. 230, n° 3, p. 543-552. DOI 10.1007/s00425-009-0967-6.

JAN, A., MARUYAMA, K., TODAKA, D., et al., 2013. OsTZF1, a CCCH-Tandem Zinc Finger Protein, Confers Delayed Senescence and Stress Tolerance in Rice by Regulating Stress-Related Genes. In : *PLANT PHYSIOLOGY*. 1 mars 2013. Vol. 161, n° 3, p. 1202-1216. DOI 10.1104/pp.112.205385.

KANG, Nam Kyu, KIM, Eun Kyung, et al., 2017. Increased lipid production by heterologous expression of AtWRI1 transcription factor in Nannochloropsis salina. In : *Biotechnology for Biofuels*. 10 octobre 2017. Vol. 10, n° 1, p. 231. DOI 10.1186/s13068-017-0919-5.

KARAS, Bogumil J., DINER, Rachel E., LEFEBVRE, Stephane C., et al., 2015. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. In : *Nature Communications*. 21 avril 2015. Vol. 6, p. 6925. DOI 10.1038/ncomms7925.

KEELING, Patrick J., 2013. The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. In : *Annual Review of Plant Biology*. 2013. Vol. 64, n° 1, p. 583-607. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120144.

KOLLER, Martin, MUHR, Alexander et BRAUNEGG, Gerhart, 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. In : *Algal Research*. octobre 2014. Vol. 6, p. 52-63. DOI 10.1016/j.algal.2014.09.002.

KONG, Z., LI, M., YANG, W., XU, W. et XUE, Y., 2006. A Novel Nuclear-Localized CCCH-Type Zinc Finger Protein, OsDOS, Is Involved in Delaying Leaf Senescence in Rice. In : *PLANT PHYSIOLOGY*. 1 août 2006. Vol. 141, n° 4, p. 1376-1388. DOI 10.1104/pp.106.082941.

KORNBERG, R. D., 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 7 août 2007. Vol. 104, n° 32, p. 12955-12961. DOI 10.1073/pnas.0704138104.

KROTH, Peter G., CHIOVITTI, Anthony, GRUBER, Ansgar, et al., 2008. A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom Phaeodactylum tricornutum Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. In : KROYMANN, Juergen (éd.), *PLoS ONE*. 9 janvier 2008. Vol. 3, n° 1, p. e1426. DOI 10.1371/journal.pone.0001426.

KWON, Sohee, KANG, Nam Kyu, KOH, Hyun Gi, et al., 2018. Enhancement of biomass and lipid productivity by overexpression of a bZIP transcription factor in Nannochloropsis salina. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 2018. Vol. 115, n° 2, p. 331-340. DOI 10.1002/bit.26465.

LANGFELDER, Peter et HORVATH, Steve, 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. In : *BMC Bioinformatics* [en ligne]. décembre 2008. Vol. 9, n° 1. [Consulté le 6 mai 2019]. DOI 10.1186/1471-2105-9-559. Disponible à l'adresse : https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-559.

LAZCANO, Antonio et PERETÓ, Juli, 2017. On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory. In : *Journal of Theoretical Biology*. 7 décembre 2017. Vol. 434, p. 80-87. DOI 10.1016/j.jtbi.2017.06.036.

LEPINIEC, Loïc, DEBEAUJON, Isabelle, ROUTABOUL, Jean-Marc, et al., 2006. GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF SEED FLAVONOIDS. In : *Annual Review of Plant Biology*. juin 2006. Vol. 57, n° 1, p. 405-430. DOI 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252.

LI, Pan-Song, YU, Tai-Fei, HE, Guan-Hua, et al., 2014. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. In : *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, n° 1, p. 1009. DOI 10.1186/1471-2164-15-1009.

MA, Yu-Han, WANG, Xiang, NIU, Ying-Fang, et al., 2014. Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom Phaeodactylum tricornutum. In : *Microbial Cell Factories*. 9 août 2014. Vol. 13, n° 1, p. 100. DOI 10.1186/s12934-014-0100-9.

MATSUNAGA, Tadashi, TAKEYAMA, Haruko, NAKAO, Takashi et YAMAZAWA, Akira, 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. In : *Journal of Biotechnology*. 1999. p. 6.

MAYFIELD, Stephen P. et FRANKLIN, Scott E., 2005. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. In : *Vaccine*. 7 mars 2005. Vol. 23, n° 15, p. 1828-1832. DOI 10.1016/j.vaccine.2004.11.013.

MCCARTHY, Ryan L., ZHONG, Ruiqin, FOWLER, Scott, et al., 2010. The Poplar MYB Transcription Factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are Involved in the Regulation of Secondary Wall Biosynthesis. In : *Plant and Cell Physiology*. 1 juin 2010. Vol. 51, n° 6, p. 1084-1090. DOI 10.1093/pcp/pcq064.

MCFADDEN, Geoffrey I., 1999. Plastids and Protein Targeting1. In : *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999. Vol. 46, n° 4, p. 339-346. DOI 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04613.x.

MENDES, Ana, REIS, Alberto, VASCONCELOS, Rita, GUERRA, Pedro et LOPES DA SILVA, Teresa, 2009. Crypthecodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review. In : *Journal of Applied Phycology*. avril 2009. Vol. 21, n° 2, p. 199-214. DOI 10.1007/s10811-008-9351-3.

MILLER, Rachel, WU, Guangxi, DESHPANDE, Rahul R., et al., 2010. Changes in Transcript Abundance in Chlamydomonas reinhardtii following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. In : *Plant Physiology*. 1 décembre 2010. Vol. 154, n° 4, p. 1737-1752. DOI 10.1104/pp.110.165159.

MITSUDA, Nobutaka et OHME-TAKAGI, Masaru, 2009. Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. In : *Plant and Cell Physiology*. 1 juillet 2009. Vol. 50, n° 7, p. 1232-1248. DOI 10.1093/pcp/pcp075.

MIYAHARA, Mado, AOI, Masaki, INOUE-KASHINO, Natsuko, KASHINO, Yasuhiro et IFUKU, Kentaro, 2013. Highly Efficient Transformation of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* by Multi-Pulse Electroporation. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 23 avril 2013. Vol. 77, n° 4, p. 874-876. DOI 10.1271/bbb.120936.

MSANNE, Joseph, XU, Di, KONDA, Anji Reddy, CASAS-MOLLANO, J. Armando, AWADA, Tala, CAHOON, Edgar B. et CERUTTI, Heriberto, 2012. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae Chlamydomonas reinhardtii and Coccomyxa sp. C-169. In : *Phytochemistry*. 1 mars 2012. Vol. 75, p. 50-59. DOI 10.1016/j.phytochem.2011.12.007.

RASTOGI, Achal, MAHESWARI, Uma, DORRELL, Richard G., et al., 2018. Integrative analysis of large scale transcriptome data draws a comprehensive landscape of Phaeodactylum tricornutum genome and evolutionary origin of diatoms. In : *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2018. Vol. 8, n° 1. [Consulté le 29 mars 2019]. DOI 10.1038/s41598-018-23106-x. Disponible à l'adresse : http://www.nature.com/articles/s41598-018-23106-x.

RASTOGI, Achal, MURIK, Omer, BOWLER, Chris et TIRICHINE, Leila, 2016. PhytoCRISP-Ex: a web-based and stand-alone application to find specific target sequences for CRISPR/CAS editing. In : *BMC Bioinformatics* [en ligne]. décembre 2016. Vol. 17, n° 1. [Consulté le 8 juin 2019]. DOI 10.1186/s12859-016-1143-1. Disponible à l'adresse : http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-016-1143-1.

RATH, BISWAJIT, 2012. Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. In : *Journal of Biochemical Technology*. 2012. Vol. 3, n° 3, p. 299–304.

RAYKO, Edda, MAUMUS, Florian, MAHESWARI, Uma, JABBARI, Kamel et BOWLER, Chris, 2010. Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles. In : *New Phytologist*. octobre 2010. Vol. 188, n° 1, p. 52-66. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03371.x.

SALOMON, Michael, CHRISTIE, John M., KNIEB, Elke, LEMPERT, Ulrika et BRIGGS, Winslow R., 2000. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. In : *Biochemistry*. 2000. Vol. 39, n° 31, p. 9401–9410.

SCHARF, Klaus-Dieter, BERBERICH, Thomas, EBERSBERGER, Ingo et NOVER, Lutz, 2012. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. In :

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. février 2012. Vol. 1819, n° 2, p. 104-119. DOI 10.1016/j.bbagrm.2011.10.002.

SCHONKNECHT, G., CHEN, W.-H., TERNES, C. M., et al., 2013. Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. In : *Science*. 8 mars 2013. Vol. 339, n° 6124, p. 1207-1210. DOI 10.1126/science.1231707.

STRACKE, Ralf, ISHIHARA, Hirofumi, HUEP, Gunnar, et al., 2007. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. In : *The Plant Journal*. 2007. Vol. 50, n° 4, p. 660-677. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x.

SUN, J., JIANG, H., XU, Y., LI, H., WU, X., XIE, Q. et LI, C., 2007. The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF1 and AtSZF2 Regulate Salt Stress Responses in Arabidopsis. In : *Plant and Cell Physiology*. 27 juin 2007. Vol. 48, n° 8, p. 1148-1158. DOI 10.1093/pcp/pcm088.

TAKAHASHI, F., YAMAGATA, D., ISHIKAWA, M., et al., 2007. AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 4 décembre 2007. Vol. 104, n° 49, p. 19625-19630. DOI 10.1073/pnas.0707692104.

TALEB, Aumaya, 2015. *Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs* [en ligne]. thesis. S.l. : Nantes. [Consulté le 6 juin 2019]. Disponible à l'adresse : http://www.theses.fr/2015NANT2007.

THIRIET-RUPERT, Stanislas, 2017. Etude des facteurs de transcription impliqués dans l'accumulation lipidique en condition de stress azoté chez la microalgue haptophyte Isochrysis affinis galbana. In : [en ligne]. 10 janvier 2017. [Consulté le 6 juin 2019]. Disponible à l'adresse : https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01648362.

WANG, Dong, GUO, Yinghui, WU, Changai, YANG, Guodong, LI, Yingying et ZHENG, Chengchao, 2008. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. In : *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9, n° 1, p. 44. DOI 10.1186/1471-2164-9-44.

XUE, Gang-Ping, SADAT, Shahab, DRENTH, Janneke et MCINTYRE, C. Lynne, 2014. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. In : *Journal of Experimental Botany*. février 2014. Vol. 65, n° 2, p. 539-557. DOI 10.1093/jxb/ert399.

YUAN, Jian-Ping, PENG, Juan, YIN, Kai et WANG, Jiang-Hai, 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. In : *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011. Vol. 55, n° 1, p. 150-165. DOI 10.1002/mnfr.201000414.

ZASLAVSKAIA, Lioudmila A., LIPPMEIER, J. Casey, KROTH, Peter G., GROSSMAN, Arthur R. et APT, Kirk E., 2000. Transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. In : *Journal of Phycology*. 2000. Vol. 36, n° 2, p. 379-386. DOI 10.1046/j.1529-8817.2000.99164.x.

ZHANG, Chunye et HU, Hanhua, 2014. High-efficiency nuclear transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum by electroporation. In : *Marine Genomics*. 1 août 2014. Vol. 16, p. 63-66. DOI 10.1016/j.margen.2013.10.003.

ZHU, Bao-Hua, ZHANG, Rui-Hao, LV, Na-Na, YANG, Guan-Pin, WANG, Yi-Sheng et PAN, Ke-Hou, 2018. The Role of Malic Enzyme on Promoting Total Lipid and Fatty Acid Production in Phaeodactylum tricornutum. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2018. Vol. 9. [Consulté le 13 juin 2019]. DOI 10.3389/fpls.2018.00826. Disponible à l'adresse : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00826/full.

Annexe 1

Milieu de culture F/2 N^+ pour *Phaeodactylum tricornutum*.

Composé	Concentration finale	Quantité pour 1L de F/2
Eau distillée		950 mL
NaCl	0,46 M	27,0 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	27 mM	6,6 g
$MgCl_2$, $6H_2O$	28 mM	5,6 g
$CaCl_2$, $2H_2O$	10 mM	1,5 g
KNO_3	9,9 mM	1,0 g
KH_2PO_4	0,514 mM	0,07 g
$NaHCO_3$	0,476 mM	0,04 g
Tampon TRIS pH 7,6 1 M	20 mM	20 mL

Complémentation :

Composé	Concentration finale	Solution stock	Volume de solution stock pour 1 L de F/2
$NaNO_3$	75,0 mg/L	75,0 g/L	1,0 mL
NaH_2PO_4, $2H_2O$	5,0 mg/L	5,0 g/L	1,0 mL
Solution de trace de métaux	Voir après		1,0 mL
$Na2SiO_3$, $9H_2O$	30,0 mg/L	30,0 g/L	1,0 mL
$2H_2O$ qsp			1 L

Solution de trace de métaux :

Composé	Solution stock	Quantité pour 1L
$FeCl_3$, $6H_2O$	11,65 mM	3,15 g
Na2EDTA, $2H_2O$	11,71 mM	4,36 g
$CuSO_4$, $5H_2O$	9,8 g/L	1,0 mL
$Na2MoO_4$, $2H_2O$	6,3 g/L	1,0 mL
$ZnSO_4$, $7H_2O$	22,0 g/L	1,0 mL
$CoCl_2$, $6H_2O$	10,0 g/L	1,0 mL
$MnCl_2$, $4H_2O$	180,0 g/L	1,0 mL

Solution stock de vitamine :

Composé	Solution stock	Quantité pour 1L
Vitamine B12	1,0 g/L	1 mL
Biotine	0,1 g/L	10,0 mL
Thiamine HCl		200,0 mg

La solution de vitamine est stérilisée par filtration avec une filtre de 0,2 µm et est stockée à -20°C.

Dans le milieu F/2 N^+ sont ajoutées les solutions de complémentation et 700 mL sont autoclavés dans une bouteille d'un litre, à 121°C pendant 20 minutes.

Stérilement, 350 µL de solution de vitamine sont ajoutés pour 700 mL de F/2.

Annexe 2

Milieu de culture F/2 N^- pour *Phaeodactylum tricornutum*.

Composé	Concentration finale	Quantité pour 1L de F/2
Eau distillée		950 mL
NaCl	0,46 M	27,0 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	27 mM	6,6 g
$MgCl_2$, $6H_2O$	28 mM	5,6 g
$CaCl_2$, $2H_2O$	10 mM	1,5 g
KCl	9,9 mM	1,0 g
KNO_3	0 mM	0 g
KH_2PO_4	0,514 mM	0,07 g
$NaHCO_3$	0,476 mM	0,04 g
Tampon TRIS pH 7,6 1 M	20 mM	20 mL

Complémentation :

Composé	Concentration finale	Solution stock	Volume de solution stock pour 1 L de F/2
$NaNO_3$	0 mg/L	0 g/L	0 mL
NaH_2PO_4, $2H_2O$	5,0 mg/L	5,0 g/L	1,0 mL
Solution de trace de métaux	Voir après		1,0 mL
$Na2SiO_3$, $9H_2O$	30,0 mg/L	30,0 g/L	1,0 mL
$2H_2O$ qsp			1 L

Solution de trace de métaux :

Composé	Solution stock	Quantité pour 1L
$FeCl_3$, $6H_2O$	11,65 mM	3,15 g
Na2EDTA, $2H_2O$	11,71 mM	4,36 g
$CuSO_4$, $5H_2O$	9,8 g/L	1,0 mL
$Na2MoO_4$, $2H_2O$	6,3 g/L	1,0 mL
$ZnSO_4$, $7H_2O$	22,0 g/L	1,0 mL
$CoCl_2$, $6H_2O$	10,0 g/L	1,0 mL
$MnCl_2$, $4H_2O$	180,0 g/L	1,0 mL

Solution stock de vitamine :

Composé	Solution stock	Quantité pour 1L
Vitamine B12	1,0 g/L	1 mL
Biotine	0,1 g/L	10,0 mL
Thiamine HCl		200,0 mg

La solution de vitamine est stérilisée par filtration avec une filtre de 0,2 µm et est stockée à -20°C.

Dans le milieu F/2 N^- sont ajoutées les solutions de complémentation et 700 mL sont autoclavés dans une bouteille d'un litre, à 121°C pendant 20 minutes.

Stérilement, 350 µL de solution de vitamine sont ajoutés pour 700 mL de F/2.

Annexe 3

Tableau des couples d'enzymes avec leur tampon utilisés pour chaque FT en fonction de la technique : surexpression (OE) ; sous-expression (SI).

FT ciblé et technique utilisée	Couple d'enzyme de restriction	Tampon utilisé
Auréochrome 2 OE	KpnI / XbaI	10X NEBuffer 2.1
CCCH11 OE	BamHI / SalI	10X NEBuffer 3.1
HSF1.3b OE	BamHI / SalI	10X NEBuffer 3.1
HSF4.3b OE	XbaI / BamHI	10X NEBuffer 3.1
MYB1RSF3 OE	KpnI / SphI	10X NEBuffer 1.1
TAZ2 OE	KpnI / XbaI	10X NEBuffer 2.1
Auréochrome 2 SI	SbfI / KpnI	10X NEBuffer 1.1
CCCH11 SI	SbfI / BamHI	10X CutSmart Buffer
HSF1.3b SI	SbfI / SalI	10X CutSmart Buffer
HSF4.3b SI	SbfI / SphI	10X CutSmart Buffer
MYB1RSF3 SI	SbfI / SphI	10X CutSmart Buffer
TAZ2 SI	SbfI / SphI	10X CutSmart Buffer

Annexe 4

Préparation du milieu SOC pour les bactéries.

Tableau de la préparation d'un litre de milieu SOB.

Composés	Masse (en g)
Bacto-tryptone	20
Bacto-yeast extract	5
NaCl	O,5
KCl	0,186

Le milieu SOB est ensuite autoclavé et sert à la préparation du milieu SOC. Les ajouts de solutions de complément sont fait stérilement sous hôte.

Deux solutions sont ajoutées au milieu SOB :

- Glucose 2M (1 mL pour 100 mL). Cette solution est stérilisée par filtration sur 0,22 µm.
- Mg^{2+} (1 mL pour 100 mL). Cette solution est stérilisée par filtration sur 0,22 µm.

Suite à l'ajout de ces deux solutions dans le milieu SOB, le milieu SOC est obtenu.

Annexe 5

Préparation de la solution froide pour bactéries compétentes.

Tableau de préparation de la solution froide pour bactéries compétentes.

Composés	Volume ou masse à prélever
$CaCl_2$ 4M	1 mL
$MnCl_2$ 1M	1 mL
$MgCl_2$ 0,5M	1 mL
Acétate de potassium 98g/mole	49,1 mg
Glycérol	5 mL
H_2O	Qsp 50 mL

Le mélange est homogénéisé par flux et reflux, puis filtré sur 0,22 µm. Cette solution est conservée à 4°C pendant le protocole de bactérie chimio-compétente. Cette solution doit être préparée juste avant de réaliser ce protocole.

Annexe 6

Milieu L1 pour Phaeodactylum tricornutum.

1. Eau de mer (origine Banyuls).
2. Laisser l'eau vieillir pendant 2 mois à température ambiante.
3. Mélanger 900 mL d'eau de mer vieillie avec 100 mL d'eau ultra pure. Répartir 2 X 500 mL.
4. Autoclaver 25 minutes à 121°C.
5. Ajouter les solutions de nutriments filtrées sur 0.22 µm :
    - P 500 µL / 500 mL
    - N 500 µL / 500 mL
    - Métaux 500 µL / 500 mL
6. Stocker à témpérature ambiante.
7. Avant utilisation ajouter :
    - Vitamine F/2 (250 µL / 500 mL)

	Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosciences Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal Option : Physiologie moléculaire et adaptation aux stress Responsable d'option : Alain BOUCHEREAU

Auteur(s) : Romain PERDOUX Date de naissance* : 21/10/1996	Organisme d'accueil : Laboratoire Mer, Molécule, Santé – Le Mans Université UFR Science et Technique Adresse : Avenue Olivier Messiaen, 72085 LE Mans ; FRANCE Maître de stage : Justine MARCHAND
Nb pages : 25 Annexe(s) : 6	
Année de soutenance : 2019	

Titre français : Modification génétique des facteurs de transcription chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Titre anglais : Genetic modification of transcription factors in *Phaeodactylum tricornutum*.

Résumé (1600 caractères maximum) :

Les microalgues sont des organismes d'intérêt pour la production de biocarburants car en condition de stress, elles produisent des triglycérides qui peuvent être transformés en biodiesel ou biokérosène. Fabriquer des biocarburants à partir de microalgues relève cependant encore de l'expérience de laboratoire, notamment en raison des coûts de production beaucoup trop élevés. Mon stage s'insère dans un axe de recherche qui consiste à modifier génétiquement la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*. Il s'agit notamment de la modifier en surexprimant, sous-exprimant ou inactivant les gènes codant des facteurs de transcription (FTs) potentiellement impliqués dans la production de lipides. Le but de ce stage a été de : 1) sélectionner les FTs présentant une expression différentielle marquée en condition de stress azoté ; 2) construire les plasmides recombinés pour ces candidats en utilisant différentes méthodes de recombinaison génétique (surexpression, sous-expression et inactivation (KO)) ; 3) réaliser des transformations par électroporation et conjugaison bactérienne. L'analyse des données de séquençage ARN a fait ressortir 7 candidats appartenant à 5 familles (auréochromes, CCCH, HSF, MYB et TAZ). Deux constructions plasmidiques pour les méthodes de sur et sous-expression ont été réalisées avec succès et la microalgue transformée par électroporation. Les résultats ne sont à ce jour pas connus. Les plasmides pour la méthode de KO ont été construits par « Golden Gate » et ont été utilisés dans la technique de transformation par conjugaison. Les résultats indiquent la présence de colonies de *Pt* résistantes à la zéocine sur les boîtes de Pétri, confirmant la présence du plasmide PtPuc3-diaCas9 recombiné dans la microalgue. Des analyses biochimiques des mutants dans différentes conditions sont maintenant à effectuer.

Abstract (1600 caractères maximum) :

Microalgae are organisms of interest for biofuel production because under stress conditions they produce triglycerides that can be transformed into biodiesel or biokerosene. However, producing biofuels from microalgae is still a laboratory experiment, particularly because of the excessively high production costs. My internship is part of a research project that consists of genetically modifying the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. This includes modifying it by over-expressing, under-expressing or inactivating genes encoding transcription factors (TFs) potentially involved in lipid production. The purpose of this internship was to: 1) select TFs with marked differential expression under nitrogen stress conditions; 2) construct recombinant plasmids for these candidates using different genetic recombination methods (overexpression, silencing and knock-out (KO)); 3) perform transformations by electroporation and bacterial conjugation. Analysis of the RNA sequencing data revealed 7 candidates from 5 families (aureochrome, CCCH, HSF, MYB and TAZ). Two plasmid constructions for over- and under-expression methods have been successfully realized and the microalgae transformed by electroporation. The results are not yet available. Plasmids for the KO method were constructed by "Golden Gate" and were used in the conjugation transformation technique. The results indicate the presence of zeocin-resistant Pt colonies on petri dishes, confirming the presence of the recombinant plasmid PtPuc3-diaCas9 in the microalgae. Biochemical analyses of mutants under different conditions are now required.

Mots-clés : Microalgue ; Facteur de transcription ; Transformation ; Plasmide ; Expression

Key Words: Microalgae ; Transcription factor ; Transformation ; Plasmid ; Expression

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires*