

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Licence Biologie des Organismes

**CARACTÉRISATION DES PROCESSUS
RYTHMIQUES DÉPENDANTS DE LA LUMIÈRE
DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN**

OYARZUN Gorka

**Stage effectué du 05/03/2012 au 05/05/2012
A l'UMR 7238 Génomique des Microorganismes CNRS – UPMC
15, rue de l'école de médecine 75006 Paris, France
Sous la direction du Dr Angela Falciatore et co-direction du Dr Antonio Emidio
Fortunato**



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Licence Biologie des Organismes

**CARACTÉRISATION DES PROCESSUS
RYTHMIQUES DÉPENDANTS DE LA LUMIÈRE
DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN**

OYARZUN Gorka

Stage effectué du 05/03/2012 au 05/05/2012
A l'UMR 7238 Génomique des Microorganismes CNRS – UPMC
15, rue de l'école de médecine 75006 Paris, France
Sous la direction de Dr Angela Falciatore et co-direction du Dr Antonio Emidio Fortunato



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Angela Falciatore, chef de l'unité de Génomique des Diatomées de m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que pour son aide et ses conseils précieux qui m'ont grandement fait progresser.

Je souhaite également adresser un grand remerciement au Dr Antonio Emidio Fortunato pour son encadrement, son altruisme, sa disponibilité, sa patience et les responsabilités qu'il m'a confiées.

Je voudrais ensuite remercier le Dr Alessandra Rogato et le Dr Soizic Cheminant, pour leurs conseils, leurs explications et l'attention qu'elles ont portée à mon travail.

Je remercie Frauke Depauw et My-Hai Ha, pour leurs conseils, leur aide dans les différentes tâches qui m'ont été confiées et leur gentillesse.

Enfin, un grand merci à toutes les équipes du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur contribution au bon déroulement de mon stage.

Table des matières

♦ Introduction.....	6
♦ Matériel et méthodes.....	10
1. Etude du rythme circadien chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10
Conditions de culture des écotypes.....	10
Expérience circadienne.....	10
Méthode d'échantillonnage.....	10
Analyse des échantillons.....	11
2. Création de lignées transgéniques avec le gène <i>LUC+</i>	12
Transformation de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> par Biolistique.....	12
Extraction de l'ADN des diatomées pour une PCR colonie.....	13
♦ Résultats et discussions.....	14
1. Etude du rythme circadien chez les différents écotypes de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	14
Premier gène candidat : <i>GapDH C1</i>	15
Second gène candidat : <i>Cpf1</i>	17
2. Création de lignées transgéniques avec le gène <i>LUC+</i>	17
♦ Conclusions générales.....	21
♦ Références bibliographiques.....	22
♦ Annexes.....	24

Introduction

La rotation de la Terre sur son axe et son inclinaison produisent l'alternance jour/nuit (rythme nycthéméral) et les changements saisonniers, ce qui provoque la variabilité de la durée du jour et de l'intensité lumineuse. Ces variations périodiques et prévisibles ont conduit à l'évolution d'un rythme biologique omniprésent dans les différents règnes du vivant : le rythme circadien, produit par un procédé nommé horloge circadienne.

L'horloge circadienne est un mécanisme endogène qui permet de coordonner l'organisation temporelle des procédés biologiques d'un organisme à différents moments de la journée ou de la nuit. Cela permet d'obtenir une meilleure utilisation des ressources énergétiques, et surtout d'anticiper le début des changements environnementaux, conférant ainsi un réel avantage adaptatif (Hogenesch *et al.*, 2011). De plus, l'étude de l'horloge circadienne a démontré qu'une grande partie du génome des organismes végétaux était réglée de façon circadienne, témoignant de l'importance de ce rythme dans la physiologie des organismes (Doherty *et al.*, 2010)

Même chez les organismes pluricellulaires, chaque cellule possède une horloge et produit des rythmes cycliques qui produisent des oscillations dans l'expression génique ou le métabolisme selon le moment de la journée. C'est d'ailleurs le cas de nombreux procédés cellulaires qui peuvent manifester ce type de comportement. Il existe cependant quatre propriétés principales permettant de différencier un rythme de type circadien d'un autre cycle cellulaire :

- il faut que le rythme soit d'environ 24 heures, qu'il soit capable de s'auto-maintenir et de persister en l'absence de stimuli
- il faut un système « d'input » exogène ou endogène synchronisant l'horloge
- il faut un système de compensation de température afin d'éviter que l'activité de l'horloge soit augmentée ou diminuée en fonction de la température environnementale
- il faut de la robustesse ; d'une part au niveau génétique, pour accommoder les mutations qui surviendraient sur des composants de l'horloge, et d'autre part au niveau environnemental, pour éviter que des perturbations inhabituelles et ponctuelles ne dérèglent l'horloge.

Structurellement, on distingue trois composantes dans une horloge circadienne : « l'input », l'oscillateur et « l'output ». L'input assure la transmission de l'ensemble des facteurs exogènes (lumière, température) et endogène (état redox de la cellule) à l'oscillateur. L'oscillateur est la composante essentielle de l'horloge, capable de produire des oscillations de manière autonome grâce à la régulation de « clock genes ». Cette régulation se fait de manière plus fine grâce aux signaux environnementaux qui modulent le rythme des oscillateurs. La réponse générée par l'oscillateur constitue l'output que l'on retrouve principalement sous la forme de changement de l'expression génique, du comportement ou du métabolisme. Ce système est en réalité plus complexe car l'input, l'oscillateur et l'output ne forment pas une suite de mécanismes ; l'output peut avoir une influence sur l'oscillateur, et l'oscillateur peut avoir une influence sur l'input, grâce à des mécanismes de rétrocontrôle (Harmer, 2009, Zhang *et al.*, 2010). (Fig 1)

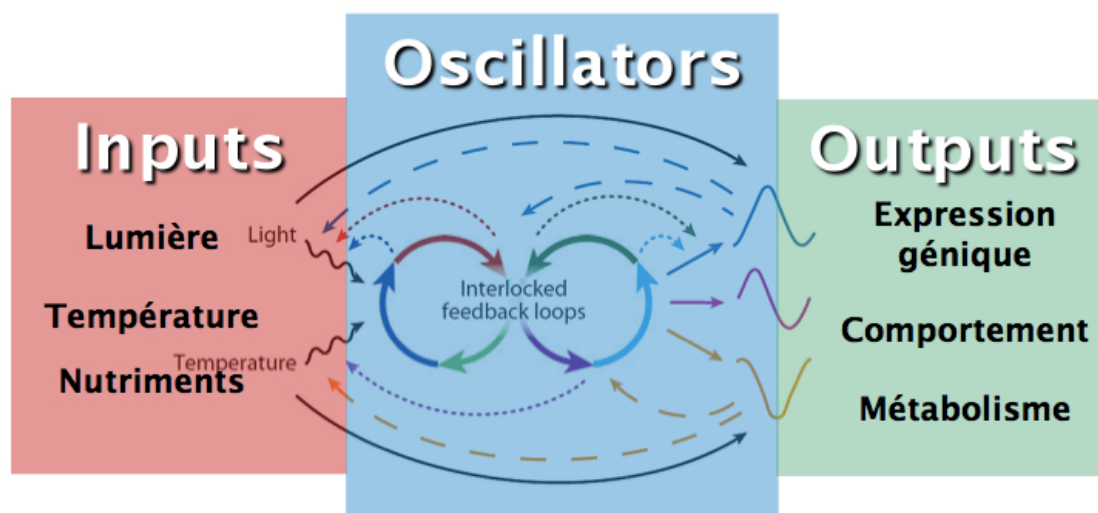


Figure 1. Représentation schématique d'une horloge circadienne et de ses trois composantes principales : l'input, l'oscillateur et l'output (modifié depuis Harmer *et al.* 2009)

À ce jour, deux mécanismes permettant de mesurer le temps et de produire des rythmes circadiens ont été identifiés. Il s'agit de l'oscillateur transcriptionnel/traductionnel (TTO) et l'oscillateur post-traductionnel (PTO). Le TTO est un système présent aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, qui a été découvert en premier et qui fonctionne globalement à travers des mécanismes de feedback négatifs entre les différents « clock genes ». Par exemple chez *Arabidopsis* le TTO fonctionne grâce à un oscillateur central produisant le rythme circadien et qui est plus finement régulé par deux autres oscillateurs plus actifs selon les heures du jour. Le fait d'avoir plusieurs oscillateurs qui interagissent entre eux permet une meilleure flexibilité et robustesse du TTO (Pruneda-Paz *et al.*, 2010) (Annexe 1). Il est intéressant de noter que chez les différents organismes, les TTO possèdent un mécanisme central basé sur un feedback négatif très conservé alors que les composants (clock genes) peuvent être différents (Zhang *et al.*, 2010). Le PTO qui a été identifié initialement chez les cyanobactéries, il s'agit d'un procédé post traductionnelle caractérisé par l'autophosphorylation cyclique de la protéine KaiC. Il a été démontré que le PTO chez les cyanobactéries permettait de réguler l'activité de tous les promoteurs en agissant sur le superenroulement du nucléoïde (Hosokawa *et al.*, 2011). Récemment des PTO ont été également découverts chez des eucaryotes tel que *Ostreococcus tauri* et *Homo sapiens* (O'Neill *et al.*, 2011). Ces PTO reposent sur le cycle de sulphonylation de la Peroxiredoxine qui persiste même en l'absence de transcription.

Les premiers comportements de type circadien seraient apparus il y a 500 millions d'années durant l'explosion Cambrienne, notamment chez les premiers organismes photosynthétiques marins vivant dans la colonne d'eau. Ces derniers réalisaient des migrations verticales afin d'échapper à la lumière et de limiter les effets néfastes des UV sur leur ADN. Ce type de migration aurait co-évolué avec l'apparition de photolyases, capables d'utiliser la lumière bleue pour réparer les dommages causés par les UV sur l'ADN, préfigurant ainsi l'apparition des photorécepteurs tel que les cryptochromes (Eran Tauber *et al.*, 2004).

Actuellement, dans les océans, les microorganismes photosynthétiques vivant dans la zone photique réalisent environ la moitié de la production primaire terrestre et influencent la composition de l'atmosphère. Les cyanobactéries et les microalgues, que l'on regroupe dans le phytoplancton, sont les principaux acteurs de la photosynthèse en milieu marin et ont de ce fait un rôle essentiel dans la chaîne alimentaire. Ce rôle s'étend aux processus d'acidification des Océans et même à la régulation du climat. Il semble donc particulièrement intéressant d'étudier le phytoplancton pour comprendre les impacts à long terme des changements climatiques en cours sur son développement (Field *et al.*, 1998)

Parmi les différents groupes du phytoplancton, on distingue les Diatomées qui sont des microalgues eucaryotes très représentées dans les Océans. En effet, depuis leur radiation il y a environ 180 millions d'années, les diatomées se sont imposées comme le groupe le plus diverse du phytoplancton, avec entre 10^5 et 10^6 espèces aux formes et tailles très variables. Elles réalisent environ 20% de l'assimilation du CO_2 terrestre et participent activement aux cycles biogéochimiques du Silicium, de l'Azote et du Carbone. Elles sont donc primordiales, d'un point de vue écologique, dans les océans contemporains (Virginia Armbrust, 2009 Depauw *et al.*, 2012)

Ces algues unicellulaires présentent également des caractéristiques qui font d'elles un groupe unique du phytoplancton. En effet, elles sont issues d'une endosymbiose secondaire entre un eucaryote hétérotrophe et une algue rouge (Bowler *et al.*, 2008) et possèdent une paroi cellulaire qui est essentiellement composée de Silice ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Armbrust, 2009). Les diatomées disposent d'une grande faculté d'adaptation car elles sont présentes dans tous les océans et toutes les mers du globe, dans des conditions environnementales parfois extrêmes. Les diatomées dominent le phytoplancton dans les zones de remontée d'eau froide et peuvent se développer dans des milieux fortement perturbés par la houle et les courants (Margalef, 1978). Cette plasticité est à mettre en relation avec leur large succès écologique dans les océans (Ragni *et al.*, 2007).

Il a été démontré que les diatomées présentaient des comportements de type circadien, sans toutefois posséder de « clock genes » canonique appartenant à un système TTO ou PTO, à l'exception des cryptochromes (Owens *et al.*, 1980). Chez un grand nombre d'organisme les cryptochromes sont des composants essentiels de l'horloge circadienne. Cependant chez les diatomées ils participent également à la photoréactivation et ont un rôle de photorécepteur de la lumière bleue (Coesel *et al.*, 2009).

Ce qui nous amène à la question suivante : la présence d'un rythme circadien particulier pourrait-il être l'une des raisons de la grande plasticité adaptative des diatomées, à l'origine de leur large succès évolutif ?

Pour tenter de répondre à cette question et d'étudier les rythmes circadiens chez les diatomées, nous disposons d'une espèce modèle : *Phaeodactylum tricornutum*. Son génome a été entièrement séquencé récemment (Bowler *et al.*, 2008) et ses outils génétiques sont bien maîtrisés pour réaliser des lignées transgéniques sur- ou sous-exprimantes (De Riso *et al.*, 2009). C'est une espèce pennée et pleiomorphique qu'on retrouve sous la forme de trois morphotypes : fusiforme, oval et triradiaire, en fonction des conditions de stress extérieures (Fig 1a). Cette plasticité de forme est liée au fait que *P. tricornutum* possède une paroi cellulaire peu silicifiée comparée aux autres diatomées, ce qui la rend facilement cultivable dans des milieux pauvres en Silice. Cette espèce présente une grande diversité au niveau populationnel, avec au total 10 écotypes recensés à travers le monde, pouvant être regroupés en 4 génotypes grâce à l'analyse des régions ITS2 de chaque écotipe (Fig 1b) (De Martino *et al.*, 2007). Chaque génotype possède un écotipe de référence :

- Génotype A = Pt1
- Génotype B = Pt4
- Génotype C = Pt5
- Génotype D = Pt8

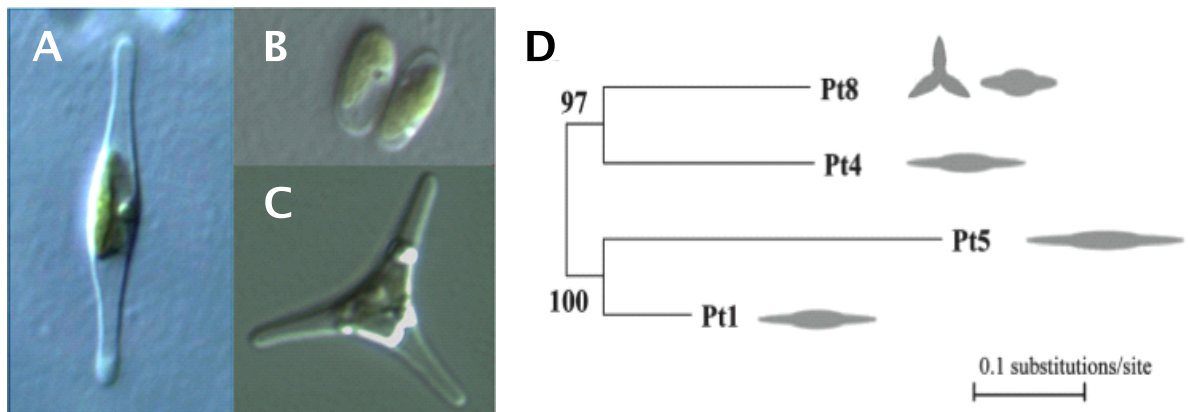


Figure 2 : Les différents morphotypes de *Phaeodactylum tricornutum* à gauche fusiforme (A), en haut à droite oval (B) et en bas à droite triradiaire (C). Arbre phylogénétique (D) basé sur la méthode de « neighbor joining » sur l'analyse des régions ITS2 (De Martino *et al.*, 2007)

Durant mon stage j'ai rejoint l'un des projets en cours du laboratoire dont l'objectif est de caractériser et d'identifier les composants de l'horloge circadienne chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Pour cela j'ai travaillé sur un premier point qui était l'étude du rythme circadien chez les différents écotypes de *P. tricornutum*. Des manipulations précédentes nous ont permis d'identifier des gènes candidats pour l'étude circadienne de l'expression génique chez cette espèce. De plus ces expériences réalisées sur les écotypes Pt1 et Pt4 ont montré par comparaison de l'expression génique que l'écotype Pt4 semblait présenter un rythme plus robuste que Pt1. Sachant qu'il existe plusieurs écotypes nous nous sommes donc intéressés à la question suivante : quel serait le meilleur écotype pour suivre le cycle circadien chez *Phaeodactylum tricornutum* ? Pour cela nous avons étudié l'expression génique de quatre écotypes Pt1, Pt4, Pt5 et Pt8 qui sont les représentants des 4 génotypes de *Phaeodactylum tricornutum* (Fig 2d).

Puis dans un deuxième temps nous avons travaillé à la création de lignée transgénique possédant le gène rapporteur codant pour la Luciférase. Ces lignées seront nécessaires pour détecter de manière plus pratique les cycles circadiens chez *P. tricornutum*. Mais également pour tester l'horloge circadienne de cette espèce dans plusieurs conditions de lumières : différentes longueurs d'ondes, différentes période lumière/obscurité et différentes intensités lumineuses.

Matériels & méthodes

1. Etude du rythme circadien chez les différents écotypes de *Phaeodactylum tricornutum*

➤ Conditions de cultures des écotypes

Les souches ont été cultivées en conditions axéniques, vérifiées par l'usage de test de contaminations, préparés avec du milieu F/2 et du tryptone à 10g/L. Les conditions de lumière utilisées pour la croissance normale étaient 40 μ Einstein (μ E) avec un régime de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurités.

Les différentes souches sauvages de *P. tricornutum* ont été récoltées :

- Pt1 : Blackpool, au Royaume Uni
- Pt4 : Segelskär en Finlande
- Pt5 : Golfe du Maine, USA
- Pt8 : Jericho Beach, Canada

Les différents écotypes sont cultivés dans de l'eau de mer artificielle (ASW), le milieu ASW utilisé était celui décrit dans Vartanian, M., *et al* (2009), il est obtenu en mélangeant plusieurs solutions (présentent dans le tableau en Annexe 1) et en y ajoutant de l'eau distillé pour compléter jusqu'au volume souhaité.

➤ Expérience circadienne

Tout d'abord l'Incubateur Weiss Fitotron SG-120 a été mis en place afin d'accueillir les Erlenmeyers, les points d'homogénéité d'intensité lumineuse sont repérés à l'aide d'un Luxmètre International Light System ILT-1400 avec cible SEL033/W pour s'assurer que chaque Erlenmeyers reçoivent la même intensité lumineuse de 40 μ E.

Les cultures sont pré-adaptées pendant 10 jours à un régime de 16h de lumières, à une intensité de 40 μ E et 8h d'obscurité. Puis chaque culture a été divisée en 3 Erlenmeyers contenant 400mL, la veille de l'expérimentation :

- Condition « diurne » c'est à dire un régime 16/8
- Condition de lumière continue
- Condition d'obscurité totale grâce à un emballage de papier aluminium et sac noir

➤ Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé le premier jour de conditions continues, à -1H avant la lumière et +1H +5H +9H après la lumière (cf schéma de la manip annexe). 80mL ont été prélevés de chaque Erlenmeyer qu'il convenait de filtrer à l'aide d'un filtre Whatman 589/2 afin de récupérer environ $1-2 \times 10^8$ cellules au totales, puis un lavage est effectué avec 30mL de Phosphate Salin Buffer (PBS) à pH 7,5 pour éliminer les sels. Immédiatement après le lavage, les filtres sont récupérés, coupés en deux, placés dans deux tubes afin d'obtenir un

réplica, et congelés dans de l'azote liquide afin de bloquer l'expression génique, les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Ces échantillons vont nous permettre de suivre l'expression génique de différents gènes, candidats pour être régulés de façon circadienne, le cryptochrome (*Cpfl*) et la glycéraldéhyde déshydrogénase (*GapDH CI*).

➤ Analyse des échantillons

L'extraction de l'ARN s'est faite avec 0,75mL de Trizol/Tripure (Roche) qui ont été ajoutés directement dans le tube contenant la moitié du filtre, puis à l'aide d'une pince à épiler stérile, les cellules ont été décollées du filtre. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante (RT), 200µL de Chloroforme sont ajoutés. Les tubes ont été mélangés pendant 15 secondes et incubés à RT pendant 15 minutes. Après une centrifugation de 15 minutes à 12000 rpm 4°C la phase supérieure contenant l'ARN est récupérée, placée dans un nouveau tube et ensuite précipitée avec 0,75 mL de 2-propanol. Les échantillons ont été incubés 10 minutes dans la glace et précipités après une centrifugation de 5 minutes à 12000 rpm à 4°C. Le surnageant a été retiré et le culot lavé avec 500µL de Ethanol 75%. Enfin le culot d'ARN a été séché à l'air et resuspendu dans 30µL d'H₂O ultrapure et dépourvu de RNase

La purification de l'échantillon d'ARN s'est faite en ajoutant 30µL de NH₄⁺ Acetate et 180µL de Ethanol à 100%, il a fallu ensuite centrifuger l'échantillon durant 30 minutes à 12000 rpm, 4°C puis retirer le surnageant et faire un lavage avec 500µL d'Ethanol à 75%. Enfin on retire le surnageant à la suite d'une centrifugation de 5 minutes à 7500 rpm, 4°C, on a séché l'échantillon dans un « speedy vac » et on a resuspendu l'ARN dans 30µL de H₂O ultrapure et sans RNase. La concentration en ARN sera estimée avec un nanophotomètre et vérifiée sur un gel d'agarose également pour déterminer l'intégrité de l'ARN.

L'ARN purifié obtenu a été rétrotranscrit en cDNA grâce à la Quantiscript Reverse Transcriptase (Qiagen). Une PCR pour le gène *Ckb2* avec les amorces qui dépassent sur l'intron a été effectuée afin de s'assurer de l'élimination de l'ADN génomique contaminant réalisé grâce au buffer gDNA wipeout du kit Qiagen. Puis une qPCR a été réalisée avec ce cDNA pour nos gènes candidats. Les gènes *rps* (Ribosomal Proteins) et *tbp* (TATA Binding Protein) serviront de références (gènes « housekeeping ») pour cette qPCR puisqu'ils sont exprimés de manière constante dans toutes les conditions. Pour chaque réaction, 1µL de cDNA est déposé sur une plaque de qPCR puis on y ajoute le mastermix composé de :

- 5µL de Sso Advanced SYBR Green (Bio-Rad) qui contient un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin et qui contient la Taq Polymerase, le Buffer et le MgCl₂ et aussi des dNTPs
- 0,2µL d'amorces Forward et Reverse spécifiques nos gènes candidats
- 3,6µL d'H₂O

La réaction de PCR a été réalisée avec des triplicats pour chaque point par échantillon, la plaque de qPCR a été placée dans la Real-Time PCR CFX-96 (Bio-Rad). Les résultats obtenus sont analysés en utilisant la méthode comparative des ΔC_t pour chaque point d'échantillonnage en utilisant la moyenne géométrique de l'expression des deux gènes

références pour normaliser les résultats. Dans une qPCR on s'intéresse à la phase exponentielle pour connaître la quantité d'ADN de départ, Le C_t correspond au Cycle threshold c'est à dire le cycle seuil à partir duquel la phase exponentielle est obtenue et cette méthode permet de comparer le C_t d'un gène référence avec le C_t du gène d'intérêt en condition de test par rapport à une condition de contrôle, en utilisant la différence (ΔC_t) entre le C_t du gène de référence et le C_t du gène d'intérêt pour chaque échantillon. A partir des valeurs de ΔC_t le ratio gène de référence/gène d'intérêt a été calculé ($2^{\Delta C_t}$) pour chaque échantillon donnant ainsi un niveau relatif d'ARN.

2. Création de lignées transgéniques avec le gène rapporteur *LUC+*

➤ Transformation de *Phaeodactylum tricornutum* par Biolistique

La transformation de *P. tricornutum* a été effectuée avec le protocole décrit par Falciatore *et al*, 1999, sur l'écotype Pt1. Une culture en phase de croissance exponentielle (environ 10^5 - 10^6 cellules/mL) a été récupérée lorsque leur concentration était d'environ $1-1,5 \times 10^6$ cellules/mL. Un total de 5×10^7 cellules ont été récupérées par centrifugation (3000 rpm, 15 minutes à RT) et ensuite disposé sur une boîte de pétri contenant du milieu Sea Water 50% F/2 –Si agar 1%. Ce milieu est obtenu selon le protocole modifié de Guillard *et al*, 1975, en mélangeant 1L d'eau de mer filtrée provenant de la station marine de Roscoff avec du NaNO_3 concentré 1mmol/L au final, du $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1mmol/L, du Trace Metals (CuSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2 et Na_2MoO_4) 1mmol/L, du Fe+EDTA 1mmol/L, du TRIZMA 2,5mmol/L et 1mL de vitamines (Thiaminnes, B12 et Biotine).

Deux types de constructions ont été utilisés pour la création de lignées transgéniques (les gènes candidats sont *GapDH C1* et *Lhcf2*).

- constructions pour mesurer l'activité transcriptionnelle avec le promoteur du gène candidat et le gène codant pour la Luciférase (*LUC+*, Promega)
- construction pour mesurer l'activité traductionnelle avec le promoteur du gène candidat, le gène candidat fusionné au gène codant pour la Luciférase

Ces constructions étaient déjà préparées au laboratoire avant mon arrivée ainsi que le plasmide contenant le gène de la résistance à la Phléomycine et les particules de Tungsten M17 (Bio-Rad).

Pour fixer l'ADN sur les particules de Tungsten M17 on ajoute tout en vortexant le tube contenant les particules et dans l'ordre suivant :

- 3μL de plasmide contenant la construction soit 3μg d'ADN
- 3μL de plasmide contenant le gène de la résistance à la Phléomycine soit 3μg d'ADN
- 50μL de CaCl_2 2,5M
- 20μL de spermidine, 0,1M

Puis le mélange est vortexé pendant 3 minutes afin de favoriser la fixation de l'ADN sur les particules de Tungsten. Après une centrifugation de 10s on retire le surnageant et on réalise un lavage avec 250μL d'EtOH à 100% puis on resuspend le mélange dans 60μL d'EtOH à 100%.

Tout les éléments nécessaires pour l'accélération des microprojectiles par le canon à ADN PDS-1000 / He System, Bio-Rad (Annexe 4) doivent être ensuite assemblé. Cet instrument utilise de l'hélium sous pression pour accélérer les microparticules à une vitesse optimale pour la transformation de *P. tricornutum*. Pour cela, il faut créer le vide dans la chambre de transformation puis augmenter la pression d'hélium à environ 1550 PSI jusqu'à ce que le «rupture disk» se brise et libère l'hélium. Cela aura pour effet de propulser une feuille «macroporteur» Bio-Rad sur laquelle est déposée des millions de particules de Tungsten recouvert d'ADN sur une grille. La grille va stopper la macroporteur mais laisser passer les microparticules vers la boîte de Pétri contenant les diatomées.

Après la transformation les cellules ont été mises à pousser dans une chambre de culture en lumière normale (environ 80-100µE de lumière blanche). 48 heures après la transformation les cellules sont récupérées et placées sur un milieu 50% F/2 -Si avec agar 1%, sélectif contenant 100µg/mL de Phléomycine. Seules les cellules possédant le plasmide avec le gène de la résistance à la Phléomycine pourront se développer. Cependant la co-transformation qui a été réalisée avec le plasmide contenant la résistance à la Phléomycine et avec le plasmide contenant la construction d'intérêt a une efficacité assez élevée, c'est à dire que les cellules transformées ont entre 80 et 90% de chance de posséder les deux constructions. Au bout de 4 semaines des colonies apparaissent et elles sont récupérées puis analysées par PCR colonie afin de s'assurer qu'elles possèdent bien la construction d'intérêt.

➤ Extraction de l'ADN des diatomées pour une PCR colonie

Pour réaliser l'extraction de l'ADN d'une colonie on place chaque colonie dans un tube contenant 20µL de Buffer de lyse. Après avoir laissé incuber durant 15 minutes dans la glace, les tubes sont portés à ébullition à 95°C puis dilués à 1 : 5 dans de l'eau. 5µL d'ADN sont utilisés pour chaque réaction de PCR pour un volume final de 25µL avec 2,5 µL de Buffer concentré 10X, 2,5 µL de MgCl₂ à 25mmol/L, 0,5 µL de dNTP à 10mmol/L, 0,15 µL de Taq Polymérase à 5U/µL et 1µL d'amorces forward et reverse à 10µmol/L adéquates pour chaque construction. Pour les constructions de types transcriptionnelles le fragment amplifié se situe entre le promoteur du gène candidat et le gène de la Luciférase, pour la construction de type traductionnelle le fragment amplifié se situe entre le gène candidat et le gène codant pour la Luciférase. Enfin on analyse les résultats pour chaque réaction de PCR sur un gel d'agarose à 1,5% avec 1,5µL de Bromure d'éthidium dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE.

Résultats & Discussions

1. Etude du rythme circadien chez les différents écotypes de *Phaeodactylum tricornutum*.

L'objectif de cette expérience est d'obtenir à travers les différents écotypes un système modèle robuste afin de suivre au mieux le rythme circadien chez *P. tricornutum*. Pour répondre à la problématique et savoir quel écotyle serait le plus intéressant pour l'étude des rythmes circadiens, nous avons placé nos cultures dans trois conditions expérimentales : un cycle diurne de 16 heures de lumières et 8 heures d'obscurités (LD) et deux conditions continues d'obscurité totale (DD) ou de lumière (LL) (voir schéma de la manipulation Annexe 2). Ces trois conditions vont nous permettre de comparer l'expression génique le premier jour de condition continue de deux gènes candidats pour être régulé de façon circadienne :

- La *glycéraldéhyde déshydrogénase* (*GapDH C1*) qui intervient dans le cycle de Calvin
- Le *cryptochrome 1* (*Cpfl*), qui chez *P. tricornutum* intervient dans la protoreception, la photoréactivation et est vraisemblablement un composant de l'horloge circadienne (Coesel *et al.*, 2009).

Les cellules collectées pendant l'échantillonnage ont été traitées comme décrit dans la Méthode (page 11) pour en extraire l'ARN. L'ARN obtenu a été analysé sur gel pour vérifier l'intégrité et ensuite testé par PCR pour s'assurer de l'absence d'ADN génomique. Enfin nous avons réalisé des qPCR pour nos gènes candidats normalisés grâce à deux gènes housekeeping *rps* et *tbp*.

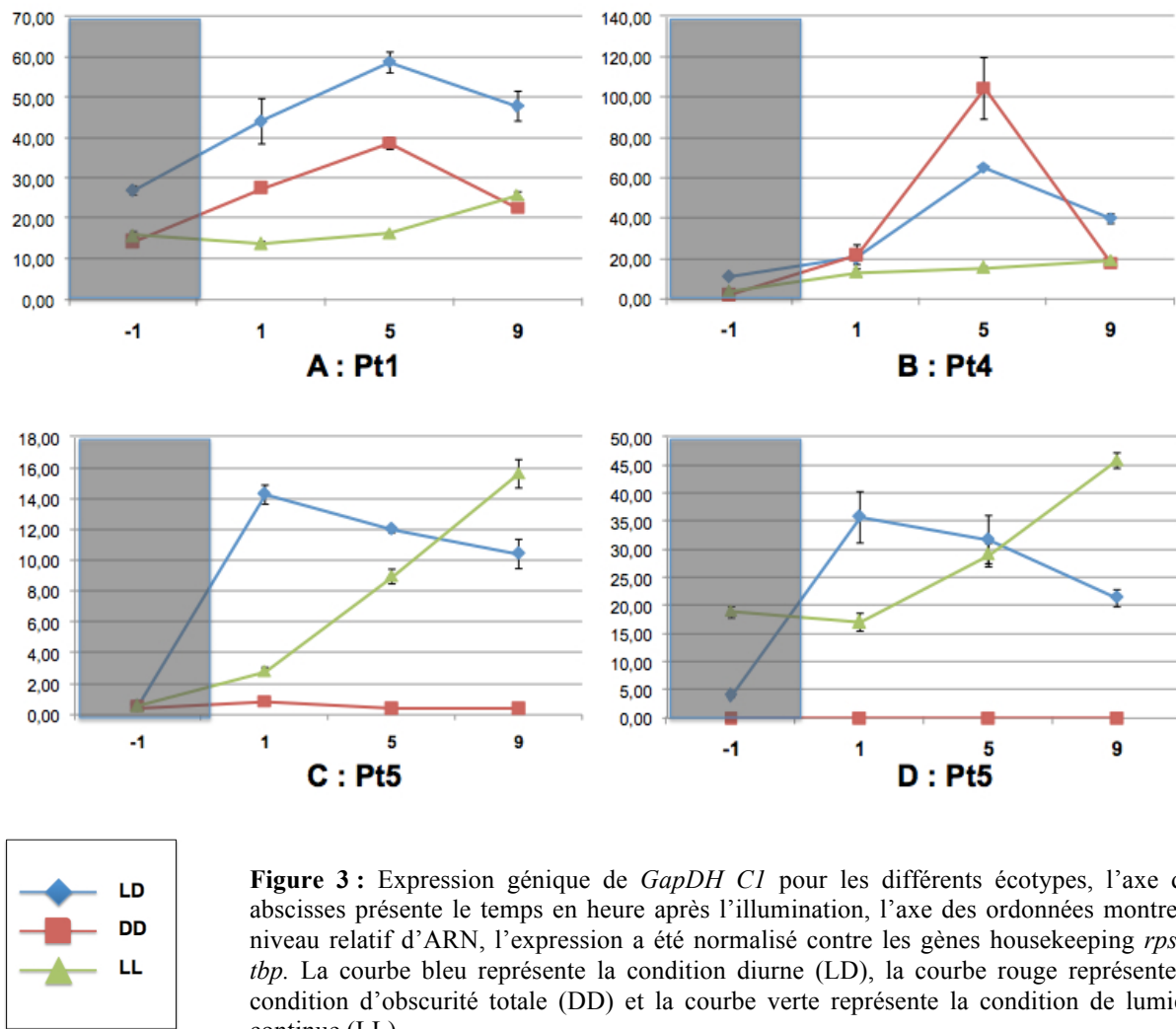


Figure 3 : Expression génique de *GapDH C1* pour les différents écotypes, l'axe des abscisses présente le temps en heure après l'illumination, l'axe des ordonnées montre le niveau relatif d'ARN, l'expression a été normalisée contre les gènes housekeeping *rps* et *tbp*. La courbe bleu représente la condition diurne (LD), la courbe rouge représente la condition d'obscurité totale (DD) et la courbe verte représente la condition de lumière continue (LL)

- Premier gène candidat : *GapDH C1*

Chez Pt1 (Fig 3.A), en condition normale (LD), ce gène a un pic d'expression génique 5 heures après l'allumage de la lumière. L'expression à +5 heures est maintenue en condition d'obscurité (DD). En condition de lumière continu (LL) l'expression génique reste faible et apparaît plus tardivement.

Le maintien de l'expression en condition DD peut se traduire par une mémoire d'expression de type circadienne. En effet la première propriété d'un rythme circadien est la persistance du rythme en l'absence de stimuli. On peut donc en déduire que ce gène est réglé de façon circadienne chez cette écotype. Cependant en lumière continu, la faible expression génique peut s'expliquer par la présence d'autres facteurs comme la photosynthèse ou l'activité du chloroplaste qui sont lié la lumière et qui réguleraient le gène *GapDH C1*. Ces résultats sont en encore avec les expérimentations précédentes chez Pt1 ce qui confirme la régulation de type circadienne de *GapDH C1*.

L'expression de ce gène chez Pt4 (Fig 3.B), montre un profil similaire à celui de Pt1. En condition diurne et en condition d'obscurité totale, le pic d'expression génique apparaît également à +5h mais plus marqué que pour Pt1 en l'absence de lumière (augmentation et diminution plus rapide de l'expression génique). On a quasiment perdu l'expression génique

en condition de lumière qui peut également s'expliquer par une régulation plus forte de *GapDH C1* par des facteurs autres que circadien chez cet écotyle.

Chez Pt8 et Pt5 (Fig 3.C et 3.D) les résultats sont plus complexes à interpréter, un pic d'expression génique est observable pour les deux écotypes en condition diurne à +1 heures, mais on ne retrouve pas ces pics en conditions de lumières ou d'obscurités. L'expression de *GapDH C1* chez ces deux écotypes est donc réglé par d'autres facteurs qui ne sont pas circadiens.

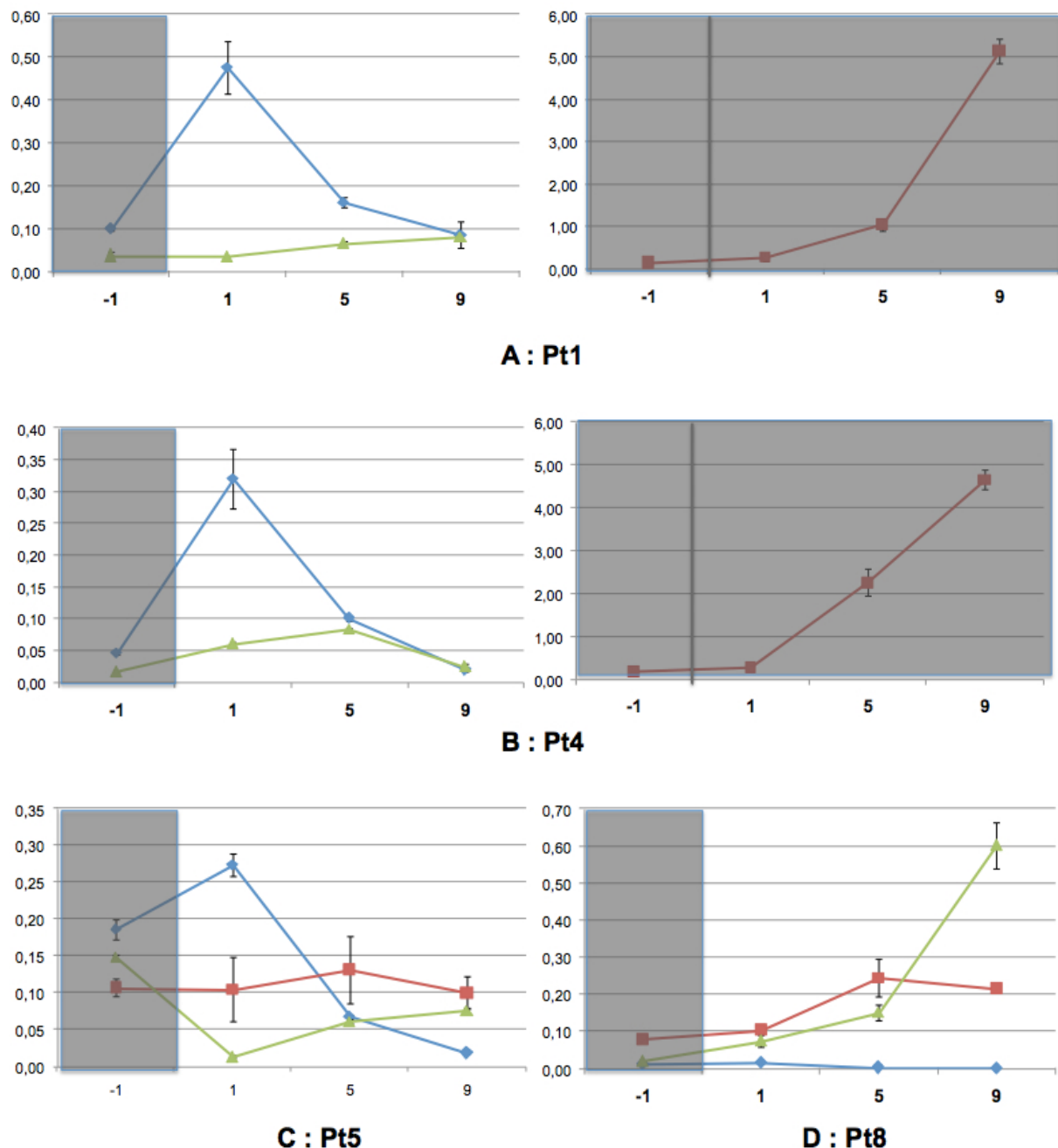


Figure 4 : Expression génique de *CpfI* pour les différents écotypes, l'axe des abscisses présente le temps en heure après l'illumination l'axe des ordonnées montre le niveau relatif d'ARN, l'expression a été normalisé contre les gènes housekeeping *rps* et *tbp*. La courbe bleu représente la condition diurne (LD), la courbe rouge représente la condition d'obscurité totale (DD) et la courbe verte représente la condition de lumière continue (LL)

- Second gène candidat : *Cpfl*

Les résultats précédents supportent l'idée que l'expression de *Cpfl* est réglé de façon diurne c'est à dire par la lumière chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Chez Pt1 et Pt4 (Fig 4.A et 4.B), on a détecté un maximum d'expression à +1 heures en condition diurne. Cependant en conditions continues d'obscurité on a une forte augmentation de l'expression génique au cours du temps chez les deux écotypes (par soucis d'échelle nous avons dû séparer les courbes). Alors qu'en condition de lumière continue l'expression est très faible et retardée à l'exception de Pt4 où on observe un pic léger à +5 heures. Ces résultats indiquent que la lumière a un effet inhibiteur sur l'expression génique de *Cpfl*. Néanmoins il a été montré dans des expériences précédentes plus longue qu'en obscurité continu ce pic d'expression redescendait et persistait dans le temps. De plus la légère augmentation de l'expression chez Pt4 à +5 heures en LL pourrait laisser penser à une régulation de type circadienne de *Cpfl* chez ces deux écotypes.

En revanche pour les écotypes Pt5 et Pt8 (Fig 4.C et 4.D) l'expression génique de *Cpfl* présente des résultats difficile à interpréter de façon circadienne. La régulation de ce gène serait donc liée à d'autres facteurs.

Pour conclure sur ces résultats, chez Pt1 et Pt4, les gènes candidats *Cpfl* et *GapDH C1* montrent bien une régulation de type circadienne puisque en conditions d'obscurité constante, la première propriété des rythmes circadiens est vérifiée, leur expression génique est maintenue en l'absence de stimuli ce qui indique donc une mémoire d'expression du gène lié au rythme circadien.

Chez Pt5 et Pt8 l'expression génique des gènes candidats tester ne présente clairement pas de comportement de type circadien, mais est probablement dépendant d'autres types de réglages.

D'après ces résultats, entre les différents écotypes testés Pt1 et Pt4 sont les souches sauvages les plus intéressantes pour l'étude de l'horloge circadienne chez *P. tricornutum*

2. Création de lignées transgéniques avec le gène rapporteur *LUC*

Un gène rapporteur est un gène dont le produit (protéine) possède une caractéristique lui permettant d'être observé en laboratoire (fluorescence, activité enzymatique détectable). Les gènes rapporteurs sont utilisés pour permettre de visualiser ou mesurer l'expression d'un gène d'intérêt, pour cela le gène rapporteur peut être fusionné au gène étudié ou mis sous le contrôle du promoteur de ce dernier. Dans notre cas le gène *LUC+* (Promega) dérivé de celui de luciole *Photinus pyralis*, code pour la luciférase qui va produire de la luminescence par l'oxydation de la luciférine. La stratégie qui consiste à utiliser le gène rapporteur *LUC* a été initialement développée chez *Arabidopsis thaliana* pour suivre l'activité d'un promoteur *in vivo* (Farre *et al.*, 2007). Nous avons utilisé cette technique chez *P. tricornutum* sur l'écotype Pt1. Le but était de mesurer l'activité transcriptionnelle et traductionnelle de deux gènes candidats : *GapDH C1* et le *light harvesting complex 2 (Lhc2)* qui ont été sélectionnés en fonction de leur comportement circadien. Afin d'obtenir des lignées transgéniques, les

cellules de Pt1 sont cotransformées avec un plasmide contenant la résistance à la phléomycine qui permet de sélectionner les cellules transformées et un plasmide contenant une de ces constructions (Figure 6) :

- pGAP Luc : promoteur du gène *GapDH C1* et gène *LUC*, ce type de construction fournit des informations sur l'activité transcriptionnelle.
- pGAP UTR Luc : promoteur du gène *GapDH C1*, région 5'UTR et gène *LUC*. Dans cette construction on note la présence de la région 5'UTR, chez les eucaryotes cette région peut posséder des facteurs de transcription.
- pB Luc : promoteur du gène *Lhcf2*, région 5'UTR et gène *LUC*, information de type transcriptionnelle
- pGAP FL Luc : promoteur du gène *GapDH C1*, gène *GapDH C1* fusionné au gène *LUC*. Cette construction servira à analyser l'activité traductionnelle du gène *GapDH C1*.

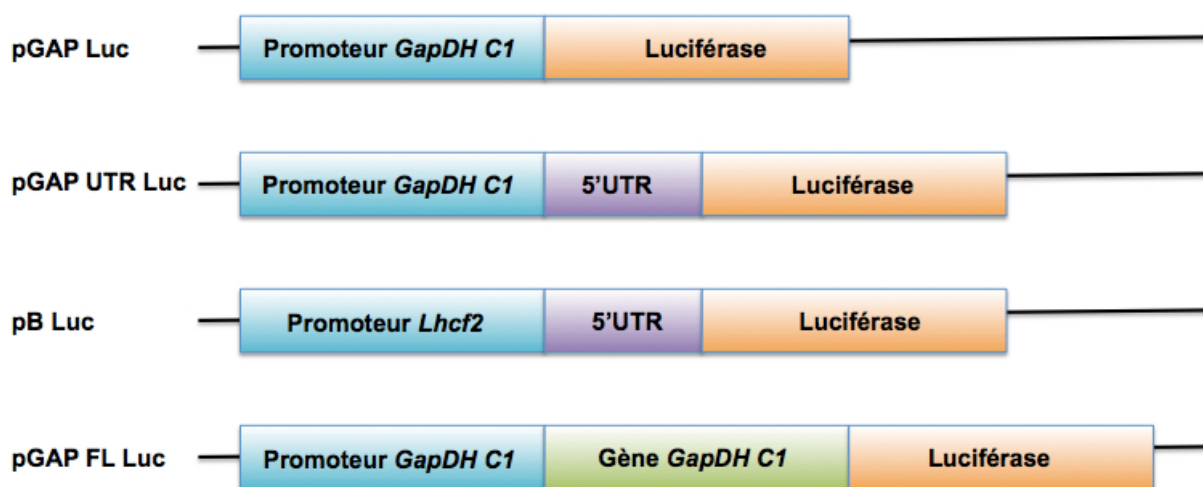


Figure 5 : Schémas des quatre constructions avec le gène rapporteur *LUC+* qui ont été utilisé pour la transformation de Pt1.

Il a été démontré que la cotransformation des plasmides permettait d'obtenir des lignées transgéniques chez *P. tricornutum* avec une efficacité importante (Falcioratore *et al.*, 1999). Nous avons fait pousser des cellules de Pt1 en condition axéniques. Comme décrit dans les méthodes, les cellules ont été collectées, mises sur un milieu solide et transformées avec les différentes constructions. (5 boîtes par construction). Après 48 heures, les cellules ont été repiquées sur de nouvelles boîtes contenant un antibiotique : la Phléomycine pour sélectionner les clones transformés.

Quatre semaines après la transformation, des colonies commencent à apparaître. Pour la construction pGAP Luc nous avons 15 clones transgéniques. Pour pGAP UTR Luc et pGAP FL Luc nous obtenons 10 clones transgéniques et 9 clones transgéniques pour pB Luc.

Il faut ensuite réaliser une PCR directement sur les colonies de diatomées avec des amorces spécifiques de chaque construction pour s'assurer que la cotransformation a bien fonctionné (colony screening). Pour pGAP Luc on a amplifié un fragment de 300bp situé entre le promoteur de *GapDH C1* et le gène *LUC*. Pour pGAP UTR Luc, on a amplifié un

fragment de 420bp situé dans la région 5'UTR. Pour pB Luc on a amplifié un fragment de 600bp dans la région 5'UTR. Et enfin pour pGAP FL Luc on a amplifié un fragment de 500bp entre le gène *GapDH CI* et le gène *LUC*.

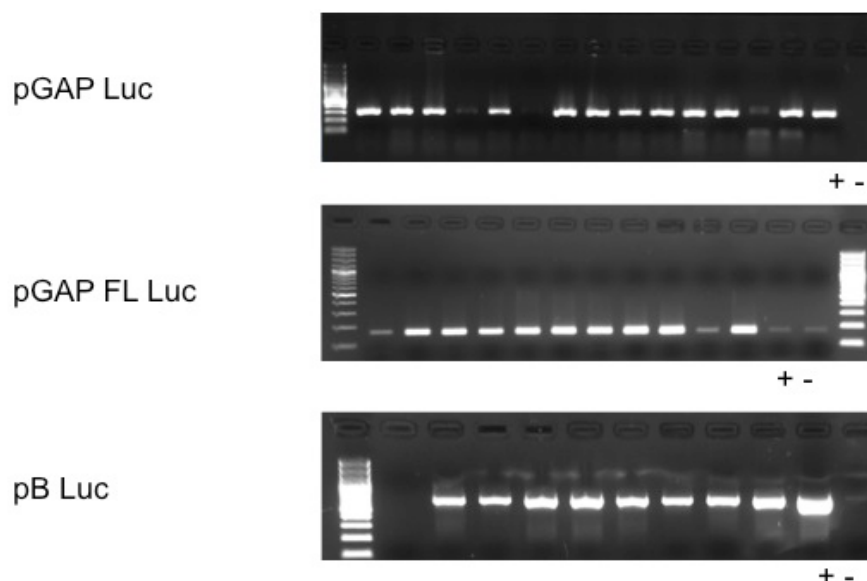


Figure 6 : Exemple de résultat de l'amplification par PCR sur colonie de diatomées transgéniques après séparation sur gels d'électrophorèses (les noms des constructions sont indiqués).

Le premier puits de chaque gel a été rempli avec un marqueur « Gene ruler » (100bp plus DNA Ladder, Fermentas) pour contrôler la taille du fragment amplifié. L'avant dernier et le dernier puits contiennent respectivement un contrôle positif (colonie dont on est sûr qu'elle possède la construction d'intérêt) et un contrôle négatif (colonie sans la construction d'intérêt). Sur les 15 colonies obtenues pour la construction pGAP Luc on obtient 11 positifs, possédant la construction d'intérêt et le gène de résistance à la Phléomycine. D'après le marqueur situé sur la gauche du gel, on note que la bande qui a été amplifiée est bien aux alentours de 300bp. De plus le contrôle négatif n'a pas donné de bande ce qui indique que la PCR a été spécifique et que tous les réactifs étaient « propres », et le contrôle positif présente bien la bande de 300bp. Les résultats obtenus pour chaque clone sont compilés dans le tableau.

Construction	Colonies	PCR positifs
pGAP Luc	14	11
pGAP UTR Luc	10	9
pGAP FL Luc	10	10
pB Luc	9	6

Tableau 1 : résumé des résultats obtenues pour la transformation de Pt1 avec les constructions pGAP Luc, pGAP UTR Luc, pGAP FL Luc et pB Luc.

La cotransformation a bien fonctionné pour chacune de nos constructions avec une efficacité autour de 85% qui est similaire à ce qu'on retrouve dans la littérature. Lorsqu'on réalise une transformation par biolistique on ne sait pas où la construction va s'insérer dans le génome de la cellule, ni le nombre de copie qui arrivent à s'intégrer, ce qui peut avoir un impact sur l'expression génique. Il est très important d'avoir un nombre suffisant de colonies positives pour chaque construction afin de les comparer entre eux et de donner un support statistique aux résultats.

Ces lignées transgéniques de Pt1 seront très utiles pour la suite des expériences circadienne dans le laboratoire. L'utilisation d'un gène rapporteur pour l'étude du cycle circadien permet de suivre beaucoup d'échantillons en même temps, de limiter les coûts de la manipulation et surtout d'automatiser l'expérimentation pour limiter les erreurs liées à des expérimentations longues telles que les qPCR. De plus les lignées avec la luciférase pourront être testées à différentes intensités (très faible, faible, forte), différentes qualités de lumières (bleu, rouge, infrarouge) et différentes périodes lumières/obscurités (16L/8D, 8L/16D, 6L/6D). Cela permettra de mieux comprendre et de décortiquer les effets de la lumière sur la régulation du rythme circadien chez *P. tricornutum*.

Conclusions Générales

Au cours de ce stage, j'ai participé à la caractérisation et l'identification de gènes régulés de façon circadienne chez *P. tricornutum*.

Dans un premier temps à travers la recherche d'un écotype modèle de *Phaeodactylum tricornutum*. J'ai ainsi appris à préparer les milieux nécessaires à la culture des diatomées (Artificial Sea Water et Sea Water F/2), à échantillonner des cellules, à en extraire l'ARN pour préparer du cDNA, à utiliser ce cDNA pour réaliser une qPCR et enfin à analyser les résultats d'expression génique. Les résultats obtenus nous ont permis d'affirmer que les écotypes Pt1 et Pt4 étaient les souches sauvages qui présenter la régulation circadienne la plus forte pour les gènes *GapDH C1* et *Cpfl*. Ces deux écotypes constitueront donc les deux souches modèles pour la suite des manipulations du laboratoire visant à identifier les composants de l'horloge circadienne de *P. tricornutum*.

Puis dans un second temps, j'ai travaillé à la création de lignées Pt1 transgéniques possédant plusieurs constructions avec le gène rapporteur LUC+ qui code pour la luciférase. Pour ce second travail j'ai dû apprendre à travailler de façon stérile sous une hôte pour éviter la contamination de nos boîtes contenant les cellules, à transformer des diatomées par biolistique et à en extraire l'ADN pour vérifier par PCR que la transformation avait fonctionné. Après mon départ, des analyses plus récentes du laboratoire ont confirmée l'expression de la protéine LUC dans les lignées transgéniques que j'ai généré. Ces lignées possédant la construction d'intérêt seront très utile pour la suite des études sur les rythmes circadiens chez *Phaeodactylum tricornutum*. En effet elles permettront de suivre à grande échelle et de façon plus pratique l'activité transcriptionnelle de *GapDH C1* et *Lhcf2* et l'activité traductionnelle de *GapDH C1* à différentes périodes de lumières/obscurités, différentes longueurs d'ondes et différentes intensités lumineuse.

Références bibliographiques

Bowler C, Allen A. E, Badger J. H, *et al* 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. NATURE, Vol 456, pp. 239-244.

Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, Heijde M, Rogato A, Finazzi G, Todo T, Bowler C, Falciatore A. 2009. Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. EMBO reports, Vol. 10, No 10, pp 655-661.

De Martino A, Meichenin A, Kehou Pan J.S, Bowler C. 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. J. Phycol **43**, pp. 992-1009.

De Riso V, Raniello R, Maunus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A. 2009. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Nucleic Acids Research, Vol. 37. No. 14 e96.

Doherty CJ, Kay SA. 2010. Circadian control of global gene expression patterns. Annual Review of Genetics 44, pp. 419–444.

Depauw F, Rogato A, Ribera d’Alcalá, Falciatore A. 2012. Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No 4, pp. 1575-1591.

Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C. 1999. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. Mar. Biotech. 1 : pp 239-251.

Farre E. M, Kay S. A. 2007. Protein levels are regulated by light and the circadian clock in Arabidopsis. Plant J 52 (3), pp 548-560

Field C. B, Behrenfeld M. J, Randerson J. T, Falkowski P. 1998. Primary production of the biosphere : integrating terrestrial and oceanic components. Science 281, pp 237-240.

Harmer S. L. 2009. The Circadian System in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 60, pp. 357-377.

Hogenesch J.B, Ueda H. R. 2011. Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. NATURE, Vol 12, pp. 407-416.

Hosokawa N, Hatakeyama T. S, Kojima T, Kikuchi Y, Ito H, Iwasaki H. 2011. Circadian transcriptional regulation by the posttranslational oscillator without de novo clock gene expression in *Synechococcus*. PNAS. Vol. 108, No 37, pp.15396-15401.

Margalef R. 1978. Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. Oceanologica acta Vol. 134, pp. 493-509.

O’Neill J. S, van Ooijen G, Dixon L. E, Troein C, Corellou F, Bouget F-Y, Reddy A. B, Millar A. J. 2011. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. NATURE. Vol 469, pp 554-558.

Owens T. G, Falkowski P. G, Whitledge T. E. 1980. Diel Periodicity in Cellular Chlorophyll Content in Marine Diatoms. Marine Biology, 59, pp 71-77

Pruneda-Paz J. L, Kay S. A.,2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. Trends in Plant Science. Vol. 15 No. 5, pp. 259-265.

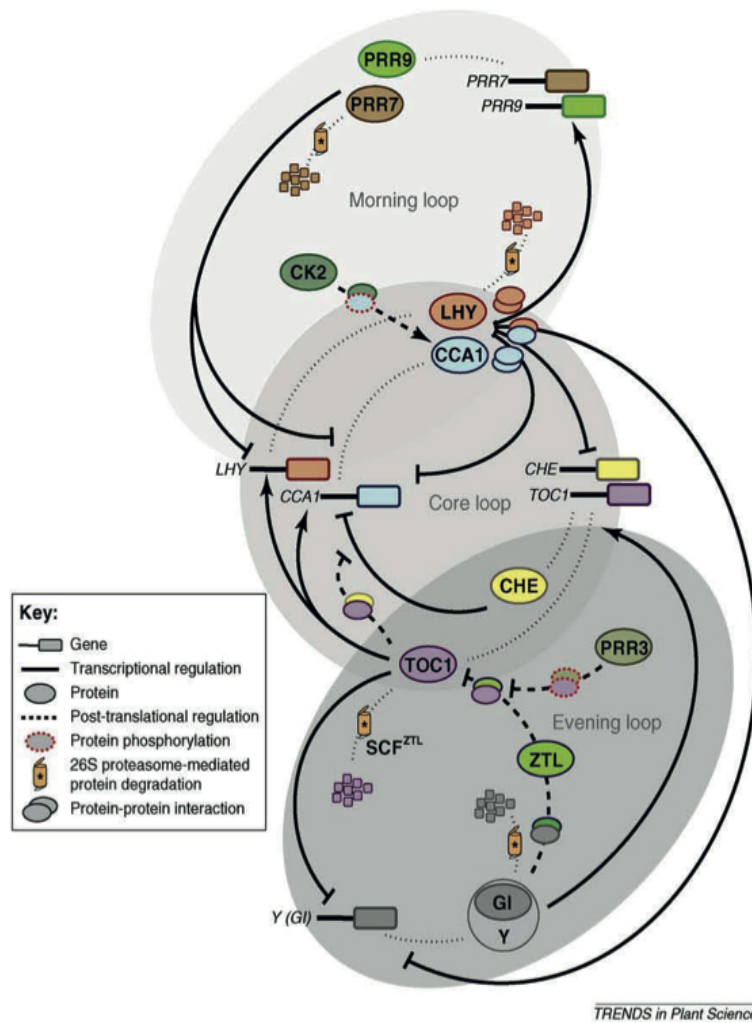
Ragni M, Ribera d'Alcalà M. 2007. Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content. Journal of Plankton Research. Vol. 29, No 2, pp. 141-156.

Tauber E, Last K. S, Olive P. J. W, Kyriacou C. P. 2004. Clock Gene Evolution and Functional Divergence. Journal Of Biological Rhythms, Vol. 19 No. 5, pp. 445-458.

Virginia Armbrust E. 2009. The life of diatoms in the world's oceans. NATURE, Vol 459, pp. 185-192.

Zhang E. E, Kay S. A. 2010. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. NATURE, Vol 11, pp. 764-776.

Annexe 1 : Schéma de l'horloge circadienne de Arabidopsis, basé sur un mécanisme TTO.

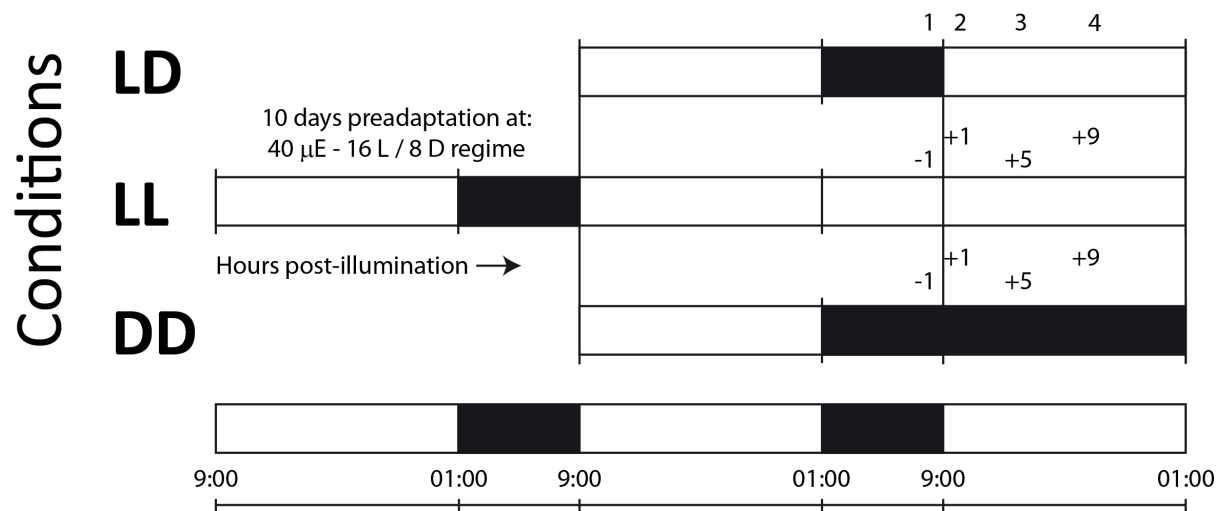


L'oscillateur central produit les oscillations en régulant des couples de gènes par feedback négatif. Ces oscillations sont plus finement réglé par deux autres oscillateurs : morning loop et evening loop qui sont plus actifs selon les heures de la journée. (Pruneda-Paz *et al.*, 2010)

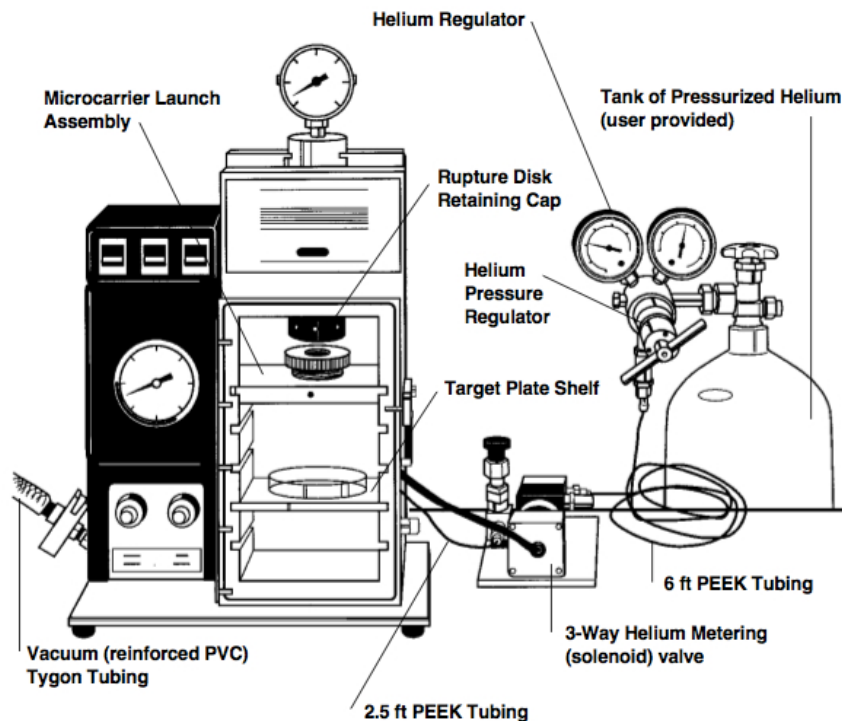
Annexe 2 : Composants du milieu ASW et leurs concentrations pour 1L d'ASW, Vartanian, M., *et al* (2009).

Solutions		Concentration finale pour 1L d'ASW en Mol/L
Chlorure de sodium	NaCl	4,11 ^E -01
Magnésium 1	MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,99 ^E -02
Magnésium 2	MgCl ₂ , 6H ₂ O	2,02 ^E -02
Mix1	KCl	1,01 ^E -02
	KNO ₃	3,00 ^E -02
	Na ₂ EDTA	3,22 ^E -05
	glycylglycine	5,00 ^E -03
Mix2	Fe-NH ₄ -citrate	4,95 ^E -07
	H ₃ BO ₃	8,09 ^E -06
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1,04 ^E -06
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	4,01 ^E -07
	Na ₂ MoO ₄	4,86 ^E -07
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	4,21 ^E -07
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	5,05 ^E -07
	Na ₂ tartrate, 2H ₂ O	6,52 ^E -06
Mix3	O ₂ Se	2,16 ^E -08
	KBr	3,36 ^E -08
	SrCl ₂ , 6H ₂ O	3,75 ^E -09
	NaF	1,00 ^E -05
	NiSO ₄ , 6H ₂ O	6,47 ^E -09
	Na ₃ VO ₄	9,79 ^E -08
	CrK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	4,00 ^E -10
Calcium	CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,30 ^E -02
Buffer	MES	2,97 ^E -03
	Trizma Base	1,65 ^E -02
Phosphate	K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	2,62 ^E -04
Mix Vitamines	Thiamine, HCl	2,96 ^E -07
	B12	3,69 ^E -10
	Biotine	2,05 ^E -09

Annexe 3 : schéma de la manipulation circadienne pour étudier les écotypes de *Phaeodactylum tricornutum*.



Annexe 4 : Vue de face du PDS-1000/He et de ses différents composants.



Annexe 5 : Tableau des tâches.

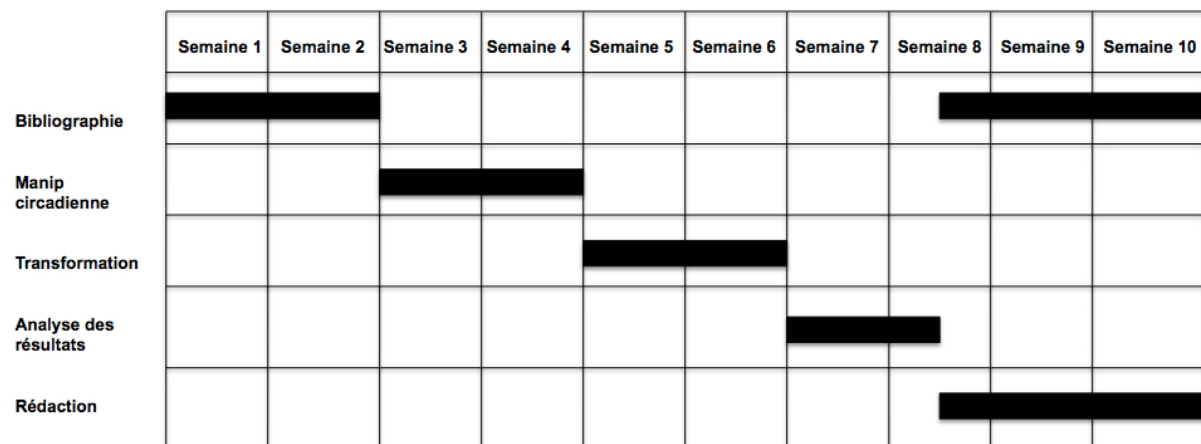
Intervenant	Idée originale	Bibliographie	Mise en place du protocole	Collecte de données	Analyse résultats	Rédaction
Principal	AF	GO	AEF	GO	GO	GO
Secondaire	AEF	AEF	GO		AEF	

AF : Dr Angela Falciatore

AEF : Dr Antonio Emidio Fortunato

GO : Gorka Oyarzun

Annexe 6 : Calendrier du stage



Résumé

L'horloge circadienne permet aux organismes de s'adapter à l'environnement extérieur grâce à deux mécanismes endogènes présents dans les différents règnes du vivant : le TTO et le PTO. Dans l'environnement marin, les diatomées sont des algues unicellulaires appartenant au phytoplancton et qui sont largement répandues dans les océans contemporains. Cependant des études ont montré que les diatomées présentaient des comportements circadiens mais ne possédaient pas de « clock genes » appartenant au TTO ou PTO. Durant ce stage, j'ai travaillé à l'identification des composants de l'horloge circadienne des diatomées à travers une espèce modèle omniprésente dans les océans du globe et présentant de nombreux écotypes : *P. tricornutum*. Une partie de mon travail consistait à comparer l'expression génique de deux gènes candidats à être réglés de façon circadienne : *GapDH C1* et *Cpfl*, chez quatre écotypes de *P. tricornutum* afin de définir un écotipe modèle pour la suite des études sur l'horloge circadienne des diatomées. D'après les résultats obtenus, les écotypes Pt1 et Pt4 sont les souches sauvages les plus intéressantes pour la suite des études du rythme circadien chez *P. tricornutum*. L'autre partie de mon travail au laboratoire consistait à la création par biolistique de lignées transgéniques de *P. tricornutum* avec un gène rapporteur (*LUC+*). Ces lignées transgéniques avec la luciférase pourront être testées à différentes intensités lumineuses, différentes qualités de lumière et différentes périodes lumière/obscurité pour analyser de façon plus pratique le rythme circadien chez *P. tricornutum*.

Mots clés

Rythme circadien / Diatomées / Phaeodactylum tricornutum / Ecotypes / Expression génique / Luciférase