



**HAL**  
open science

# Régulation épigénétique du développement : approche eco-evo-devo des m6A-épitranscriptomes chez l'huître *Crassostrea gigas*

Lorane Le Franc

► **To cite this version:**

Lorane Le Franc. Régulation épigénétique du développement : approche eco-evo-devo des m6A-épitranscriptomes chez l'huître *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC216 . tel-04100996

**HAL Id: tel-04100996**

**<https://theses.hal.science/tel-04100996>**

Submitted on 19 May 2023

**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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Régulation épigénétique du développement : approche eco-evo-devo des m6A-épitranscriptomes chez l'huître *Crassostrea gigas***

Présentée et soutenue par  
**Lorane LE FRANC**

Thèse soutenue le **18/05/2021**  
devant le jury composé de

Mme CÉLINE COSSEAU	Maître de conférences HDR, Université Perpignan Via Domitia	Rapporteur du jury
M. MARC GRAILLE	Directeur de recherche, Institut Polytechnique	Rapporteur du jury
Mme CHARLOTTE CORPOREAU	Chargé de recherche HDR, IFREMER de PLOUZANE	Membre du jury
M. GUILLAUME RIVIERE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. PASCAL FAVREL	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse
Mme CÉCILE BOUSQUET-ANTONELLI	Directeur de recherche, Université Perpignan Via Domitia	Président du jury

Thèse dirigée par **GUILLAUME RIVIERE** et **PASCAL FAVREL**, **Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (Caen)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement



Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques



# Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été réalisés eu sein de l'École doctorale Normandie de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) dans l'Unité Mixte de Recherche « Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques » (UMR 8067 BOREA, MNHN, CNRS 2030, SU, IRD-207, UCN, UA) de l'Université Caen Normandie sous la direction du Dr Guillaume RIVIERE et du Pr Pascal FAVREL. Cette thèse a été financée par une bourse d'établissement.





# Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, le Dr Guillaume Rivière et le Pr Pascal Favrel, qui m'ont encadré lors de ces trois années de thèse. Merci pour votre soutien, votre disponibilité, votre bienveillance et la confiance que vous m'avez accordée pour réaliser cette belle aventure qu'est la thèse, qui a été riche en péripéties. Merci Guillaume, tu as su garder ton calme dans la tempête des contretemps que j'attire comme un aimant et trouver les mots pour que je ne cède pas à la panique.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du jury. Au Dr Céline Cosseau et au Dr Marc Graille d'avoir pris le temps d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs de cette thèse. Au Dr Cécile Bousquet-Antonelli et au Dr Charlotte Corporeau pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinatrices.

J'exprime mes sincères remerciements au Pr. Muriel Bardor, au Dr. Angélique Levoye, au Pr. Didier Vieau et à Rodolphe Dumontier d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel.

Je remercie tous les membres du laboratoire BOREA de Caen. Tout d'abord, je remercie le Dr Céline Zatylny-Gaudin de m'avoir accueillie au sein du laboratoire BOREA. Je remercie aussi le Dr Sébastien Baratte et le Dr Aude Gautier de m'avoir accueillie au sien de l'équipe Emerge et le Pr Pascal Favrel de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Evoreg. Je tiens à remercier le Dr Kristell Kellner pour son soutien et ses conseils au cours de la thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire, Marie-Pierre pour ta générosité et tes conseils en Biologie Moléculaire, Christophe, Fabienne, Nadège et Sandra pour votre appui technique. Merci à Catherine pour tes délicieuses galettes et Sylvia pour ta bonne humeur communicative.

Je tiens à remercier le Dr Caroline Fabioux, le Dr Arnaud Huvet, le Dr Rossana Sussarellu pour leurs conseils et les échantillons qui m'ont permis de réaliser l'étude sur l'héritabilité épitranscriptomique.

Je remercie Bruno Petton de m'avoir ouvert les portes de la station marine Ifremer de Plouzané pour que je puisse réaliser mes échantillonnages, même en pleine nuit. Je remercie aussi Jacqueline Le Grand pour les échantillons des stades tardifs du développement.

Je remercie le Dr Marc Since, le Pr Raphaël Delépée et Stéphanie Lagadu pour leur aide précieuse dans la quantification par spectrométrie de masse de la m<sup>6</sup>A.

Merci au Dr Benoît Bernay et Julien potin pour leur aide précieuse dans les analyses protéomiques, mais surtout pour les nombreuses discussions en compagnie de Brice et Jérôme autour d'un café. Ces discussions à refaire le monde auront été une bouffée d'air frais durant ces trois années de thèse.

Un grand merci à tous les doctorants passés et présents pour tous les bons moments. Merci à Maëva pour ton soutien et tout particulièrement pour toutes ces soirées plus que tardives au laboratoire et aussi en dehors (merci à la trocho fantôme pour ce fou rire mémorable). Merci à Julie pour toutes nos grandes discussions sur des sujets capitaux et aussi tes conseils accompagnés de délicieux Kinder Bueno. Merci à toi d'avoir laissé quelque temps tes calendriers qui ont su me motiver. Merci à Floriane pour toutes nos discussions et surtout toutes ces petites blagues incomprises. Je remercie les Aurore (grande et petite) de m'avoir accueilli lors des repas à l'Acadiane. Merci à Stéphanie pour ta gentillesse à toute épreuve, ta sagesse et tes nombreux conseils. Merci à Angela pour tous les fous rires que tu as su provoquer avec toutes tes histoires incongrues. Merci à Émilie pour ta bonne humeur car « ça passe » toujours ! Je te remercie d'avoir été à l'écoute et pour tes nombreux conseils. Je remercie aussi Charles, Quentin, Baptiste, Alexandre sans qui les quelques verres partagés auraient été moins drôle. Merci à petit Louis pour ton soutien informatique surtout et ton humour qui profite bien trop souvent de ma naïveté. Merci à Marie, Annabelle, Valentin, Élise. Je remercie Bertrand pour sa bonne humeur au quotidien et les discussions se terminant souvent par un départ remarqué.

Je remercie aussi tous mes amis, malgré qu'on ne se voit peu, vous avez toujours su être là. Une pensée pour Zozo, Bouillou, Titi et Mimi qui m'ont accueillie dans leur famille. Merci à Maud et Annelyse de m'avoir accueillie à Caen et d'avoir toujours été présentes.

Je tiens à remercier tout spécialement ma famille pour leur soutien inconditionnel. Cette famille est bien trop grande pour tous vous remercier et exprimer combien vous avez été importants lors de ces trois années et au-delà. Je remercie tout particulièrement ma maman Pascale, sans ton soutien et tes nombreux encouragements dont toi seule a le secret, je ne serais pas arrivée jusque-là.

C'est grâce à vous tous que je n'ai pas cédé à la folie, ou presque pas, que peut parfois provoquer la thèse. Merci.



# Sommaire

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>1</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>17</b>
1. RÉGULATION DU DÉVELOPPEMENT.....	17
1.1. <i>Le développement des Bilatériens</i> .....	17
1.1.1. La gamétogenèse et la fécondation .....	18
1.1.2. La segmentation.....	20
1.1.3. La gastrulation.....	21
1.1.4. La neurulation, l'organogenèse et la gonadogenèse.....	22
1.2. <i>Régulation moléculaire du développement</i> .....	23
1.2.1. L'émergence de cellules distinctes à partir d'un génome unique .....	23
1.2.2. L'eco-evo-devo.....	25
1.2.3. Régulation moléculaire des transcriptomes développementaux .....	26
1.2.3.1. Les mécanismes épigénétiques .....	26
1.2.3.2. Les mécanismes épitranscriptomiques.....	30
2. LA N <sup>6</sup> -MÉTHYLADÉNOSINE .....	32
2.1. <i>La machinerie de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine</i> .....	34
2.1.1. La machinerie chez les Vertébrés .....	34
2.1.2. La machinerie des Ecdysozoaires.....	44
2.2. <i>Régulation des fonctions physiologiques</i> .....	49
2.3. <i>Régulation du développement</i> .....	55
2.3.1. La gamétogenèse .....	55
2.3.2. La transition maternelle à zygotique.....	56
2.3.3. L'inactivation du chromosome X .....	56
2.3.4. La différenciation cellulaire.....	57
3. LE MODÈLE BIOLOGIQUE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....	58
3.1. <i>Un modèle d'intérêt</i> .....	58
3.1.1. La position phylogénétique.....	58
3.1.2. L'écologie de l'huître creuse.....	60
3.1.3. L'intérêt économique .....	60

3.2. <i>Le cycle de vie</i> .....	61
3.3. <i>Mécanismes moléculaires de régulation du développement de l'huître creuse</i> .....	65
3.3.1. Contrôle moléculaire du développement.....	65
3.3.2. Régulation épigénétique chez l'huître creuse.....	67
4. OBJECTIFS.....	69

## **CHAPITRE I : CARACTÉRISATION D'UNE VOIE ÉPITRANSCRIPTOMIQUE AU COURS DU**

### **DÉVELOPPEMENT .....75**

1. PRÉAMBULE .....	75
2. A FUNCTIONAL M <sup>6</sup> A-RNA METHYLATION PATHWAY IN THE OYSTER <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ASSUMES EPITRANSCRIPTOMIC REGULATION OF LOPHOTROCHOZOAN DEVELOPMENT .....	77
3. SUPPORTING INFORMATION .....	93
4. BILAN DU CHAPITRE I.....	121

## **CHAPITRE II : CARACTÉRISATION DES PROFILS**

### **DÉVELOPPEMENTAUX DE LA M<sup>6</sup>-METHYLADENOSINE..125**

1. PRÉAMBULE .....	125
2. INTRODUCTION .....	128
3. RESULTS .....	131
4. DISCUSSION.....	139
5. MATERIALS & METHODS.....	144
6. SUPPORTING INFORMATION .....	151
7. BILAN DU CHAPITRE II.....	159

## **CHAPITRE III : LA M<sup>6</sup>A : UN VECTEUR DE TRANSMISSION DE TRAITS DE VIE ENVIRONNEMENTAUX PAR EFFET**

### **MATERNEL ? .....163**

1. INTRODUCTION .....	163
1.1. <i>L'effet maternel</i> .....	163
1.2. <i>Effet maternel chez l'huître creuse : Cas des microplastiques et microalgues toxiques</i> .....	165

1.2.1. Microalgue toxique : <i>Alexandrium minutum</i> .....	166
1.2.2. Microplastiques .....	168
1.3. <i>ARN maternels et N<sup>6</sup>-méthyladénosine</i> .....	169
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	171
2.1. <i>Exposition Alexandrium minutum</i> .....	171
2.1.1. Conditionnement.....	171
2.1.2. Prélèvement des échantillons .....	173
2.1.3. Extraction d'ARN.....	173
2.2. <i>Exposition Microplastiques</i> .....	173
2.2.1. Conditionnement.....	173
2.2.2. Prélèvement des échantillons .....	174
2.2.3. Extractions ARN.....	174
2.3. <i>Fragmentation des ARN totaux</i> .....	174
2.4. <i>MeRIP</i> .....	175
2.5. <i>Préparation des banques de séquençage</i> .....	176
2.6. <i>Analyse des données MeRIP-seq</i> .....	176
2.7. <i>Analyses de l'ontologie des gènes</i> .....	177
2.8. <i>Analyses statistiques et production de graphiques</i> .....	177
3. RÉSULTATS.....	177
3.1. <i>Analyse primaire des données de MeRIP-seq</i> .....	177
3.2. <i>Étude de l'exposition à Alexandrium minutum</i> .....	180
3.3. <i>Étude de l'exposition aux microplastiques</i> .....	183
3.4. <i>Comparaison de la réponse épitranscriptomique entre les     conditionnements</i> .....	187
4. DISCUSSION.....	190
5. TABLEAUX COMPLÉMENTAIRES.....	196
6. BILAN DU CHAPITRE III.....	205
<b>SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>221</b>



## Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique simplifié des Métazoaires.	17
<b>Figure 2</b> : Schéma de la gamétogenèse chez les Bilatériens.	18
<b>Figure 3</b> : La segmentation holoblastique.	21
<b>Figure 4</b> : Schéma de la blastula et gastrula	22
<b>Figure 5</b> : Le devenir du blastopore chez les Bilatériens	23
<b>Figure 6</b> : Contrôle de l'axe antéro-postérieur par l'expression colinéaire des gènes HOX	24
<b>Figure 7</b> : Régulation de l'empreinte parentale régulée par la méthylation de l'ADN	27
<b>Figure 8</b> : Régulation de l'expression colinéaire des gènes HOX régulée par la méthylation des histones	28
<b>Figure 9</b> : Modèle de l'inactivation du chromosome X par le lncARN XIST.	30
<b>Figure 10</b> : Les modifications de l'ARNm	31
<b>Figure 11</b> : La m <sup>6</sup> A, une marque réversible	33
<b>Figure 12</b> : Nombre de publications concernant la m <sup>6</sup> A	33
<b>Figure 13</b> : Schéma de l'implication de la m <sup>6</sup> A dans des fonctions physiologiques	50
<b>Figure 14</b> : Positionnement de <i>Crassostrea gigas</i> au sein des Spiraliens.	59
<b>Figure 15</b> : Schéma du cycle de reproduction de l'huître creuse.	62
<b>Figure 16</b> : Le cycle de de vie de l'huître creuse.	63
<b>Figure 17</b> : Anatomie interne de l'huître creuse	65
<b>Figure 18</b> : Conservation des gènes HOX chez <i>C. gigas</i> .	66
<b>Figure 19</b> : Contrôle de l'axe dorso-ventral par BMP chez l'huître creuse.	67
<b>Figure 20</b> : Schéma de la localisation de vasa au cours du développement de l'huître creuse.	68
<b>Figure 21</b> : Schéma bilan du chapitre I	121
<b>Figure 22</b> : N <sup>6</sup> -methyladenosine signatures of oyster RNA classes.	132
<b>Figure 23</b> : Epitranscriptome dynamics during oyster development.	134
<b>Figure 24</b> : Dynamics of mRNA expression and m <sup>6</sup> A methylation during oyster development.	136
<b>Figure 25</b> : Functional annotation of differentially methylated mRNAs during oyster development	137
<b>Figure 26</b> : Dynamics of lncRNA expression and m <sup>6</sup> A methylation during oyster development.	138
<b>Figure 27</b> : m <sup>6</sup> A dynamics of transposable element RNA classes during oyster development.	139
<b>Figure 28</b> : Schéma bilan du chapitre II	159



<b>Figure 29</b> : Schéma du système digestif de <i>C. gigas</i> _____	165
<b>Figure 30</b> : <i>Alexandrium minutum</i> _____	167
<b>Figure 31</b> : Microplastiques ingérés par un copépode et par l'huître creuse ____	168
<b>Figure 32</b> : Conditionnement des animaux _____	172
<b>Figure 33</b> : Influence d'une exposition maternelle à <i>A. minutum</i> sur les transcriptomes et épitranscriptomes ovocytaires. _____	181
<b>Figure 34</b> : Caractérisation des changements épitranscriptomiques ovocytaires induits par l'exposition maternelle à <i>A. minutum</i> _____	182
<b>Figure 35</b> : Annotation fonctionnelle des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle à <i>A. minutum</i> . _____	184
<b>Figure 36</b> : Dynamique de l'expression et de la méthylation des gènes des ovocytes entre les conditions d'exposition : Microplastiques _____	185
<b>Figure 37</b> : Caractérisation des changements épitranscriptomiques ovocytaires induits par l'exposition maternelle aux microplastiques. _____	186
<b>Figure 38</b> : Annotation fonctionnelle des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle aux microplastiques. _____	187
<b>Figure 39</b> : Comparaison des signatures épitranscriptomiques ovocytaires de l'exposition maternelle à la microalgue <i>A. minutum</i> et aux microplastiques. ____	188
<b>Figure 40</b> : Schéma bilan du chapitre III _____	205
<b>Tableau 1</b> : « Writers » identifiés chez les Bilatériens .....	35
<b>Tableau 2</b> : « Erasers » identifiés chez les Bilatériens .....	38
<b>Tableau 3</b> : « Readers » identifiés chez les Bilatériens.....	40
<b>Tableau 4</b> : Valeurs de qualité de l'alignement avec STAR des échantillons du conditionnement <i>A. minutum</i> . .....	178
<b>Tableau 5</b> : Valeurs de qualité de l'alignement avec STAR des échantillons MP du conditionnement MP. ....	179
<b>Tableau 6</b> : Valeurs de qualité de l'alignement avec STAR des échantillons témoins du conditionnement MP. ....	180
<b>Tableau 7</b> : Comparaison de la variation du niveau de m <sup>6</sup> A des 19 transcrits différentiellement méthylés suite aux conditionnements maternels en présence d' <i>A. minutum</i> ou des MP. ....	189

## Liste des abréviations

<b>2'-O-me ou Nm</b>	2'-O-méthylation	<b>DROSHA</b>	Double-stranded RNA-specific endoribonuclease
<b>5mC</b>	5-méthylcytosine		
<b>ac4C</b>	N <sup>4</sup> -acétylcytidine		
<b>ALKBH5</b>	AlkB homologue 5	<b>eIF3</b>	Eukaryotic initiation factor 3
<b>ARNm</b>	ARN messenger	<b>eIF4E</b>	Eukaryotic initiation factor 4E
<b>ARNr</b>	ARN ribosomique		
<b>ARNsn</b>	Petit ARN nucléaire	<b>FMR1</b>	Fragile X mental retardation 1
<b>ARNt</b>	ARN de transfert	<b>FMRP</b>	Fragile-X mental retardation RNA binding protein
<b>BEC</b>	Composés extracellulaires bioactifs	<b>FTO</b>	Fat mass and obesity associated gene
<b>Bmal1</b>	Brain and Muscle ARNT-Like 1	<b>GO</b>	Ontologie des gènes
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic proteins	<b>HAB</b>	Harmful algal blooms
<b>carRNA</b>	Chromosome-associated regulatory RNA	<b>HAKAI</b>	RING finger E3 ubiquitin ligase
<b>CCR4-NOT</b>	Carbon Catabolite Repression-Negative On TATA-less	<b>hm<sup>5</sup>C</b>	5-hydroxyméthylcytosine
<b>CDS</b>	Région codante	<b>HNRNPA2B1</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
<b>circARN</b>	ARN circulaires	<b>hpf</b>	Heures post-fécondation
<b>CYP-29A3</b>	Cytochrome P450 family	<b>HSP</b>	Heat shock proteins
<b>DGCR8</b>	DiGeorge syndrome critical region gene 8	<b>IGF2BP1</b>	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein
<b>DM</b>	Différentiellement méthylé	<b>IL-7</b>	Interleukine 7
<b>DNMT</b>	DNA methyl-transferases		

<b>JAK/STAT</b>	Janus kinase / signal transducer and activator of transcription	<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complexes
<b>JAK1</b>	Janus kinase 1	<b>SAM</b>	S-adenosylmethionine
<b>jpf</b>	Jour post- fécondation (ou dpf)	<b>siARN</b>	ARN interférents courts
<b>KSHV</b>	Kaposi's sarcoma- associated herpes virus	<b>SMAD</b>	Mother against decapentaplegic
<b>lncARN</b>	Longs ARN non codants	<b>snoARN</b>	ARN nucléolaires
<b>m<sup>1</sup>A</b>	N <sup>1</sup> - méthyladénosine	<b>SOCS</b>	Suppressor of cytokine signaling
<b>m<sup>5</sup>C</b>	5-méthylcytosine	<b>SRSF</b>	Serine/arginine-rich splicing factor
<b>m<sup>6</sup>A</b>	N <sup>6</sup> -méthyladénosine	<b>SV40</b>	Simian virus 40
<b>m<sup>6</sup>Am</b>	N <sup>6</sup> ,2'-O- diméthyladénosine	<b>Sxl</b>	Sex lethal
<b>m<sup>7</sup>G</b>	N <sup>7</sup> -méthylguanosine	<b>TE</b>	Transposable element
<b>MAC</b>	Complexe METTL-m <sup>6</sup> A	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>MACOM</b>	Complexe associé aux METTL-m <sup>6</sup> A	<b>TRA</b>	Transformer
<b>METTL</b>	Methyltransferase-like	<b>TRMT112</b>	tRNA methyltransferase subunit 11-2
<b>miARN</b>	microARN	<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>MP</b>	Microplastiques	<b>VIRMA</b>	Vir-like m <sup>6</sup> A methyltransferase associated ou KIAA1429
<b>MSL-2</b>	Male-specific lethal 2	<b>WTAP</b>	Wilms tumor 1- associating protein
<b>MZT</b>	Transition maternelle à zygotique	<b>XIST</b>	X-inactive specific transcript
<b>ncARN</b>	ARN non-codants	<b>XRN1</b>	5'-3' Exoribonuclease 1
<b>NSUN2</b>	Protéine à domaine NOL1/NOP2/Sun	<b>YTH</b>	YT521-B homologue
<b>piARN</b>	ARN lié à Piwi	<b>YTHDC</b>	YTH domain containing
<b>PPaR<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator- activator $\alpha$	<b>YTHDF</b>	YTH domain family
<b>Prrc2a</b>	Proline rich coiled-coil 2 A	<b>ZC3H13</b>	Zinc finger CCCH-type containing 13
<b>PST</b>	Paralytic Shellfish Toxins	<b>ZCCHC4</b>	Zinc finger CCHC domain containing protein 4
<b>RBM15</b>	RNA-binding motif 15	$\psi$	Pseudouridine





# **Introduction générale**

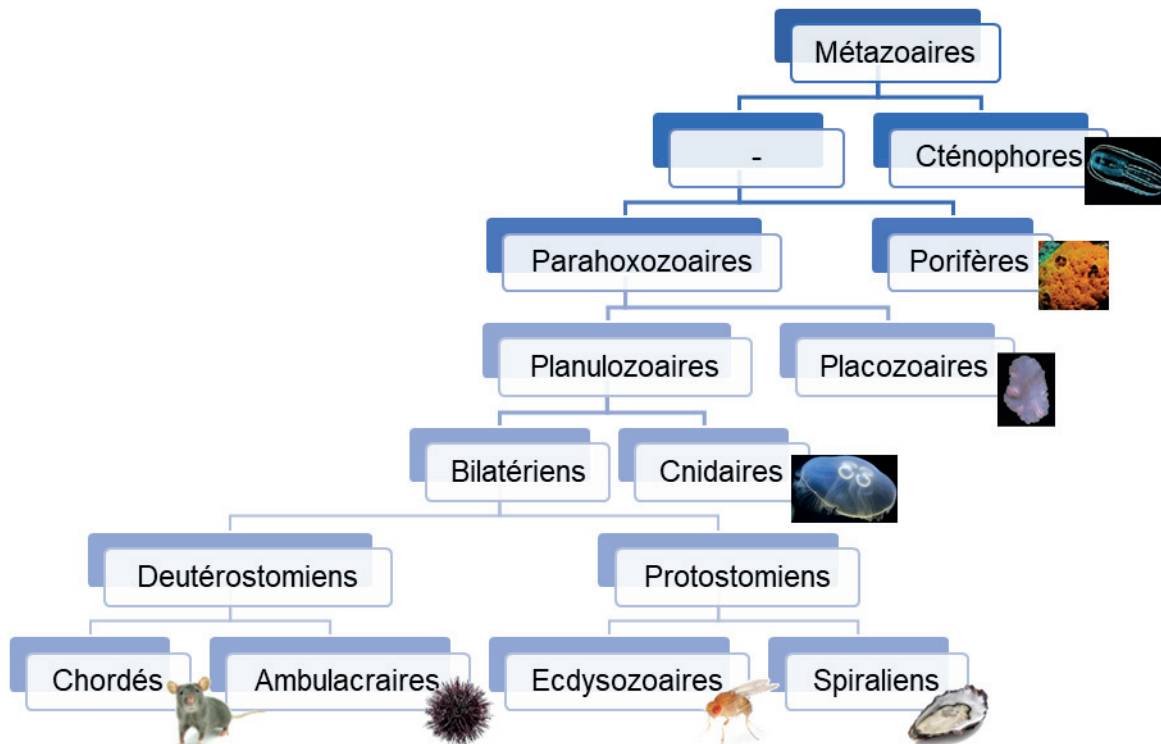


# Introduction générale

## 1. Régulation du développement

### 1.1. Le développement des Bilatériens

Les Bilatériens regroupent des animaux pluricellulaires présentant une large diversité morphologique. Ce groupe monophylétique se définit par des organismes présentant une symétrie bilatérale aux stades adultes ou larvaires, mais aussi par la présence de trois feuillettes cellulaires lors de l'embryogenèse et une concentration des organes des sens et de préhension en position antérieure de l'organisme. A ces caractéristiques morphologiques s'ajoutent des caractéristiques moléculaires avec, par exemple, les gènes homéotiques qui définissent le plan d'organisation des animaux bilatériens lors du développement (Baguñà *et al.*, 2008). Ce groupe se divise en deux clades les Deutérostomiens et Protostomiens (**Figure 1**) anciennement définis selon que se forme en premier l'anus ou la bouche, respectivement (Martín-Durán *et al.*, 2012).



**Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié des Métazoaires.**

Cet arbre représente la classification des quatre groupes majeurs des Bilatériens à savoir Chordés qui comprennent les Vertébrés, les Ambulacraires, les Ecdysozoaires et les Spiraliens. Modifié d'après Dunn et Ryan, 2015 et Dunn *et al.*, 2014

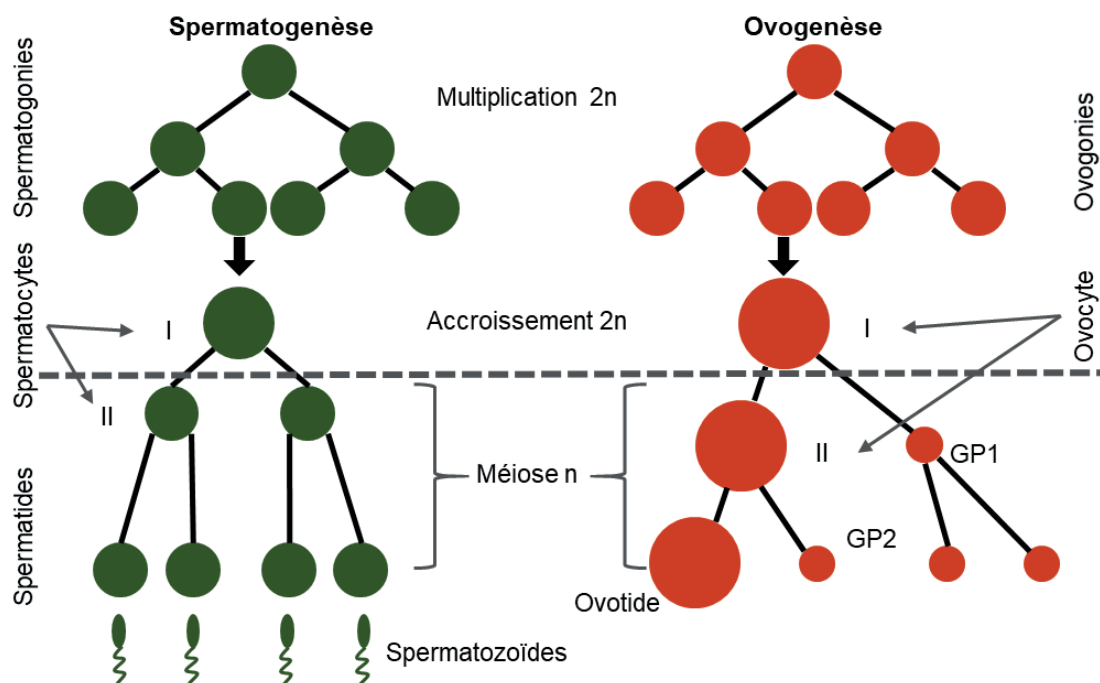


## Introduction générale

Les Deutérostomiens regroupent les Échinodermes, les Hémichordés et les Chordés. Ce dernier, caractérisé par la présence d'un tube squelettique le long de l'axe antéro-postérieur appelée notochorde, comprend les Vertébrés. Les Protostomiens incluent des espèces regroupées sous les termes Spiraliens et Ecdysozoaires. Les Ecdysozoaires rassemblent notamment les Arthropodes qui possèdent un corps segmenté recouvert d'un exosquelette et les Nématodes. Les Spiraliens, dont font partie les Mollusques, sont nommés ainsi car la segmentation des cellules de l'embryon se définit par un clivage en spirale (Martín-Durán et Marlétaz, 2020).

### 1.1.1. La gamétogenèse et la fécondation

Chez les Bilatériens, le développement de l'organisme passe par une succession d'étapes conservées au cours de l'évolution. En cas de reproduction sexuée, le développement des Bilatériens implique la formation de cellules reproductrices ou gamètes chez les parents. Ce processus nommé gamétogenèse permet la formation de gamètes femelles, les ovocytes, et de gamètes mâles, les spermatozoïdes (Figure 2).



**Figure 2 : Schéma de la gamétogenèse chez les Bilatériens.**

Représentation schématique des étapes de la spermatogenèse et de l'ovogenèse, processus globalement conservés chez les Bilatériens. GP : Globule polaire. Modifié d'après Le Moigne et Fourcier 2001

## Introduction générale

La gamétogenèse est un processus très précoce du développement des Bilatériens pendant lequel la différenciation cellulaire résulte en la production des cellules souches germinales à partir desquelles se forme la lignée germinale (Saffman et Lasko, 1999). La mise en place de cette lignée passe par une première phase de multiplication des cellules diploïdes. Après une succession de mitoses, les cellules entrent dans une phase d'accroissement cellulaire au cours de laquelle le volume de la cellule augmente et l'ADN est dupliqué pour préparer la méiose. La première division de la méiose, dite réductionnelle, engendre la ségrégation des chromosomes homologues. La seconde, dite équationnelle, consiste en une scission des centromères et la séparation des chromatides sœurs, qui constitueront les chromosomes individuels du gamète haploïde. Pour l'ovocyte, cette seconde division méiotique est souvent déclenchée lors de la fécondation, et le matériel surnuméraire est expulsé sous forme de globules polaires lors des toutes premières phases de la segmentation (Le Moigne et Foucrier, 2001).

C'est lors de l'ovogenèse que l'ovocyte accumule toute la machinerie moléculaire qui sera nécessaire aux premières étapes de divisions cellulaires de l'embryon. En effet, des ARN et des protéines spécifiques, ainsi que des réserves énergétiques nommées vitellus, sont synthétisés dans la gonade et accumulés dans l'ovocyte. Ces réserves constituent les seules ressources métaboliques de l'embryon précoce et seront progressivement consommées en parallèle de l'activation du génome zygotique. Chez de nombreux Deutérostomiens et Protostomiens, l'ovocyte est polarisé au cours de l'ovogenèse en un pôle animal et végétatif selon une association asymétrique de l'ovocyte avec les cellules ovariennes voisines. Ces pôles se traduisent dans l'embryon par un gradient de ribonucléoprotéines où leur forte concentration définit le pôle animal, à l'inverse le pôle végétatif est marqué par une forte concentration en réserves vitellines (Picton *et al.*, 1998, Holland, 2000, Matova et Cooley, 2001).

La rencontre d'un gamète mâle et d'un gamète femelle matures donne lieu à la fécondation qui est l'association d'un spermatozoïde et d'un ovocyte produisant la cellule œuf ou zygote. Cette association engendre un « réveil » de l'ovocyte qui termine sa méiose et favorise la fusion des pronucléi mâle et femelle pour former une cellule œuf diploïde. Cette première étape de formation de l'embryon est largement conservée au cours de l'évolution. En effet, les principaux mécanismes de la

## Introduction générale

fécondation : la reconnaissance, l'adhérence et la fusion cellulaire sont similaires des plantes aux animaux (Stricker, 1999, Sankaranarayanan et Higashiyama, 2018).

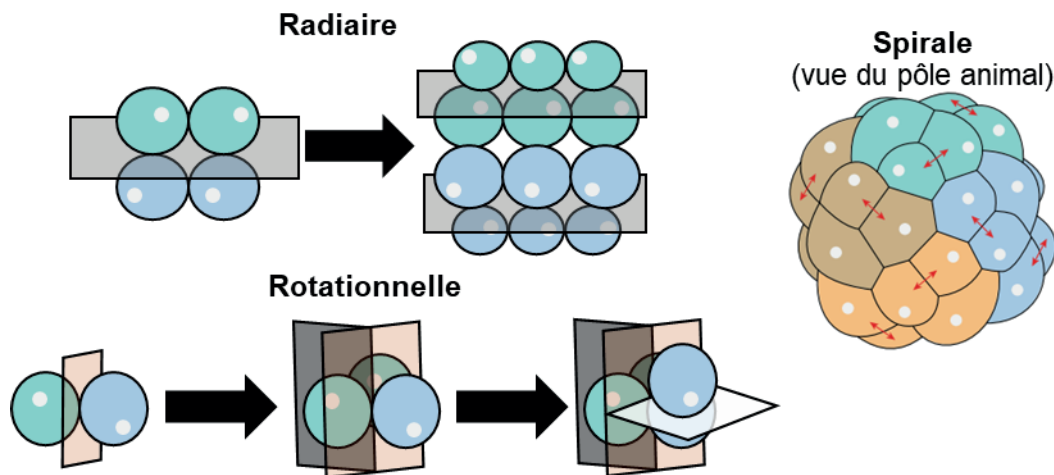
### 1.1.2. La segmentation

Suite à la fécondation, l'embryon unicellulaire met en place un mécanisme de division cellulaire grâce à la machinerie stockée lors de l'ovogenèse. Pendant la segmentation, l'embryon subit de nombreuses divisions sans augmentation de son volume. Différents modes de segmentation existent et sont d'abord classés selon la quantité de vitellus accumulée lors de l'ovogenèse. Les deux principaux modes de segmentation sont une segmentation holoblastique (ou totale) et méroblastique (ou partielle). La segmentation holoblastique est réalisée lorsque les réserves vitellines sont relativement pauvres et engendre majoritairement une cytodierèse inégale donnant la formation de cellules de grandes et petites tailles, dites macromères et micromères, respectivement. La forte concentration de réserves vitellines freine la cytodierèse qui est alors partielle et définit la segmentation méroblastique. Le mode de segmentation holoblastique comprend différents types de segmentation selon la disposition des cellules filles ou blastomères. La segmentation rotationnelle, présente chez les Mammifères, clive l'embryon selon un premier plan de division méridien passant par les pôles animal et végétatif et un second plan perpendiculaire au premier. La segmentation radiaire est présente chez de nombreux Vertébrés avec des plans de clivage cellulaire horizontaux qui engendrent une superposition des blastomères. Enfin, la segmentation en spirale, constituant un caractère ancestral chez les Spiraliens, est observable à partir de la troisième division, où les blastomères suivent un clivage en rotation autour d'un axe parallèle à l'axe des pôles animal et végétatif (Valentine, 1997, Scholtz et Wolff, 2013, Hasley *et al.*, 2017, Martín-Durán et Marlétaz, 2020) (**Figure 3**).

La segmentation aboutit à l'obtention d'une blastula. La forte activité mitotique observée en segmentation se poursuit et conduit à la formation d'une cavité centrale, appelée blastocèle. Lors de la formation de cet embryon pluricellulaire, deux processus se déclenchent de façon séquentielle ou simultanée selon les espèces. Le premier processus est la transition maternelle à zygotique (MZT) lors de laquelle la déplétion en protéines et ARN maternels déclenche l'activation de la transcription du génome zygotique. Le second mécanisme est la transition blastuléenne, qui

## Introduction générale

correspond à une désynchronisation et à un ralentissement de la division des blastomères (Le Moigne et Foucrier, 2001, Vastenhouw *et al.*, 2019).



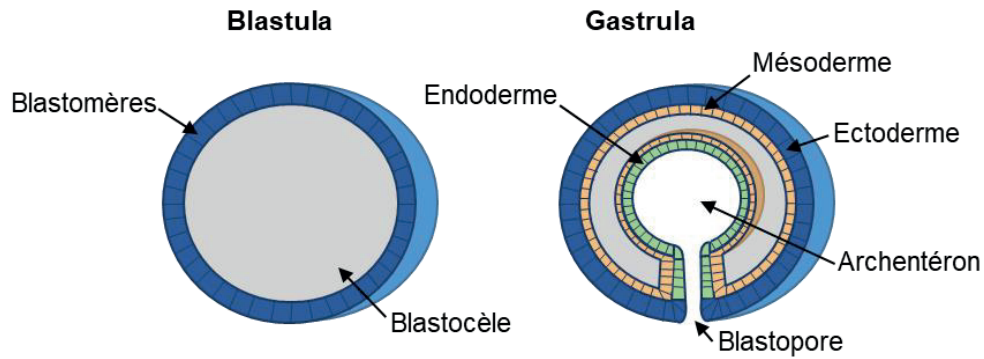
**Figure 3 : La segmentation holoblastique.**

Représentation schématique des trois types de segmentation holoblastique : radiaire (en haut à gauche) chez les Vertébrés, rotationnelle (en bas à gauche) caractéristique des Mammifères et en spirale (à droite) caractéristique des Spiraliens. Le schéma de la segmentation en spirale est réalisé d'après Martin-Duran et Marletaz, 2020.

### 1.1.3. La gastrulation

La perte de synchronicité des divisions cellulaires et le rallongement de l'interphase du cycle des blastomères conduit à des modifications du microenvironnement local de chaque cellule. Elles résultent d'une part de l'établissement de nouvelles interactions de contact et d'autre part de l'intégration de signaux reçus au niveau de chaque blastomère. Ces phénomènes conduisent au début de leur spécialisation dans l'embryon et favorisent les mouvements entre les cellules et leur migration lors de la gastrulation. Ces mouvements morphogénétiques, coordonnés dans le temps et dans l'espace, conditionnent cette étape clé de l'embryogenèse et résultent en l'apparition d'une cavité, l'archentéron, ouverte vers l'extérieur au niveau de l'orifice primordial de l'embryon appelé blastopore (**Figure 4**). Les mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation aboutissent à la formation des trois feuillets cellulaires de l'embryon triploblastique : l'ectoderme, ou feuillet externe, le mésoderme médian et l'endoderme qui borde l'archentéron.

## Introduction générale



**Figure 4 : Schéma de la blastula et gastrula**

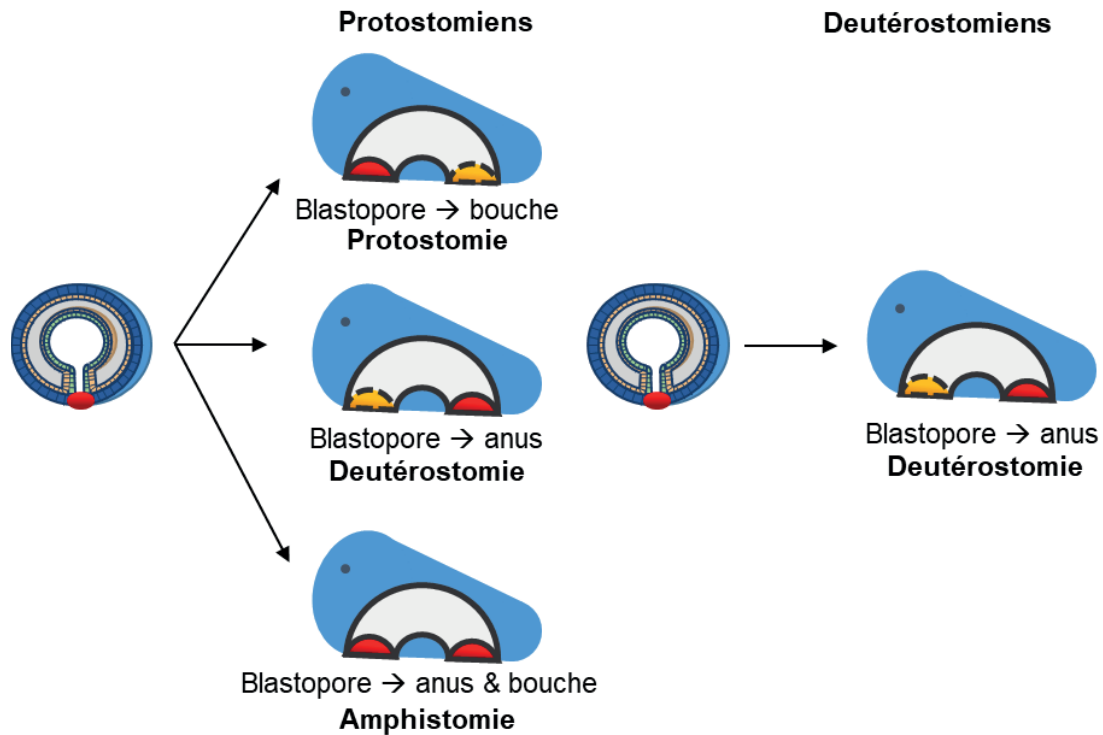
Illustration de la formation du blastopore et de l'archentéron chez les Bilatériens.

Le devenir du blastopore est crucial chez les Bilatériens car il est à l'origine de la définition des Deutérostomiens, dont le blastopore forme l'anus en premier, et des Protostomiens dont le devenir du blastopore est plus complexe. En effet, le blastopore des Protostomiens a premièrement été décrit pour être à l'origine de la bouche.

Cependant, cette observation est à nuancer, car chez certains Protostomiens, ce blastopore peut aussi devenir l'anus en premier (deutérostomie) ou encore s'allonger pour donner simultanément la bouche et l'anus (amphistomie) (Holland, 2000, Solnica-Krezel, 2005, Martín-Durán *et al.*, 2012) (**figure 5**).

### 1.1.4. La neurulation, l'organogenèse et la gonadogenèse.

Les mouvements cellulaires de la gastrulation établissent le plan d'organisation général de l'organisme et les cellules regroupées selon leur devenir vont former les différents organes, c'est l'organogenèse (Nielsen, 2004, 2015). Elle commence par la neurogenèse caractérisée par la formation du tube neurale dont les modalités dépendent du clade observé (Hartenstein et Stollewerk, 2015). Lors des mouvements cellulaires, les cellules germinales primordiales migrent vers les territoires somatiques et vont ainsi se spécialiser en cellules germinales souches (Moore *et al.*, 1998, Extavour, 2007a). Les cellules germinales souches, à l'origine de la lignée germinale, participent à la formation de la gonade se différenciant en une gonade mâle, où se déroule la spermatogenèse, ou une gonade femelle, où se produit l'ovogenèse (Extavour, 2007b). Cependant, chez certains Bilatériens l'organogenèse ne donne pas un individu semblable à l'adulte mais un organisme qui présentera un ou plusieurs stades larvaires avant une réorganisation tissulaire, la métamorphose (Bayne, 2017).



**Figure 5 : Le devenir du blastopore chez les Bilatériens**

Représentation schématique de la formation du blastopore chez les Protostomiens (à gauche) et Deutérostomiens (à droite). En rouge est représenté le blastopore au niveau de la gastrula et son devenir dans l'embryon. En jaune est le second orifice de l'embryon qui se forme dans un second temps. Protostomie : apparition de la bouche en premier, Deutérostomie : apparition de l'anus en premier et Amphistomie : formation de la bouche et l'anus simultanément. Modifié d'après Martin-Duran *et al.*, 2012

## 1.2. Régulation moléculaire du développement

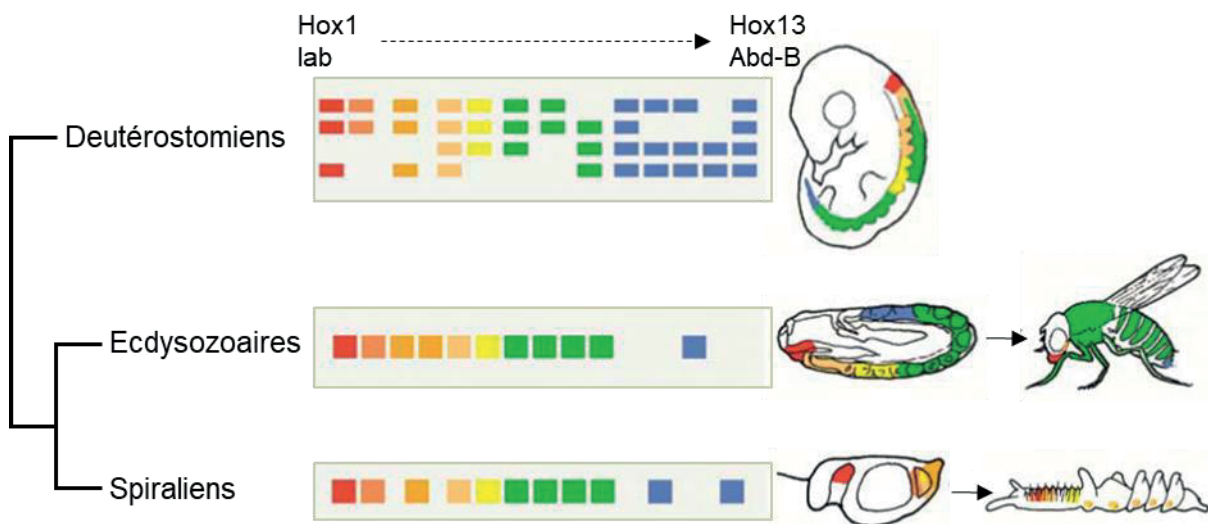
### 1.2.1. L'émergence de cellules distinctes à partir d'un génome unique

La structure de l'organisme est acquise progressivement lors de l'embryogenèse grâce à un ensemble coordonné de proliférations, modifications et morts cellulaires chez tous les organismes Métazoaires. Elle repose sur l'engagement des blastomères indifférenciés vers les feuillettes de l'embryon se différenciant et s'associant pour former les organes et tissus de l'organisme adulte. Or, cette variabilité phénotypique au niveau cellulaire émerge à partir du génome unique de la cellule œuf, transmis dans son intégralité aux cellules filles. Ainsi les cellules différenciées n'expriment qu'une partie des gènes et leurs phénotypes reposent sur l'établissement et le maintien de transcriptomes spécifiques à partir de l'homogénéité du génome zygotique. La

## Introduction générale

mosaïque de phénotypes acquise progressivement par les cellules de l'embryon, lors de l'ontogenèse, résulte de la régulation différentielle de l'expression des gènes, un mécanisme commun à tous les Bilatériens.

Par exemple, les gènes *HOX* codent des facteurs de transcription, qui contrôlent l'expression de gènes déterminant le plan d'organisation général de l'organisme selon l'axe antéro-postérieur (**Figure 6**). Leur expression colinéaire suit un ordre précis dans l'espace, mais aussi dans le temps chez certains clades (Gaunt, 2018). Ces gènes homéotiques ont tout d'abord été décrit chez la drosophile où ils sont organisés en deux clusters (*Antennapedia* et *Bithorax*, Postlethwait et Schneiderman, 1971, Lewis, 1978). Le cluster *Antennapedia* détermine la structure de la tête et du thorax et sa mutation entraîne la formation de pattes à la place des antennes. Le cluster *Bithorax* contrôle la formation du troisième segment thoracique et de l'abdomen et sa mutation entraîne la formation d'un second métathorax.



**Figure 6 : Contrôle de l'axe antéro-postérieur par l'expression colinéaire des gènes *HOX***

Schéma simplifié de l'expression des gènes *HOX* chez les Bilatériens contrôlant la mise en place de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon et donc le plan d'organisation de l'organisme. Modifié d'après Swalla, 2006

Les BMP (*Bone morphogenetic proteins*) composent un large sous-groupe d'acteurs de la voie de signalisation TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) largement conservés chez les Bilatériens. Ces protéines sécrétées activent les facteurs de transcription SMAD (*Mother against decapentaplegic*) activant ou réprimant l'expression de gènes cibles. Elles sont donc impliquées dans une multitude de



## Introduction générale

fonctions cellulaires telles que la différenciation, l'apoptose, la prolifération et la migration cellulaire (Urist, 1965, Zou et Niswander, 1996, Onagbesan *et al.*, 2003, Goldstein *et al.*, 2005). Ces acteurs clés du développement embryonnaire s'expriment en gradient le long de l'axe dorso-ventral et guident la formation de tissus spécifiques. Chez les Bilatériens, elles guident notamment la localisation du tube neural en position dorsale chez les Vertébrés et ventrale chez les Protostomiens (Bier et De Robertis, 2015).

Le gène *vasa* code pour une hélicase à ARN comprenant une « DEAD-box » et dont l'activité de linéarisation des ARN dépend de l'ATP et favorise la traduction d'ARNm (ARN messenger) cibles. Chez les Bilatériens, sa présence dans l'embryon est soit due à une transmission maternelle *via* le cytoplasme de l'ovocyte, soit induite par l'interaction entre les cellules germinales et les cellules somatiques (Raz, 2000). Les délétions de cet acteur chez la drosophile, la souris et le nématode ont permis de mettre en évidence son rôle dans la mise en place de la lignée germinale. Cette fonction ou son association avec le développement de la lignée germinale sont largement conservés chez les Bilatériens (Gustafson et Wessel, 2010).

### 1.2.2. L'eco-evo-devo

Ces quelques exemples mettent en évidence une conservation, au sein des Bilatériens, de facteurs de transcriptions et de facteurs paracrines qui régulent de nombreux aspects du développement embryonnaire, et notamment les étapes précoces. Ces facteurs régulent de manière précise l'expression de gènes conduisant à la définition de l'identité des cellules le long des axes de l'organisme. Or, leur mutation conduit à des changements morphologiques qui sont potentiellement associés à des étapes importantes de la phylogenèse. Ils apparaissent alors comme une source de diversité phénotypique via la régulation de transcriptomes spécifiques dans le temps et dans l'espace. En effet, ces facteurs sont eux-mêmes régulés par des mécanismes influencés par l'environnement au sens large (Raz, 2000, Banreti *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2014). La conservation au cours de l'évolution du rôle développemental de ces facteurs de régulation du phénotype des organismes, ainsi que leur régulation par l'environnement amène à l'« eco-evo-devo » (Gilbert, 2001).



### 1.2.3. Régulation moléculaire des transcriptomes développementaux

Au cours du développement, les transcriptomes sont dictés d'une part par l'accessibilité des séquences régulatrices et codantes à la machinerie de transcription au niveau du génome, qui dépendent de mécanismes chromatinien ou « épigénétiques ». D'autre part, les transcriptomes à l'origine des phénotypes reposent sur le devenir des transcrits contrôlés notamment par la coiffe, la queue polyadénylée et des marques « épitranscriptomiques ». Ces transcriptomes sont progressivement établis à chaque étape du développement dans chaque cellule. C'est donc sur l'évolution des transcriptomes que repose le développement et sur l'évolution des mécanismes contrôlant ces transcriptomes que repose la diversité des phénotypes.

Dans cette partie nous avons fait le choix de ne développer que les mécanismes épigénétiques et les mécanismes épitranscriptomiques.

#### 1.2.3.1. Les mécanismes épigénétiques

##### Méthylation de l'ADN :

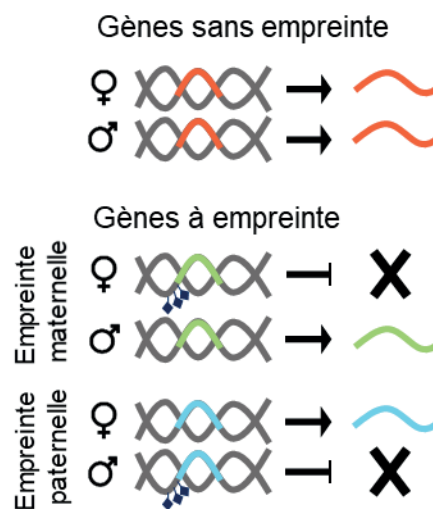
La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyle à la séquence nucléotidique. Cette modification prévalente sur le carbone 5 des cytosines appelée 5-méthylcytosine (5mC) est la plus étudiée. Elle est très conservée au cours de l'évolution où elle est principalement localisée au niveau des dinucléotides CpG chez de nombreux Bilatériens (Fallet *et al.*, 2020, de Mendoza *et al.*, 2020). Cependant, certaines régions de l'ADN appelées îlots CpG, majoritairement retrouvées dans les régions promotrices, sont dépourvues de méthylation (Bird *et al.*, 1985). La localisation des 5mC dépend d'une machinerie comprenant des méthyltransférases de l'ADN, les DNMT (*DNA methyl-transferases*) qui catalysent la méthylation sur le brin d'ADN et la maintiennent à chaque cycle de réplication (Sneider *et al.*, 1975). Cette méthylation peut être effacée par dilution réplivative ou par déméthylation active. La déméthylation active de l'ADN est un mécanisme complexe qui implique plusieurs voies enzymatiques parfois redondantes, ainsi que de nombreux intermédiaires métaboliques et des mécanismes de réparation de l'ADN (Bhutani *et al.*, 2011).

La méthylation des îlots CpG dans les promoteurs des gènes est principalement associée à la répression de la transcription chez les Mammifères (Suzuki *et al.*, 2007,

## Introduction générale

de Mendoza *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2019). Elle est aussi associée à une expression constitutive ou une répression des transposons lorsqu'elle est située dans le corps du gène (Bourc'his et Bestor, 2004, Zhang *et al.*, 2006, Suzuki *et al.*, 2007, Rountree et Selker, 2010, Law et Jacobsen, 2010, Jones, 2012, Manakov *et al.*, 2015, Gatzmann *et al.*, 2018). Bien que les profils précis de 5mC soient divers entre les espèces (de Mendoza *et al.*, 2020), il ne semble exister qu'un nombre limité de motifs généraux et la 5mC apparaît comme une caractéristique universelle des génomes eucaryotes.

Cette marque de l'ADN est cruciale pour le développement des organismes de par son implication dans la différenciation cellulaire (Santos *et al.*, 2002, Ng *et al.*, 2008, Huang et Fan, 2010), l'activation du génome zygotique (Potok *et al.*, 2013, Eckersley-Maslin *et al.*, 2018) et l'inactivation du chromosome X (Mohandas *et al.*, 1981, Weber *et al.*, 2007, Nora et Heard, 2010). La 5mC joue aussi un rôle clé dans l'empreinte génomique parentale chez les Mammifères. Bien que le génome paternel subisse une déméthylation active et le génome maternel une déméthylation passive, certaines régions résistent à cette déméthylation et permettent une expression préférentielle d'un allèle parental (Bartolomei *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1993, Wutz *et al.*, 1997, Fitzpatrick *et al.*, 2002) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Régulation de l'empreinte parentale régulée par la méthylation de l'ADN**

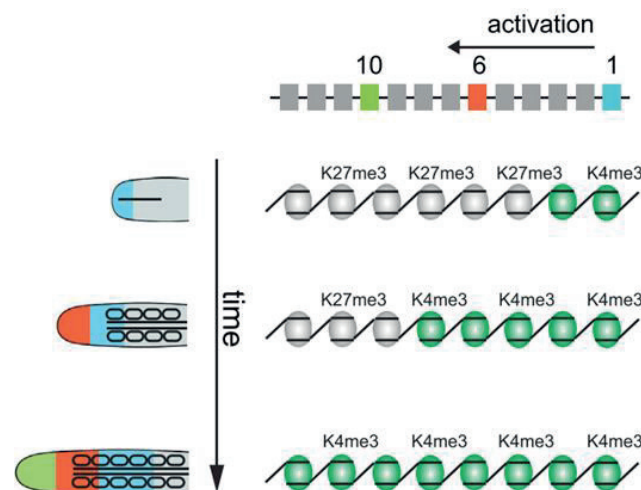
Schéma de la régulation de l'expression préférentielle d'un allèle parental contrôlé par la méthylation de l'ADN. En orange l'expression d'un gène sans empreinte parentale. En vert l'expression du gène allèle paternel est due à une méthylation de l'ADN de l'allèle maternel. En bleu, expression du gène allèle femelle car l'allèle mâle est méthylé. Modifié d'après Godini *et al.*, 2019

## Introduction générale

### Modification des histones :

Les extrémités N-terminales des séquences des histones émergent du nucléosome, favorisant la liaison de protéines et l'installation de modifications post-traductionnelles très variées qui constituent le code histone. Celui-ci est mis en place par une machinerie comprenant des enzymes qui déposent ou enlèvent ces modifications et ainsi modulent l'expression des gènes. Selon le type de modifications méthylation, acétylation ou phosphorylation, et l'acide aminé modifié, la régulation de la transcription peut être stimulée ou réprimée (Ramazi *et al.*, 2020).

Chez les Bilatériens, l'expression des gènes *HOX* suit un ordre précis selon leurs positions dans le cluster que forment ces gènes. Leur transcription colinéaire délimite des zones d'expression de gènes contrôlant la mise en place du plan d'organisation bilatéral de l'organisme (Le Moigne et Foucrier, 2001). Chez la souris, la transcription des gènes *HOX* est réprimée par la tri-méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27, la H3K27me3. L'activation progressive de la transcription de ces gènes est associée à la modification H3K4me3 qui est tout d'abord installée en 3' du cluster. La modification H3K27me3 en 5' est éliminée séquentiellement laissant place à la H3K4me3 pour activer la transcription des autres gènes (Montavon et Soshnikova, 2014) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Régulation de l'expression colinéaire des gènes *HOX* régulée par la méthylation des histones**

La transition de modifications des histones active la transcription du cluster des gènes *HOX*. L'ensemble du cluster est réprimé par la modification H27me3 (gris) qui progressivement est effacée et remplacée par la modification activatrice H3K4me3 (vert). Cette transition active progressivement la transcription des gènes *HOX* au cours du temps (*HOX* 1 : bleu, *HOX* 6 : orange, *HOX* 10 : vert). D'après Montavon et Soshnikova, 2014

## Introduction générale

En plus de ce rôle dans la régulation de l'expression des gènes HOX, les modifications des histones sont impliquées dans de nombreux mécanismes développementaux comme la différenciation cellulaire (Lee *et al.*, 2004, Hawkins *et al.*, 2010, Melcer *et al.*, 2012, Nicetto *et al.*, 2019), l'activation du génome zygotique (Wasson *et al.*, 2016, Eckersley-Maslin *et al.*, 2018, Sato *et al.*, 2019, Zhu *et al.*, 2019) ou l'inactivation du chromosome X (Plath *et al.*, 2003, Okamoto *et al.*, 2004, Żylicz *et al.*, 2019) et contribuent à l'empreinte parentale (Inoue *et al.*, 2017a).

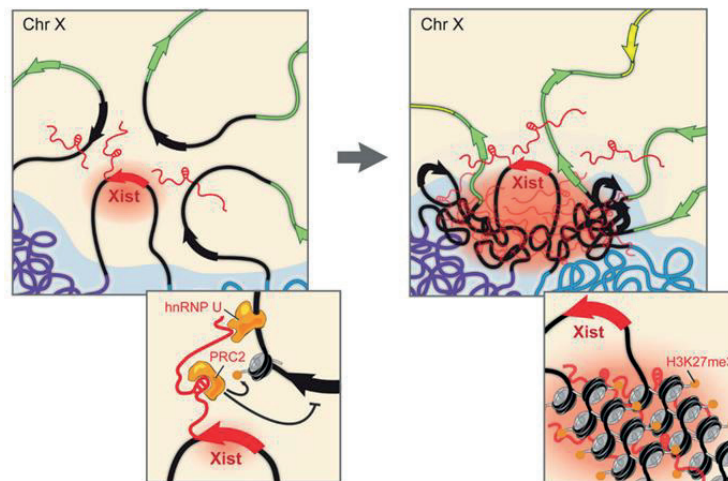
### ARN non-codants :

Les ARN non codants correspondent à des ARN transcrits et non traduits classés selon leur taille. Les petits ARN sont des ARN inférieurs à 200 paires de bases comprenant les siARN (ARN interférents courts), les miARN (microARN) et les piARN (ARN lié à Piwi). Ces petits ARN diffèrent notamment par leur biogenèse. Les miARN et les siARN sont issus de la maturation d'ARN non-codants en épingle à cheveux ou d'ARN doubles brins, respectivement. Leur maturation s'achève par la complexation de l'ARN avec une protéine Argonaute pour former le complexe RISC (*RNA-induced silencing complexe*) (Bartel, 2004). Les piARN, produits à partir d'éléments répétés intergéniques, se lient à la sous-classe des protéines Argonautes, les Piwis (Weick et Miska, 2014). Ces petits ARN participent à la régulation des gènes en guidant le complexe dont ils font partie vers les ARN cibles et sont particulièrement connus pour induire la dégradation d'ARNm cibles et la formation de l'hétérochromatine (Olsen et Ambros, 1999, Pham *et al.*, 2004, Bagga *et al.*, 2005, Orban et Izaurralde, 2005, Weick et Miska, 2014). De par leur fonction de régulation de l'expression des gènes, ces ARN non codants jouent un rôle crucial dans le développement des organismes et notamment dans la différenciation cellulaire (Giraldez *et al.*, 2005, Watanabe *et al.*, 2008, Gonzalez *et al.*, 2015).

La classe d'ARN non codants correspondant à des transcrits de longueur supérieure à 200 paires de bases est nommée longs ARN non codants ou lncARN. Ils sont transcrits à partir de diverses régions du génome, notamment de régions intergéniques, introniques et exoniques où ils contrôlent la conformation de la chromatine, la transcription des gènes et l'épissage des ARNm (Petruk *et al.*, 2006, Khandelwal *et al.*, 2015, Bhat *et al.*, 2016). Bien que la fonction de nombreux lncARN soit inconnue, le lncARN XIST (*X-inactive specific transcript*) constitue un modèle

## Introduction générale

particulièrement étudié pour son rôle dans l'inactivation du chromosome X chez les Mammifères. La compensation de l'expression des gènes d'un des deux chromosomes X chez la femelle passe par l'inhibition de sa transcription. XIST déclenche l'inactivation de ce chromosome en le tapissant et en recrutant des complexes protéiques qui vont entraîner son hétérochromatisation et ainsi réprimer l'expression des gènes portés par ce chromosome (Engreitz *et al.*, 2013) (**Figure 9**).



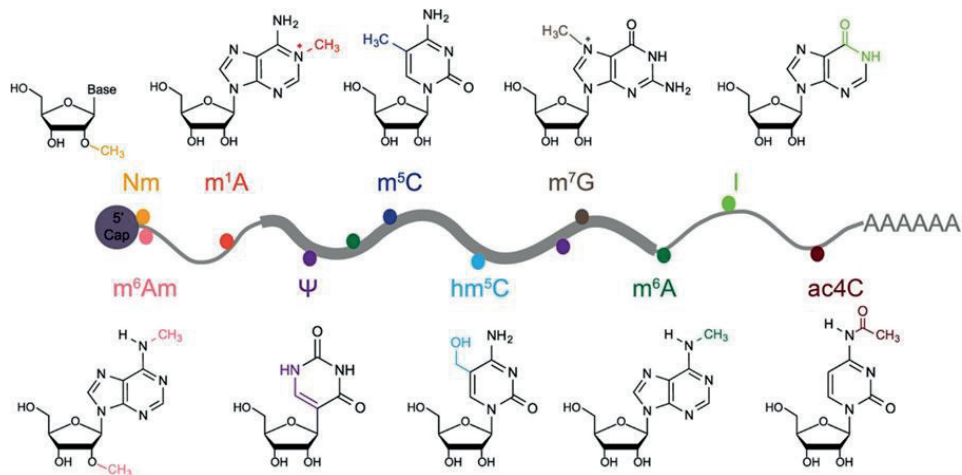
**Figure 9 : Modèle de l'inactivation du chromosome X par le lncARN XIST.**

L'expression du lncARN XIST conduit à la condensation de la chromatine du second chromosome X chez la femelle. Il entraîne la compaction de l'ADN en recrutant différentes protéines telles que hnRNP U et PRC2 qui mettent en place la modification répressive H3K27me3. Cette compaction entraîne le rapprochement de nouvelles régions du chromosome (vert et jaune) à proximité du locus de Xist et permet l'expansion de l'inactivation du chromosome. D'après Engreitz *et al.*, 2013

### 1.2.3.2. Les mécanismes épitranscriptomiques

Plus d'une centaine de modifications des ARN sont décrites. Un nombre important de modifications sont décrites sur les ARNt (ARN de transfert), les ARNr (ARN ribosomique) et en moindre mesure sur les ARNm (Boccaletto *et al.*, 2018). Cependant, elles sont particulièrement étudiées au niveau des ARNm, car elles sont susceptibles d'influencer l'expression des gènes sans affecter la séquence primaire, au même titre que les modifications épigénétiques. Contrairement aux marques histones et ADN qui affectent les gènes, les marques ARN et la machinerie associée affectent les transcrits et sont regroupées sous le terme épitranscriptomique (Saletore *et al.*, 2012) (**Figure 10**).

## Introduction générale



**Figure 10 : Les modifications de l'ARNm**

Schéma des modifications identifiées sur l'ARNm et leurs positions sur le transcrit. Nm : 2'-O-méthylation, m<sup>6</sup>Am : N<sup>6</sup>,2'-O-diméthyladénosine, m<sup>1</sup>A ; N<sup>1</sup>-méthyladénosine, Ψ : Pseudouridine, m<sup>5</sup>C : 5-méthylcytosine, hm<sup>5</sup>C : 5-hydroxyméthylcytosine, m<sup>7</sup>G : N<sup>7</sup>-méthylguanosine, m<sup>6</sup>A : N<sup>6</sup>-méthyladénosine, ac4C : N<sup>4</sup>-acétylcytidine. D'après Song et Yi, 2020

### 2'-O-méthylation (2'-O-me ou Nm) :

La 2'-O-méthylation (Nm) est une modification commune retrouvée principalement sur les ARNr, les ARNt, les petits ARN nucléolaires (snoARN) et récemment décrite comme modification interne des ARNm (Ayadi *et al.*, 2019, Elliott *et al.*, 2019). En plus de sa principale localisation proche de la coiffe, la Nm est également retrouvée au niveau de régions codantes (Ayadi *et al.*, 2019). Son dépôt est guidé par un snoARN couplé à la fibrillarine qui porte l'activité de méthyltransférase (Ayadi *et al.*, 2019, Elliott *et al.*, 2019). Bien que la fonction de la Nm située dans le corps des ARNm reste méconnue, Elliott et collaborateurs (2019) suggèrent un rôle dans la stabilité et l'inhibition de la traduction.

### N<sup>1</sup>-méthyladénosine (m<sup>1</sup>A) :

La N<sup>1</sup>-méthyladénosine (m<sup>1</sup>A) est une modification de l'ARN qui porte une charge positive en conditions physiologiques et engendre un mésappariement des paires de bases (Zhang et Jia, 2018). La m<sup>1</sup>A affecte la structure secondaire des ARNt (Zhang et Jia, 2018) et la maturation des ARNr (Waku *et al.*, 2016). Elle est aussi présente sur les ARNm et les lncARN (Li *et al.*, 2016b, Dominissini *et al.*, 2016, Safra *et al.*, 2017, Schwartz, 2018, Seo et Kleiner, 2019, Zhou *et al.*, 2019a) au niveau de la séquence consensus GUUCNA\*NNC (A\* = m<sup>1</sup>A) au sein d'une structure en tige-boucle (Safra *et*



## Introduction générale

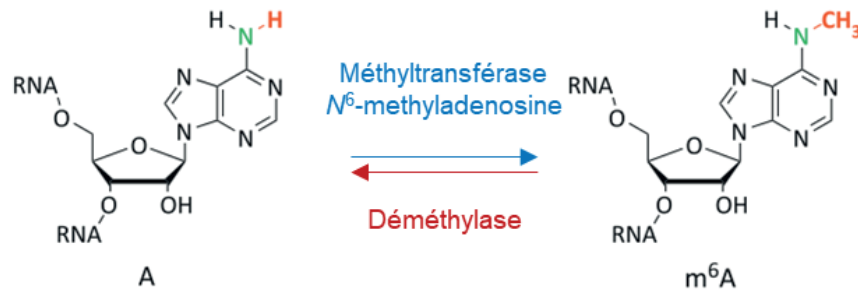
*al.*, 2017). La m<sup>1</sup>A est majoritairement localisée au niveau du 5' UTR (*Untranslated region*) (Li *et al.*, 2016b, Dominissini *et al.*, 2016, Safra *et al.*, 2017, Schwartz, 2018, Zhou *et al.*, 2019a) mais est aussi présente, dans une moindre mesure, dans les régions codantes et 3' UTR des ARNm (Safra *et al.*, 2017, Zhou *et al.*, 2019a). Cependant, son effet sur la traduction reste controversé (Li *et al.*, 2016b, Dominissini *et al.*, 2016, Safra *et al.*, 2017).

### 5-méthylcytosine (m<sup>5</sup>C) :

La 5-méthylcytosine (5mC) est une modification de l'ADN largement étudiée et retrouvée chez de nombreux organismes. Cependant, la 5-méthylcytosine est aussi présente sur de nombreux ARN (m<sup>5</sup>C) permettant une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. En effet, cette méthylation de la cytosine, présente chez les Eucaryotes, module la traduction en affectant notamment la biogénèse des ribosomes et la stabilité des ARNt (Kuznetsova *et al.*, 2019). Cette méthylation est retrouvée au niveau de structures secondaires en tige-boucle dont deux motifs ont été identifiés : le premier, dépendant de la NSUN2 (protéine à domaine NOL1/NOP2/Sun), qui méthyle la cytosine au niveau de la tige avec un motif GGG en 3' de la cytosine méthylée ; le second, indépendant de la NSUN2, est retrouvé dans la boucle et comprend un motif UCCA en 3' de la m<sup>5</sup>C (Huang *et al.*, 2019b, Schumann *et al.*, 2020). La déméthylation des ARNm, comme pour l'ADN, passe par des intermédiaires métaboliques dont la hm<sup>5</sup>C présente une fonction dans la régulation de la traduction des ARNm (Delatte *et al.*, 2016). La m<sup>5</sup>C est aussi associée à l'export nucléaire ou la stabilité des m<sup>5</sup>C-ARN (Yang *et al.*, 2017a, 2019). De plus, selon sa localisation au niveau du 3' UTR, 5' UTR ou des régions codantes cette méthylation va favoriser ou non la traduction (Trixl et Lusser, 2019).

## 2. La N<sup>6</sup>-méthyladénosine

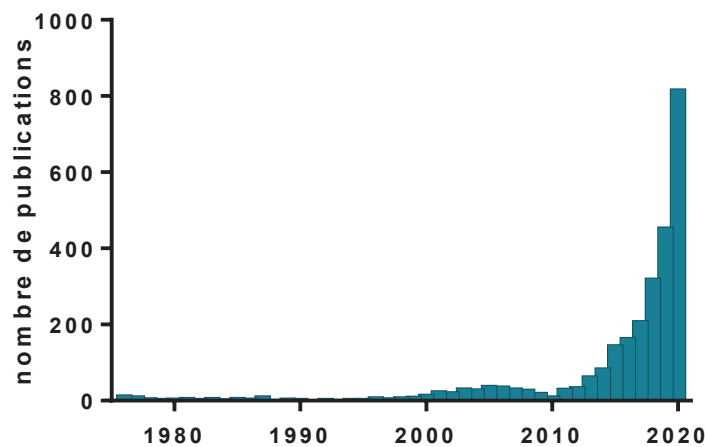
La N<sup>6</sup>-méthyladénosine est une méthylation de l'azote 6 de l'adénosine (**figure 11**), découverte dans les années 1970 dans les ARN de Mammifères, de drosophile, de plantes et de virus (Desrosiers *et al.*, 1974, 1975, Perry *et al.*, 1975, Adams et Cory, 1975, Krug *et al.*, 1976, Wei *et al.*, 1976, Levis et Penman, 1978, Nichols, 1979).



**Figure 11 : La  $m^6A$ , une marque réversible**

Représentation schématique de la méthylation de l'adénosine (A) par l'activité catalytique de méthyltransférases qui lient un groupement méthyle à l'azote 6 de l'adénosine ( $m^6A$ ). Cette marque réversible peut être effacée par des déméthylases. Modifié d'après Jia *et al.*, 2013

Jusque dans les années 2010, les études sur cette méthylation de l'ARN sont restreintes à sa localisation sur l'ARNm de la prolactine bovine, l'ARNsn U6 (petit ARN nucléaire) chez les Eucaryotes (Horowitz *et al.*, 1984, Carroll *et al.*, 1990, Narayan *et al.*, 1994, Shimba *et al.*, 1995) et à la purification partielle du complexe portant l'activité de méthyltransférase (Bokar *et al.*, 1994, 1997). L'arrivée du séquençage haut débit a conduit au développement du MeRIP-seq (ou  $m^6A$ -seq), une technique permettant d'obtenir la distribution de la méthylation sur les molécules d'ARN (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012). La mise en place de cette technique couplée à la découverte d'une déméthylase de la  $m^6A$ , la FTO (*Fat mass and obesity associated gene*) impliquée dans l'obésité chez les Vertébrés (Jia *et al.*, 2011), a permis à cette méthylation d'être plus largement explorée ces dernières années (**Figure 12**).



**Figure 12 : Nombre de publications concernant la  $m^6A$**

Graphique représentant le nombre de publications contenant le terme «  $m^6A$  » ou «  $N^6$ -méthyladénosine » des années 1970 à 2020. Données PubMed



### 2.1. La machinerie de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine dépend d'une machinerie enzymatique composée de *writers* portant l'activité de méthyltransférase mais aussi de *readers* reconnaissant cette méthylation et médiant ses effets. Enfin, cette machinerie comprend des *erasers* dont l'activité enzymatique enlève les groupes méthyles des adénines. Conjointement avec le reste de la machinerie, ils rendent cette méthylation dynamique. Cette machinerie est globalement conservée dans l'évolution des Eucaryotes et notamment entre les Vertébrés et les Ecdysozoaires bien que certaines différences soient observées au sein des Bilatériens.

#### 2.1.1. La machinerie chez les Vertébrés

##### Writers :

La m<sup>6</sup>A-ARN repose sur une activité ARN-méthyltransférase qui catalyse le transfert d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) au niveau de l'azote 6 de l'adénosine, à partir du donneur de méthyle, la S-adénosylméthionine (SAM) (Bokar *et al.*, 1997). L'activité de méthylation est localisée dans le noyau (Ping *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014a, Schöller *et al.*, 2018), où la liaison du groupement méthyle à l'adénosine se fait de manière co-transcriptionnelle lors de la synthèse de l'ARN (Ke *et al.*, 2017, Slobodin *et al.*, 2017, Knuckles *et al.*, 2017). Cette activité catalytique est réalisée par différentes enzymes chez les Vertébrés qui fonctionnent ou non en complexe (**Tableau 1**).

- Le complexe de méthylation :

Les premières études réalisées par Bokar et collaborateurs (1994) ont permis de caractériser deux complexes protéiques, le complexe MT-A de 200 kDa et le complexe MT-B de 875 kDa. Néanmoins, seul le complexe MT-A comporte une activité catalytique méthyltransférase, qui est portée par une protéine du complexe de 70 kDa, la MT-A70, nommée aujourd'hui METTL3 (*Methyltransferase-like 3*) (Bokar *et al.*, 1994, 1997). En effet, cette enzyme est la seule sous-unité du complexe à lier la SAM et à comporter un domaine catalytique actif (Wang *et al.*, 2016a, Śledź et Jinek, 2016). La déplétion en METTL3 conduit à une forte diminution, voire une quasi disparition, de la m<sup>6</sup>A des ARN polyadénylés dans les cellules souches embryonnaires de la souris

## Introduction générale

(Geula *et al.*, 2015). Cependant, METTL3 ne semble pas active seule, puisque l'activité de l'hétérodimère formé de METTL3 et METTL14 est bien plus importante (Liu *et al.*, 2014a, Wang *et al.*, 2014c, Schwartz *et al.*, 2014). Au sein de ce complexe, METTL14 joue un rôle cruciale en stabilisant la structure de METTL3, ce qui améliore sa liaison à l'ARN et favorise son activité catalytique (Wang *et al.*, 2016a, 2016b, Schöller *et al.*, 2018).

**Tableau 1 : « Writers » identifiés chez les Bilatériens**

Protéines comportant une activité catalytique méthyltransférase  $m^6A$  chez les Bilatériens. ? : conservation inconnue, - : protéine potentiellement absente

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Bombyx mori</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Apis mellifera</i>
MAC	METTL3	METTL3	METTL3	lme4	METTL3	-	METTL3
	METTL14	METTL14	METTL14	METTL14	METTL14	-	METTL14
	WTAP	WTAP	WTAP	Fl(2)d	WTAP	-	WTAP
MACOM	HAKAI	HAKAI	HAKAI	Hakai	?	-	?
	VIRMA	VIRMA	VIRMA	Virilizer	?	-	?
	ZC3H13	ZC3H13	ZC3H13	Flacc ou Xio	?	-	?
	RBM15/15B	RBM15/15B	RBM15/15B	Nito	?	-	?
Méthyltransférase indépendante	METTL16	METTL16	METTL16	CG7544	?	MET-10	?
	ZCCHC4	ZCCHC4	ZCCHC4	ZCCHC4 (activité supposée)	?	ZCCHC4	?
	METTL4 ( $m^6Am$ )	METTL4 ( $m^6Am$ )	METTL4 ( $m^6Am$ )	CG14906	?	?	?
Autre complexe de méthylation	METTL5	METTL5	METTL5	CG9666	?	METL-5	?
	TRMT112	TRMT112	TRMT112	TRMT112	?	TRMT112 (ne se complexe pas à METL-5)	

Ces caractéristiques biochimiques définissent l'hétérodimère METTL3/METTL14 comme le cœur catalytique du complexe de méthylation (Wang *et al.*, 2016a, Śledź et Jinek, 2016), aussi nommé le complexe METTL- $m^6A$  (MAC) (Knuckles *et al.*, 2018).

## Introduction générale

Le MAC méthyle les ARN cibles au niveau d'une séquence consensus conservée chez les Vertébrés, RRA\*CH (R=A ou G, H= A, C ou U, A\*= m<sup>6</sup>A) (Ping *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014a, Śledź et Jinek, 2016, Schöller *et al.*, 2018). Or seule une partie de ces séquences consensus sur les transcrits est méthylée (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012), ce qui suggère que d'autres sous-unités régulatrices guident le complexe de méthylation au niveau de sites de méthylation spécifiques.

En effet, de nombreuses sous-unités pouvant se lier au cœur catalytique forment elles-mêmes un sous-complexe nommé MACOM (Complexe associé aux METTL-m<sup>6</sup>A) (Knuckles *et al.*, 2018). Le MACOM comprend cinq protéines qui s'associent aux METTLs *via* la sous-unité régulatrice WTAP (Wilms tumor 1-associating protein) (Horiuchi *et al.*, 2013, Schwartz *et al.*, 2014, Schöller *et al.*, 2018). WTAP est une sous-unité indispensable à l'activité de méthylation du MAC qui facilite sa liaison aux transcrits cibles et qui les guide vers des régions nucléaires à forte activité d'épissage les « nuclear speckles » (Ping *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014a, Schwartz *et al.*, 2014, Ke *et al.*, 2015, Schöller *et al.*, 2018). VIRMA (*Vir-like m<sup>6</sup>A methyltransferase associated*, ou KIAA1429) est le deuxième composant du MACOM identifié chez les Vertébrés par une co-immunoprécipitation de METTL3 (Schwartz *et al.*, 2014) et pour son interaction avec WTAP (Horiuchi *et al.*, 2013). Cette sous-unité guide le complexe METTL3-METTL14-WTAP au niveau du 3' UTR et autour du codon stop des ARN polyadénylés. De plus, cette sous-unité est impliquée dans la régulation du choix du site de polyadénylation de l'ARN (Yue *et al.*, 2018b).

Le MACOM comprend aussi les protéines HAKAI (*RING finger E3 ubiquitin ligase*) dont la fonction au sein du complexe reste méconnue et ZC3H13 (*Zinc finger CCCH-type containing 13*) (Horiuchi *et al.*, 2013, Yue *et al.*, 2018b). ZC3H13 détermine la localisation nucléaire du MACOM (Wen *et al.*, 2018) et possède une fonction d'adaptateur pour la liaison de RBM15 (*RNA-binding motif 15*) (Horiuchi *et al.*, 2013, Knuckles *et al.*, 2018). RBM15 ainsi que son homologue RBM15B guide le complexe de méthylation au niveau de certains motifs « RRACH » spécifiques sur les transcrits cibles (Patil *et al.*, 2016).

Le complexe de méthylation est donc formé de deux sous-ensembles, le MAC portant l'activité catalytique et le MACOM guidant la localisation de son activité sur le transcrit. Il en résulte une méthylation ciblée principalement autour du codon stop et du 3' UTR des ARNm. Il méthyle aussi différents types d'ARN tel que les lncARN et

## Introduction générale

les ARN circulaires (circARN) (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 2017).

- METTL16 :

Chez les Vertébrés, METTL16 est la seconde méthyltransférase avec la capacité de méthyler les ARN polyadénylés (Warda *et al.*, 2017). Contrairement à METTL3 dont l'activité requiert la formation du MAC, METTL16 est indépendante. Son activité cible principalement des introns ayant une structure en tige-boucle et plus particulièrement au niveau de la séquence consensus « UACA\*GAGAA », (Pendleton *et al.*, 2017, Warda *et al.*, 2017, Mendel *et al.*, 2018).

METTL16 a été particulièrement décrite dans le cadre de son rôle dans la régulation du niveau de SAM *via* la méthylation de l'ARNm de MAT2A, la S-adénosylméthionine synthétase. Lorsque la cellule présente une forte concentration en SAM, METTL16 méthyle le transcrit MAT2A. Cette méthylation engendre la rétention d'un intron dans l'ARNm et déclenche sa dégradation, bloquant ainsi la synthèse de SAM. À l'inverse, lors de faibles concentrations en SAM, l'ARNm n'est pas méthylé par METTL16, il peut alors être épissé et traduit pour donner la protéine MAT2A fonctionnelle déclenchant la synthèse de SAM (Pendleton *et al.*, 2017, Warda *et al.*, 2017, Shima *et al.*, 2017, Mendel *et al.*, 2018). Le rôle de METTL16 dans la régulation du niveau de SAM, le donneur universel de méthyle, lui confère une fonction primordiale lors du développement des Vertébrés (Mendel *et al.*, 2018).

METTL16 est aussi connu pour méthyler l'ARNsn U6 qui forme le cœur catalytique du *spliceosome*. Bien que la perte de cette méthylation soit létale pour les levures (Madhani *et al.*, 1990), son rôle dans le *spliceosome* des Vertébrés reste à déterminer (Pendleton *et al.*, 2017, Warda *et al.*, 2017, Mendel *et al.*, 2018).

- ZCCHC4 :

La méthyltransférase ZCCHC4 (*Zinc finger CCHC domain containing protein 4*) a été récemment décrite comme l'enzyme responsable de l'unique m<sup>6</sup>A sur l'ARNr 28S. Cette enzyme n'a qu'un seul transcrit cible connu, l'ARN 28S, qu'elle méthyle au niveau de la séquence consensus « AAC ». Cette méthylation, qui a lieu au niveau du nucléole, est cruciale pour la traduction puisqu'elle est impliquée dans la structure et

## Introduction générale

l'assemblage des sous-unités du ribosome (Van Tran *et al.*, 2019, Ma *et al.*, 2019, Pinto *et al.*, 2020).

- METTL5-TRMT112 :

Une deuxième méthyltransférase ciblant l'ARNr a été identifiée chez les Vertébrés. METTL5 est une enzyme permettant la mise en place de la seule m<sup>6</sup>A détectée de l'ARN 18S (Van Tran *et al.*, 2019, Chen *et al.*, 2020, Ignatova *et al.*, 2020, Rong *et al.*, 2020, Xing *et al.*, 2020). De même que METTL3, METTL5 fonctionne sous forme d'hétérodimère. TRMT112 (*tRNA methyltransferase subunit 11-2*) est une sous-unité décrite pour activer des méthyltransférases ARN mettant en place différentes modifications principalement sur les ARNt et ARNr. Cette sous-unité se complexe avec METTL5 pour stabiliser la méthyltransférase et favoriser la méthylation à l'ARNr 18S (Bourgeois *et al.*, 2017, Van Tran *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2020a).

METTL5 est cruciale pour le développement des Vertébrés, car le groupement méthyle qu'elle lie au niveau de l'ARN 18S a pour conséquence une régulation de la traduction de certains ARNm impliqués dans la différenciation neurale et la réponse au stress (Chen *et al.*, 2020, Ignatova *et al.*, 2020, Rong *et al.*, 2020, Xing *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020a).

### Erasers :

La m<sup>6</sup>A est une marque dont les niveaux sont dynamiques sous l'action d'enzymes, les *erasers*, qui convertissent la N<sup>6</sup>-méthyladénosine des ARN en adénosine. Deux *erasers* sont décrits dans le noyau chez les Vertébrés (Jia *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2013) faisant partie de la famille des Fe(II)/2-oxoglutarate dioxygénases et de la sous famille des AlkB, qui inclue des enzymes avec une activité de déméthylase de l'ARN et/ou de l'ADN (Xu *et al.*, 2020) (**Tableau 2**).

### **Tableau 2 : « Erasers » identifiés chez les Bilatériens**

Protéines comportant une activité catalytique déméthylase m<sup>6</sup>A chez les Bilatériens. ? : conservation inconnue, - : protéine potentiellement absente

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Bombyx mori</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Apis mellifera</i>
ERASER	FTO	FTO	FTO	-	-	-	-
	ALKBH5	ALKBH5	ALKBH5	-	-	-	-

## Introduction générale

- FTO :

La FTO (*Fat mass and obesity associated protein*) est la première déméthylase de la m<sup>6</sup>A décrite chez les Vertébrés (Jia *et al.*, 2011). Cependant, sa spécificité envers la m<sup>6</sup>A est aujourd'hui controversée, car la FTO peut agir sur la m<sup>3</sup>U (3-méthyluridine), la m<sup>6</sup>A et la m<sup>6</sup>Am (N<sup>6</sup>,2'-O-diméthyladénosine) (Jia *et al.*, 2008, 2011, Mauer *et al.*, 2017). En effet, Mauer et collaborateurs (2017) ont mis en évidence que, *in vitro*, la FTO est plus active sur la m<sup>6</sup>Am que sur la m<sup>6</sup>A lorsque cette méthylation se situe à proximité de la coiffe 7-méthylGTP en 5' de l'ARNm. Bien qu'elle montre une préférence de déméthylation pour la m<sup>6</sup>Am, cela n'exclut pas son activité envers la m<sup>6</sup>A (Mauer *et al.*, 2017, Garcia-Campos *et al.*, 2019, Koh *et al.*, 2019).

- ALKBH5 :

ALKBH5 (*AlkB homologue 5*) est la seconde déméthylase décrite chez les Vertébrés. Contrairement à la FTO, sa délétion ou surexpression induit une variation du niveau de m<sup>6</sup>A (Zheng *et al.*, 2013, Garcia-Campos *et al.*, 2019, Koh *et al.*, 2019). De plus, ALKBH5 possède une activité de déméthylation aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* au niveau de la séquence consensus « RRACH » (Zheng *et al.*, 2013, Koh *et al.*, 2019) et ne montre aucune activité catalytique envers la m<sup>6</sup>Am (Mauer *et al.*, 2017).

ALKBH5 est impliquée dans l'export des ARN nucléaires et leur stabilité en maintenant certains sites de méthylation déméthylés, une fonction cruciale pour la fertilité chez les souris mâles (Zheng *et al.*, 2013, Tang *et al.*, 2017). Son expression semble également régulée lors de maladies ou de stress en association avec la variation de l'épitranscriptome (Shah *et al.*, 2017, Ma *et al.*, 2018, Zaccara *et al.*, 2019).

### Readers :

La m<sup>6</sup>A-ARN est reconnue par des protéines qui sont les médiateurs de ses effets biologiques. Ces *readers*, responsables du devenir des ARN *via* leur liaison à la m<sup>6</sup>A, sont classés selon leur modalité de liaison à l'ARN méthylé. Certaines de ces protéines comprennent des domaines de liaison qui leur permettent d'interagir directement avec la m<sup>6</sup>A. Le second mode de liaison fait appel à une fonction de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine qui favorise la linéarisation de l'ARN. Ce phénomène de linéarisation par la m<sup>6</sup>A est appelé « m<sup>6</sup>A switch » et régule l'accès des protéines à leurs ARN cibles (Liu *et al.*, 2015) (**Tableau 3**).

## Introduction générale

- Famille des YTH :

La famille des YTH (*YT521-B homologue*) comprend les principales protéines à liaison directe à la N<sup>6</sup>-méthyladénosine. Chez les Vertébrés, cette famille comprend cinq protéines, deux YTHDC (*YTH domain containing*) et trois YTHDF (*YTH domain family*) dont le domaine YTH renferme la capacité de liaison aux m<sup>6</sup>A-ARN au niveau du motif « RRACH » (Xu *et al.*, 2014a, Patil *et al.*, 2016, Wojtas *et al.*, 2017). Bien que ces protéines contiennent toutes un domaine YTH, elles sont associées à des fonctions différentes.

De ces cinq YTH, seul YTHDC1 est localisé dans le noyau, au niveau d'une structure nucléaire particulière appelée « *YT bodies* » proche des « *nuclear speckles* » (Nayler *et al.*, 2000, Xiao *et al.*, 2016, Roundtree *et al.*, 2017).

**Tableau 3 : « Readers » identifiés chez les Bilatériens**

Protéines comportant une fonction de liaison à la m<sup>6</sup>A chez les Bilatériens. ? : conservation inconnue, - : protéine potentiellement absente

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Bombyx mori</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Apis mellifera</i>
Liaison directe	YTHDC1	YTHDC1	YTHDC1	YT521B	YTHDC	-	YTHDC1
	YTHDC2	YTHDC2	YTHDC2	Bgcn (sans domaine YTH)	?	-	?
	YTHDF1-3	YTHDF1-3	YTHDF1-3	CG6422	YTHDF	-	YTHDF
	eIF3	eIF3	eIF3	?	?	?	?
	METTL3	METTL3	METTL3	?	?	?	?
	Prrc2a	Prrc2a	Prrc2a	?	?	?	?
Liaison directe ou indirecte	HNRNPA2B1	HNRNPA2B1	HNRNPA2B1	?	?	?	?
	IGF2BP1-3	IGF2BP1-3	IGF2BP1-3	?	?	?	?
Liaison indirecte	HNRNPC et G	HNRNPC et G	HNRNPC et G	?	?	?	?



## Introduction générale

Cette localisation proche des structures d'épissage permet à YTHDC1 d'interagir avec le facteur d'épissage SRSF3 (*Serine/arginine-rich splicing factor 3*) qui induit l'inclusion d'exons dans les transcrits matures. De plus, ce complexe YTHDC1-SRSF3 lié aux m<sup>6</sup>A-ARN bloque la liaison du facteur d'épissage SRSF10, un facteur intervenant dans l'exclusion d'exons, avec lequel YTHDC1 a une affinité plus faible (Xiao *et al.*, 2016, Kasowitz *et al.*, 2018). La liaison de YTHDC1 à l'adaptateur SRSF3, en plus de son implication dans l'épissage, favorise l'export nucléaire des m<sup>6</sup>A-ARN (Roundtree *et al.*, 2017). Une fois l'ARN dans le cytoplasme, celui-ci peut être pris en charge par d'autres acteurs de la famille des YTH.

Le second membre de la famille des YTHDC, YTHDC2, est un *reader* cytoplasmique. La liaison de cette protéine induit une traduction rapide, mais de courte durée, des ARNm méthylés. En effet, YTHDC2 interagit avec des protéines impliquées dans la traduction (Hsu *et al.*, 2017, Kretschmer *et al.*, 2018, Mao *et al.*, 2019) mais recrute aussi XRN1 (*5'-3' Exoribonuclease 1*), la principale 5'-3' exoribonucléase cytoplasmique (Hsu *et al.*, 2017, Wojtas *et al.*, 2017, Kretschmer *et al.*, 2018). Ce *reader* favorise donc une expression protéique transitoire (*bursts*), indispensable à l'initiation de la méiose dans la lignée germinale de murins (Wojtas *et al.*, 2017, Zeng *et al.*, 2020).

En parallèle à YTHDC2, les protéines YTHDF1, YTHDF2 et YTHDF3 interviennent aussi dans la régulation cytoplasmique des ARN méthylés. Préalablement décrites avec des fonctions différentes pour chacun des paralogues dans la traduction ou la dégradation (Wang *et al.*, 2014a, 2015, Du *et al.*, 2016, Shi *et al.*, 2017), des indices suggèrent que ces trois protéines partagent la même fonction de dégradation des m<sup>6</sup>A-ARN (Du *et al.*, 2016, Patil *et al.*, 2017). De plus, une redondance de leur fonction a été mise en avant par la triple délétion des YTHDF qui est la seule à être létale chez les embryons de Vertébrés (Lasman *et al.*, 2020b, Kontur *et al.*, 2020). De récentes études confirment cette fonction commune et redondante. En effet, ayant toutes les trois la possibilité de lier la N<sup>6</sup>-methyladénosine et de recruter le complexe de déadénylation CCR4-NOT (*Carbon Catabolite Repression- Negative On TATA-less*), elles induisent la dégradation des m<sup>6</sup>A-ARN polyadénylés (Lasman *et al.*, 2020b, Li *et al.*, 2020c, Zaccara et Jaffrey, 2020, Kontur *et al.*, 2020). Leur localisation au niveau de structures cytoplasmiques impliquées dans la dégradation des ARNm, les « *P-bodies* », confirme leur implication dans la dégradation des séquences ribonucléotidiques (Wang *et al.*, 2014a, Ries *et al.*, 2019). En effet, ces YTH participent



## Introduction générale

à la formation de structures cytoplasmiques comme les « *P-bodies* », les granules neuronaux mais aussi les granules de stress, qui permettent de stocker, dégrader ou transporter les m<sup>6</sup>A-ARN (Ries et al. 2019; Fu and Zhuang 2020).

Cependant, la fonction des YTHDF reste encore mal comprise. Zhou et collaborateurs ont mis en évidence une relocalisation nucléaire de YTHDF2 lors d'un choc thermique. Cette relocalisation favorise la liaison de YTHDF2 à la m<sup>6</sup>A en 5' UTR pour protéger les m<sup>6</sup>A-ARNm de la déméthylation et favoriser leur traduction (Zhou et al., 2015). Un résultat qui n'est pas observé dans les cellules souches embryonnaires de souris sous différentes conditions de stress (Ries et al., 2019). De plus, Shi et collaborateurs rapportent que les m<sup>6</sup>A-ARN cibles diffèrent entre les paralogues, au contraire de Patil et collaborateurs qui mettent en évidence des ARN méthylés cibles communs (Patil et al., 2016, Shi et al., 2017).

- METTL3 :

En plus de son rôle de méthyltransférase nucléaire, METTL3 a un rôle de *reader* lorsque celui-ci devient cytoplasmique dans le cas de cellules cancéreuses. En effet, sa relocalisation dans le cytoplasme lui permet d'interagir avec eIF3 (*eukaryotic initiation factor 3*) pour initier la traduction des m<sup>6</sup>A-ARN indépendamment de son activité de méthyltransférase et de sa liaison avec les autres acteurs du complexe de méthylation (Lin et al., 2016, Coots et al., 2017, Choe et al., 2018). Ce changement de localisation de METTL3 dans les cellules cancéreuses induit la traduction de m<sup>6</sup>A-ARN impliqués dans la progression de tumeurs et l'apoptose (Choe et al., 2018).

- eIF3 :

La traduction des ARNm passe majoritairement par un mécanisme dépendant de la coiffe m<sup>7</sup>G. Cette coiffe située en 5' de l'ARN est reconnue par eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) induisant la formation du complexe protéique eIF4 qui recrute le complexe de préinitiation 43S (Jackson et al., 2010). En parallèle, une voie de traduction dite coiffe-indépendante permet la traduction d'ARNm sans l'intermédiaire eIF4E. Cette voie est privilégiée notamment lors d'un stress et permet de contourner la traduction coiffe-dépendante (Sonenberg et Hinnebusch, 2007).

Le complexe multiprotéique eIF3 est un complexe impliqué dans la traduction des ARNm par la voie coiffe-dépendante et indépendante (Sonenberg et Hinnebusch,

## Introduction générale

2007, Jackson *et al.*, 2010). Il est recruté par des protéines de liaison à la  $N^6$ -méthyladénosine telles que METTL3 ou YTHDF1 (Wang *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2016, Choe *et al.*, 2018). En plus de favoriser la traduction *via* d'autres *readers*, Meyer et collaborateurs ont montré que ce complexe peut aussi interagir directement avec la  $m^6A$  localisée en 5' UTR. Cette interaction conduit à une traduction coiffe-indépendante des  $m^6A$ -ARNm et permet une réponse cellulaire rapide face à un stress (Meyer *et al.*, 2015).

- Prrc2a :

Prrc2a (*Proline rich coiled-coil 2 A*) est un nouvel acteur ayant la capacité de lier directement la  $N^6$ -méthyladénosine, important dans le contrôle du développement neuronal. En effet, Prrc2a régule la stabilité de  $m^6A$ -ARN cibles responsables de la spécification des oligodendrocytes et la myélinisation des axones (Wu *et al.*, 2018b). Wu et collaborateur (2018b) proposent un modèle où Prrc2a stabilise les  $m^6A$ -ARN dans le cytoplasme en rentrant en compétition avec YTHDF2.

- IGF2BP :

IGF2BP1 à 3 (*Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein*) sont des *readers* nucléaires et cytoplasmiques avec une capacité de liaison directe à la  $N^6$ -méthyladénosine. Ces protéines ont un rôle dans la stabilisation, le stockage et la traduction des  $m^6A$ -ARN. En effet, Huang et collaborateurs (2018) proposent un modèle dans lequel la famille des IGF2BP stabilise des  $m^6A$ -ARN dans le noyau et le cytoplasme par le recrutement de protéines de stabilisation. Dans le cytoplasme, ces ARN stabilisés sont protégés de la dégradation par les IGF2BP, ce qui favorise leur traduction. De plus, lors d'un choc thermique les IGF2BP permettent le stockage d'ARN cibles dans des granules de stress, qui sont déstockés et traduits lors d'un retour aux conditions physiologiques (Huang *et al.*, 2018).

Cependant la liaison directe de cet acteur à la  $m^6A$  est remise en question car le site de liaison des IGF2BP ne correspond ni au motif ni à la localisation de la méthylation. Ainsi, il reste à déterminer si les IGF2BP sont des *readers* à liaison directe ou indirecte, un mode de liaison qui peut dépendre du paralogue considéré (Hafner *et al.*, 2010, Sun *et al.*, 2019).

## Introduction générale

- HNRNPA2B1 :

HNRNPA2B1 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1*) est une protéine de liaison à la m<sup>6</sup>A, dont le mode de liaison direct ou non à la méthylation reste à éclaircir du fait de la présence de nombreux domaines de liaison à l'ARN (Alarcón *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2018a). HNRPA2B1 est un *reader* nucléaire important pour la maturation des miARN. En effet, il facilite la liaison des m<sup>6</sup>A-miARN au complexe microprocesseur DROSHA (*Double-stranded RNA-specific endoribonuclease*) et DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Alarcón *et al.*, 2015). Cette action active l'épissage des miARN et leur interaction avec les protéines Argonautes qui va réguler l'expression de gènes (Michlewski et Cáceres, 2019).

- *Readers* à liaison indirecte :

La liaison indirecte de *readers* est due à la capacité de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine de linéariser la séquence d'ARN grâce au « m<sup>6</sup>A switch » favorisant notamment la formation de structures secondaires en tige-boucle dans l'ARN. Cette linéarisation autour de la méthylation ouvre un accès à des protéines de liaison à l'ARN préférentiellement au niveau des introns des ARNm et des ARN non-codants (Liu *et al.*, 2015). HNRNPC et HNRNPG sont des protéines nucléaires dont la liaison à leurs cibles est dépendante de cette linéarisation induite par le « m<sup>6</sup>A switch », qui régule l'épissage des m<sup>6</sup>A-ARN (Liu *et al.*, 2015, 2017, Zhou *et al.*, 2019b).

Le nombre croissant d'études concernant la N<sup>6</sup>-méthyladénosine permet la découverte d'un nombre grandissant d'acteurs de cette méthylation et notamment de *readers*. Cependant, le mode de liaison de ces médiateurs potentiels des effets biologiques de la m<sup>6</sup>A reste à étudier. Et ce, afin de déterminer s'ils se lient directement à la m<sup>6</sup>A ou bien s'ils sont recrutés par l'intermédiaire de *readers* directs (Edupuganti *et al.*, 2017, Youn *et al.*, 2018, Hsu *et al.*, 2019).

### 2.1.2. La machinerie des Ecdysozoaires

L'étude de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine chez les Vertébrés a mis en évidence une machinerie complexe incluant des *writers*, des *erasers* et des *readers* régulant le devenir des m<sup>6</sup>A-ARN. L'étude de cette machinerie chez les Ecdysozoaires, relativement nouvelle par rapport aux Vertébrés, se limite à quatre espèces, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Bombyx mori* et *Apis mellifera*.

## Introduction générale

L'étude de ces quatre espèces a mis en évidence la conservation de la m<sup>6</sup>A et sa machinerie qui cependant présente des différences avec les Vertébrés mais aussi entre les Ecdysozoaires.

### Writers :

Chez *D.melanogaster*, le complexe de méthylation, METTL4 et METTL5 sont présents. Cependant, chez les *B. mori* et *A. mellifera* seul le complexe de méthylation est décrit et le génome du nématode *C. elegans* semble dépourvu de méthyltransférase active sur les ARNm (**Tableau 1**).

- Le complexe de méthylation :

Le complexe de méthylation est la première méthyltransférase décrite chez les Ecdysozoaires. Chez la drosophile, la totalité des acteurs du complexe de méthylation décrit chez les Vertébrés présente un orthologue (Lence *et al.*, 2019). Le cœur catalytique ou MAC, est formé de Ime4 qui porte l'activité méthyltransférase et METTL14 qui stabilise la conformation de Ime4 pour permettre la méthylation de l'ARN (Kan *et al.*, 2017, Lence *et al.*, 2017). Tout comme chez les Vertébrés, *D. melanogaster* présente un sous-complexe nommé MACOM dont l'ensemble des membres présente un orthologue chez *H. sapiens* (Lence *et al.*, 2019). Ce sous-complexe stabilise le cœur catalytique et le guide pour une méthylation spécifique sur les ARNm au niveau du motif conservé « RRACH ». Cependant, contrairement aux Vertébrés, le MAC méthyle préférentiellement le 5' UTR des ARNm cibles et non la région 3' proche du codon stop (Dominissini *et al.*, 2012, Kan *et al.*, 2020, Soldano *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020b).

Le MAC conservé chez le ver à soie *B. mori* présente une méthylation au niveau de la séquence consensus « RRACH » des ARNm (Li *et al.*, 2019, Jiang *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2020c). Cependant, à la différence des Vertébrés et de la drosophile, les motifs méthylés se trouvent principalement dans la séquence codante des transcrits (Li *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2020c). L'investigation de la conservation du MACOM chez *B. mori* pourrait permettre de mieux appréhender les bases moléculaires de cette différence de localisation de la m<sup>6</sup>A. De plus, la déplétion du cœur catalytique n'abolit pas totalement la méthylation des ARN chez *B. mori* (Li *et al.*, 2019) laissant envisager la présence d'autres *writers*.

## Introduction générale

Chez *A. mellifera* trois orthologues du complexe de méthylation, METTL3, METTL14 et WTAP, sont responsables de la m<sup>6</sup>A au niveau de la séquence conservée « RRACH ». Ce complexe est aussi associé à une répartition dynamique de la méthylation au cours du développement, dont la localisation dépend du stade de développement. En effet, elle est décrite comme majoritaire en 5' UTR et autour du codon start lors de stades précoces de la différenciation des castes, puis prédominante autour du codon stop lors de stades plus tardifs (Wang *et al.*, 2021).

Le complexe de méthylation nucléaire est en effet primordial pour le développement des insectes examinés (Hongay et Orr-Weaver, 2011, Kan *et al.*, 2017, Guo *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019, Jiang *et al.*, 2019), alors qu'il est absent chez *C. elegans* (Lence *et al.*, 2019, Sendinc *et al.*, 2020). Cela est cohérent avec la faible méthylation, voire son absence, au niveau des ARN polyadénylés chez le nématode (Lieberman *et al.*, 2020, Sendinc *et al.*, 2020).

- METTL4 :

La seconde méthyltransférase présentée chez *D. melanogaster* est la METTL4 qui méthyle l'ARNsn U2 et est impliquée dans l'épissage des ARN. Bien que l'ARNsn U2 entre dans la composition du *spliceosome*, le rôle de METTL4 dans l'épissage *via* la méthylation de ce transcrit reste à confirmer (Gu *et al.*, 2020).

La METTL4 de *D. melanogaster* est la seule dont l'activité de N<sup>6</sup>-méthyltransférase au niveau de l'adénosine a été démontrée. En effet, son orthologue chez les Vertébrés conduit à la mise en place de la m<sup>6</sup>Am, une modification de l'ARN non-détectée à ce jour chez la drosophile (Kan *et al.*, 2017, Goh *et al.*, 2020). Cette situation pose de nombreuses questions quant à l'évolution de l'implication biologique de ce *writer*.

- METTL5 :

Chez la drosophile, la CG9666 est un orthologue de la METTL5 des Vertébrés, dont l'activité de méthylation est conservée. Cette méthyltransférase, en interaction avec TRMT112, est responsable de la méthylation de son seul ARN cible, l'ARN 18S. Bien que, la fonction moléculaire exacte de cette méthylation et donc de METTL5 reste à préciser, son rôle dans la neurogenèse semble conservé chez cet Ecdysozoaire. En effet, Leismann et collaborateurs (2020) ont montré que l'invalidation de METTL5

## Introduction générale

provoque des altérations comportementales du vol, cohérentes avec les perturbations cognitives observées chez les mutant METTL5 chez l'humain.

Une activité similaire est aussi conservée chez *C. elegans*, via l'orthologue METL-5 qui méthyle l'ARN 18S (Lieberman *et al.*, 2020, Rong *et al.*, 2020, Sendinc *et al.*, 2020). Contrairement aux Vertébrés et à la drosophile, cet acteur n'agit pas en complexe avec l'orthologue TRMT112 (Lieberman *et al.*, 2020). Cependant, cette méthyltransférase favorise la traduction d'ARN impliqués dans la réponse au stress, une fonction de régulation de la traduction conservée chez les Vertébrés mais qui n'a pas été montrée chez *D. melanogaster* à ce jour, d'après nos connaissances (Lieberman *et al.*, 2020, Rong *et al.*, 2020).

- METTL16 :

La drosophile et le nématode *C. elegans* présentent un orthologue de METTL16 (Dorsett *et al.*, 2009, Leismann *et al.*, 2020), cependant leur activité  $N^6$ -méthyltransférase reste à démontrer. MET-10, l'orthologue de METTL16 chez le nématode, apparaît comme un acteur indispensable au développement, une fonction démontrée chez les Vertébrés via la méthylation du transcrite codant pour MAT2A (Dorsett *et al.*, 2009, Mendel *et al.*, 2018). Néanmoins, la déplétion de l'orthologue chez la drosophile n'engendre pas de diminution significative de la  $m^6A$  (Leismann *et al.*, 2020).

Chez les vertébrés, METTL16 méthyle un nombre restreint de transcrits comme MAT2A et l'ARNsn U6. Une étude ciblée sur certains ARN potentiellement méthylés par l'orthologue de METTL16 permettrait d'élucider la conservation de son activité de  $N^6$ -méthyltransférase chez les Ecdysozoaires.

- ZCCHC4 :

L'activité enzymatique de ZCCHC4 est conservée chez *C. elegans*, où elle permet la méthylation de l'ARNr 28S. À quoi s'ajoute une conservation de la fonction de ce  $m^6A$ -ARNr dans la biogenèse des ribosomes (Sendinc *et al.*, 2020).

## Introduction générale

### Erasers :

Aucun orthologue des *erasers* de Vertébrés (FTO et ALKBH5) n'a été retrouvé chez les Ecdysozoaires examinés. Une analyse phylogénétique de la FTO au sein des Eucaryotes montre que celle-ci n'est présente que chez les Vertébrés, à l'exception d'algues marines où des homologues ont été identifiés (Robbens *et al.*, 2008, Balacco et Soller, 2018). De manière plus générale, aucun membre de la famille des ALKBH, dont font partie FTO et ALKBH5, ne semble présenter une activité de N<sup>6</sup>-déméthylase chez *D. melanogaster* (Lence *et al.*, 2017) (**Tableau 2**).

L'aspect dynamique des niveaux de m<sup>6</sup>A chez les Ecdysozoaires (Kan *et al.*, 2017, Knuckles *et al.*, 2018) suggère la présence de voies enzymatiques de déméthylation. Cependant, aucun orthologue d'*eraser* connu n'a pu être identifié dans ce clade à ce jour. Ceci pourrait indiquer la présence d'une classe de N<sup>6</sup>-déméthylase jusqu'alors inconnue chez les Ecdysozoaires qui demande de nouvelles investigations.

### Readers :

Chez *C. elegans*, aucune protéine de liaison n'a été mise en évidence à ce jour. La famille des YTH, principale famille de *readers* de Vertébrés, semble absente (Sendinc *et al.*, 2020), en cohérence avec le très faible niveau de méthylation des ARNm qui sont les cibles principales des YTH.

En revanche, les *readers* à domaine YTH et leurs fonctions semblent conservés chez *D. melanogaster* (Hausmann *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, 2020, Lence *et al.*, 2017, Jiang *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2021). La famille des YTH comprend un orthologue des YTHDF (CG6422) et un orthologue des YTHDC (YT521-B). La protéine YT521-B est un acteur nucléaire dont la fonction dans l'épissage des m<sup>6</sup>A-ARN est conservée par rapport à YTHDC1 chez les Vertébrés. YT521-B induit l'épissage m<sup>6</sup>A-dépendant du transcrit de *Sxl* (*Sex lethal*) qui conduit à l'obtention du phénotype femelle et dont la déplétion du *reader* est létale pour la femelle (Hausmann *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, 2020, Lence *et al.*, 2017). La famille des YTH est complétée par une YTHDF cytoplasmique qui, contrairement aux YTHDF des Vertébrés, ne présente qu'un seul orthologue (Kan *et al.*, 2020, Soldano *et al.*, 2020). Chez les Vertébrés, la fonction des YTH est ambiguë entre une fonction prédominante dans la dégradation des m<sup>6</sup>A-ARNm ou la stimulation de la traduction. Chez *D. melanogaster*,



## Introduction générale

seul un rôle dans la traduction a été mis en évidence, cohérent avec le rôle de YTHDF2 dans la traduction des m<sup>6</sup>A-ARNm lors de stress (Zhou *et al.*, 2015). Cependant, cette fonction est modulée par le recrutement de FMR1 (*Fragile X mental retardation 1*) sur certains m<sup>6</sup>A-ARN cibles pour lesquels le complexe YTHDF-FMR1 bloque la traduction (Kan *et al.*, 2020, Soldano *et al.*, 2020) (**Tableau 3**).

Les études récentes indiquent une conservation partielle de la voie m<sup>6</sup>A entre les Vertébrés et les Ecdysozoaires, où elle est représentée par moins d'acteurs. La machinerie de la m<sup>6</sup>A des Ecdysozoaires présente également des différences fonctionnelles se traduisant par des profils de méthylation partiellement conservés. Ainsi, chez les Ecdysozoaires, on observe une prédominance de la m<sup>6</sup>A en 5', en comparaison d'une méthylation dominante en 3' sur les transcrits des Vertébrés. Par ailleurs, aucun *eraser* n'a été identifié à ce jour chez les espèces « invertébrées », ce qui suggère une différence de dynamique de la m<sup>6</sup>A et donc de son influence sur le devenir des transcrits. Plus largement, cette situation interroge sur la conservation des effets biologiques de la m<sup>6</sup>A et de son importance fonctionnelle au sein de fonctions physiologiques au cours de l'évolution.

## 2.2. Régulation des fonctions physiologiques

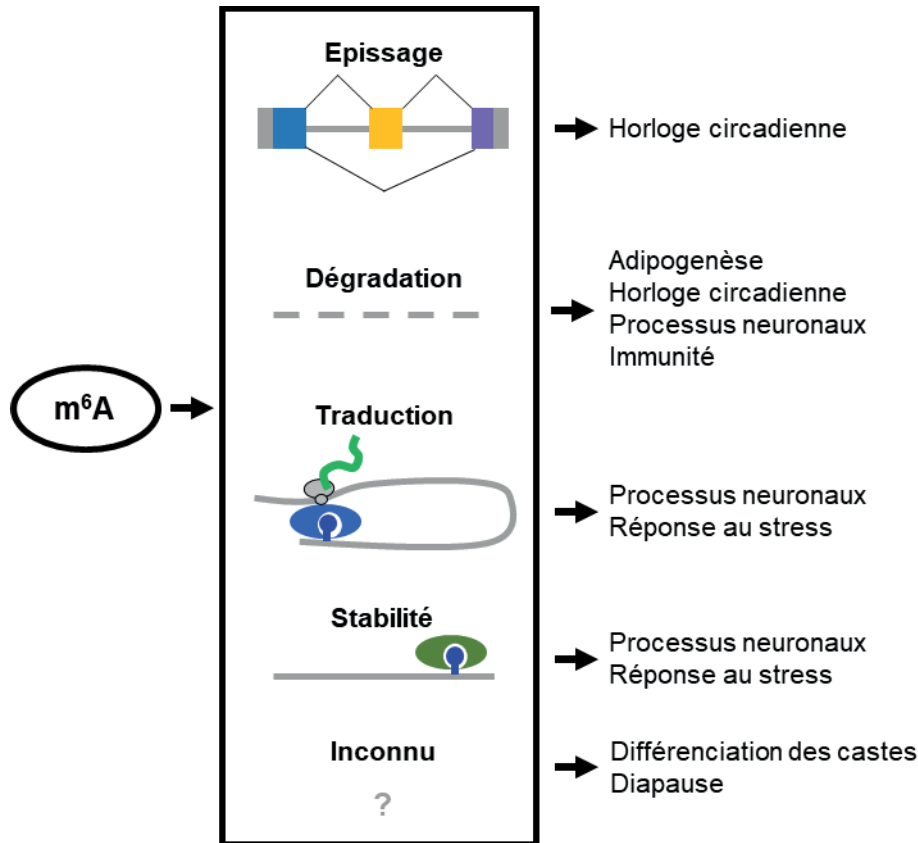
La m<sup>6</sup>A détermine le devenir d'un large éventail de transcrits, notamment *via* les *readers* qui médient ses conséquences sur leur épissage, leur traduction et leur dégradation. En conséquence, la m<sup>6</sup>A est impliquée dans de nombreuses voies métaboliques qui gouvernent des fonctions physiologiques dans un large éventail phylogénétique telles que la nutrition, l'activité neurale, l'immunité et la réponse au stress (**Figure 13**).

### La nutrition :

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine intervient dans la régulation des réserves énergétiques et peut être modulée par l'apport de nutriments. En effet, une alimentation enrichie en curcumine engendre une régulation de l'expression du complexe de méthylation et de la déméthylase ALKBH5, conduisant à une augmentation de la méthylation des ARN dans le foie. Cette régulation de la méthylation est potentiellement associée à certains miARN (Wu *et al.*, 2019a).



## Introduction générale



**Figure 13 : Schéma de l'implication de la m<sup>6</sup>A dans des fonctions physiologiques**  
Représentation schématique des mécanismes de régulation des transcrits contrôlés par la m<sup>6</sup>A. En contrôlant ces mécanismes, la m<sup>6</sup>A régule des fonctions physiologiques tel que l'horloge circadienne, l'adipogenèse, les processus neuronaux, l'immunité, la réponse aux stress, la différenciation des castes chez l'abeille et la diapause chez le ver à soie.

En effet, la méthylation de certains ARNm est dépendante des miARN qui facilitent la liaison du complexe de méthylation à des ARN cibles (Chen *et al.*, 2015). Chez l'abeille, *A. mellifera*, l'alimentation contrôle le devenir de la larve en ouvrière ou reine, un mécanisme étudié pour son implication de la 5mC-ADN (Elango *et al.*, 2009, Lyko *et al.*, 2010, Drewell *et al.*, 2014). Récemment, il a été mis en évidence que la m<sup>6</sup>A est modulée par l'alimentation de la larve et donc participe à la différenciation des castes de cette espèce en favorisant potentiellement la traduction de certains acteurs clés de cette différenciation (Wang *et al.*, 2021).

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme des lipides (Wu *et al.*, 2019a). En effet, Yao et collaborateurs mettent en évidence que le complexe de méthylation est impliqué dans l'adipogénèse. La méthylation du transcrit JAK1 (*Janus kinase 1*) recrute YTHDF2 qui conduit à la dégradation du transcrit

## Introduction générale

méthylé et inhibe l'activation de la voie JAK/STAT (*Janus kinase / signal transducer and activator of transcription*). L'inactivation de cette voie de signalisation inhibe la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse porcine en adipocytes (Yao *et al.*, 2019).

En plus d'une régulation de l'adipogenèse porcine, la m<sup>6</sup>A est aussi impliquée dans la régulation de PPAR $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activator  $\alpha$* ), un acteur de la dynamique circadienne du métabolisme des lipides (Oishi *et al.*, 2005). En effet, la délétion de Bmal1 (*Brain and Muscle ARNT-Like 1*) engendre une augmentation de l'expression de METTL3, d'YTHDF2 et du niveau de méthylation du transcrit PPAR $\alpha$ . L'ARNm de PPAR $\alpha$  sur-méthylé est alors envoyé en dégradation par YTHDF2, ce qui diminue l'expression du récepteur et engendre l'accumulation des lipides (Zhong *et al.*, 2018). De manière intéressante, Bmal1 est également un régulateur important de l'horloge circadienne. Cette voie de régulation du rythme journalier de l'adipogénèse reflète donc le rôle de la m<sup>6</sup>A dans la régulation de l'horloge circadienne.

### L'horloge circadienne :

L'horloge circadienne endogène permet d'anticiper les cycles journaliers de lumière et d'obscurité chez de très nombreux organismes. Elle participe à la régulation de la physiologie et du comportement des organismes *via* une boucle de régulation de la transcription et de la traduction conduisant à l'oscillation de l'expression des gènes de l'horloge (Cox et Takahashi, 2019). Cette oscillation implique la N<sup>6</sup>-méthyladénosine où l'inhibition de la méthylation des ARNm favorise la traduction de ces transcrits (Fustin *et al.*, 2013, 2018) et engendre un allongement des périodes d'oscillation des gènes de l'horloge. Par ailleurs, ce rythme est sous l'influence du contenu cellulaire en SAM, le donneur universel de méthyl, chez de nombreux Métazoaires (Fustin *et al.*, 2020). De plus, l'expression de la SAM synthétase MAT2A dépend de la méthylation de son ARNm (Pendleton *et al.*, 2017, Warda *et al.*, 2017, Shima *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2018b, Mendel *et al.*, 2018). Cette boucle de rétrocontrôle suggère une implication générale de la m<sup>6</sup>A dans le contrôle du rythme circadien. En revanche, bien que MAT2A soit une cible de METTL16, les variations circadiennes de cette méthyltransférase n'ont à ce jour pas été étudiées, à notre connaissance.

## Introduction générale

### Les processus neuronaux :

La conservation de la participation de la m<sup>6</sup>A à divers processus neuronaux comme la mémoire et l'apprentissage a été démontrée *via* les *readers* YTHDF1 chez la souris (Livneh *et al.*, 2019) et YTHDF chez la drosophile (Kan *et al.*, 2020). Chez les Vertébrés, ce rôle est associé à la régénération et à la différenciation des cellules neuronales ainsi qu'à la transmission synaptique (Livneh *et al.*, 2019). Chez *D. melanogaster*, les déplétions des méthyltransférases Ime4 ou METTL5 engendrent une perturbation des capacités de marche et de vol due à une diminution de la méthylation des ARN cibles (Hausmann *et al.*, 2016, Lence *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, Leismann *et al.*, 2020). Le contrôle de ces activités locomotrices est potentiellement lié à la régulation de l'expression de gènes de la croissance axonale *via* la m<sup>6</sup>A (Lence *et al.*, 2016), une fonction conservée chez les Vertébrés (Livneh *et al.*, 2019).

### La réponse immunitaire :

Chez les Vertébrés, la N<sup>6</sup>-méthyladénosine est impliquée dans la réponse immunitaire. En effet, la réaction immunitaire déclenche la prolifération et la différenciation des lymphocytes T *via* l'activation de la voie IL-7 (*Interleukine 7*). L'activation de cette voie est sous le contrôle de la dégradation m<sup>6</sup>A-dépendante du transcrite de la protéine SOCS (*Suppressor of cytokine signaling*), qui inhibe cette voie cytokine (Zhang *et al.*, 2019a). La m<sup>6</sup>A *via* le contrôle de SOCS régule donc l'homéostasie des cellules T. Elle est aussi impliquée dans la production d'interférons lors d'une infection virale (Zhang *et al.*, 2019a). Chez *B. mori*, la m<sup>6</sup>A sur les transcrits viraux aboutit à leur dégradation médiée par YTHDF et permet une protection contre les infections (Zhang *et al.*, 2020c). Cependant, certains virus comme l'herpès virus KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*) ou le SV40 (*Simian virus 40*) détournent ce mécanisme de défense et utilisent à leur avantage la machinerie de la m<sup>6</sup>A des Vertébrés pour permettre leur réplication (Zhang *et al.*, 2019a).

Comme illustré précédemment, la m<sup>6</sup>A intervient généralement dans la reconnaissance du « soi » et du « non-soi ». En effet, les circARN viraux engendrent une forte réponse immunitaire et confèrent une protection contre les infections virales (Chen *et al.*, 2017b). Or, de nombreux circARN endogènes persistent dans les cellules

## Introduction générale

et sont reconnus comme des ARN appartenant à l'hôte grâce à la m<sup>6</sup>A (Zhang *et al.*, 2020a). Ces circARN ont de nombreuses caractéristiques telles qu'éponge à miARN, capacité de liaison aux protéines et rôle de régulateur *cis* de la transcription. Ils apparaissent alors comme un élément important dans la réponse immunitaire où leur reconnaissance est cruciale (Yang *et al.*, 2018a). Leur méthylation est impliquée dans la biogénèse, la traduction et la stabilité des circARN dans le cadre de la réponse immunitaire mais aussi lors de conditions physiologiques normales (Di Timoteo *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2020a).

### La réponse au stress :

La m<sup>6</sup>A est fortement impliquée dans la réponse à des stress abiotiques notamment en régulant l'expression des HSP (*Heat shock proteins*). Les HSP sont des protéines chaperonnes très conservées au cours de l'évolution qui préviennent l'accumulation de protéines dénaturées et facilitent la réparation des dommages dus au stress. Les HSP permettent alors à l'organisme de résister au stress auquel il est exposé (Zhao et Jones, 2012), et leur niveau d'expression est contrôlé par la méthylation de leurs transcrits chez de nombreux Vertébrés (Zhou *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2018, Lu *et al.*, 2019).

Lors d'un choc thermique, on observe une augmentation importante du niveau de m<sup>6</sup>A en 5' UTR des transcrits HSP, peu abondante en condition physiologique (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012). À cela s'ajoute la relocalisation de YTHDF2 dans le noyau, qui protège les 5' UTR de la déméthylation. Enfin, une fois le m<sup>6</sup>A-ARNm HSP dans le cytoplasme, celui-ci peut être pris en charge par eIF3 pour une traduction coiffe-indépendante (Zhou *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2018). Par ailleurs, lors d'un retour aux conditions physiologiques les m<sup>6</sup>A-ARN stockés au niveau des granules de stress par les *readers* IGF2BP sont relocalisés au niveau de la machinerie de traduction (Huang *et al.*, 2018). Cette régulation de la traduction des transcrits pendant et après le stress thermique permet une acclimatation rapide aux changements environnementaux.

Cette adaptation aux conditions est aussi observée chez les Ecdysozoaires où la m<sup>6</sup>A est impliquée dans la diapause du ver à soie qui est déclenchée lors de changements environnementaux (Jiang *et al.*, 2019). Chez *C. elegans*, la m<sup>6</sup>A favorise la traduction de CYP-29A3 (*Cytochrome P450 family*) lors d'un stress thermique ou

## Introduction générale

d'une exposition aux ultraviolets. En effet, la méthylation de l'ARNr 18S par METL-5 améliore la liaison ribosomique et donc la traduction de transcrits spécifiques tels que CYP-29A3, qui code la machinerie de signalisation des eicosanoïdes, des molécules clés de la signalisation du stress. Bien que les animaux déficients en METL-5 se développent normalement dans des conditions homéostatiques, ils sont résistants à divers stress. Mais la supplémentation en eicosanoïdes rétablit la sensibilité au stress des vers mutants METL-5, indiquant que la m<sup>6</sup>A peut faciliter la traduction sélective et ainsi améliorer la réponse au stress (Lieberman *et al.*, 2020).

### La tumorigenèse :

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine est impactée par de nombreux facteurs abiotiques chez les Vertébrés menant à la formation de cancers. En effet, l'exposition de l'organisme à la fumée de cigarette engendre une perturbation de la méthylation de l'ADN 5mC au niveau des promoteurs des gènes de la machinerie de la m<sup>6</sup>A. Cette dérégulation de la méthylation de l'ADN induit des changements dans l'expression des acteurs de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine conduisant à des perturbation de la m<sup>6</sup>A de miARN et lncARN menant à la formation de cancers (Li *et al.*, 2020b).

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine est donc cruciale à de nombreuses fonctions physiologiques des organismes et particulièrement à l'adaptation aux changements environnementaux. La m<sup>6</sup>A-ARN permet de moduler le transcriptome des cellules et ainsi adapte leur métabolisme en réponse aux modifications des paramètres rencontrés. Néanmoins, l'implication de la m<sup>6</sup>A dans la modulation des transcriptomes dans un large panel de contextes biologiques illustre un rôle dans la différenciation cellulaire au sens large. En effet, la létalité embryonnaire précoce induite par l'inactivation des acteurs de la machinerie épitranscriptomique atteste que la méthylation de l'ARN est un régulateur capital du développement (Hongay et Orr-Weaver, 2011, Geula *et al.*, 2015, Kan *et al.*, 2017, Guo *et al.*, 2018, Kasowitz *et al.*, 2018, Mendel *et al.*, 2018, Kontur *et al.*, 2020).

### 2.3. Régulation du développement

#### 2.3.1. La gamétogenèse

La gamétogenèse est un processus de différenciation cellulaire qui permet la mise en place de la lignée germinale et l'obtention de gamètes matures chez des individus adultes capables de se reproduire. Lors de la gamétogenèse, des cellules subissent tout d'abord la méiose puis la différenciation cellulaire menant à l'obtention des ovocytes et spermatozoïdes. La  $N^6$ -méthyladénosine est impliquée dans le bon déroulement de la gamétogenèse et plus particulièrement contrôle la transition entre la méiose et la mitose (Qi *et al.*, 2016, Lasman *et al.*, 2020a, Zeng *et al.*, 2020). Bien que le rôle de la voie épitranscriptomique soit conservé chez de nombreux Vertébrés, cette régulation s'exerce selon différentes modalités en fonction des acteurs mis en jeu.

La première implication de la  $m^6A$  dans la gamétogenèse a été mise en évidence par l'étude d'ALKBH5. Sa déplétion perturbe la méiose des spermatocytes induisant un processus apoptotique dans les testicules et une infertilité chez le mâle (Zheng *et al.*, 2013). Celle-ci passe notamment par une altération de la stabilité de transcrits dans les spermatocytes et les spermatides rondes, *via* le contrôle de leur épissage en 3' UTR (Tang *et al.*, 2017).

Le *reader* YTHDC2 intervient dans la méiose des spermatocytes et des ovocytes, *via* la régulation de l'expression des gènes permettant la transition entre les phases mitotiques et méiotiques de la formation des gamètes (Lasman *et al.*, 2020a, Zeng *et al.*, 2020). Cependant, l'action de YTHDC2 dans la lignée germinale peut dépendre de son domaine YTH, indispensable pour la liaison à la  $m^6A$ , ou de son activité hélicase, ce qui reste à déterminer. Néanmoins, l'implication du domaine YTH est favorisée par les observations de Kontur et collaborateurs qui mettent en évidence la redondance fonctionnelle des YTHDF dans l'ovogenèse chez le poisson zèbre. En effet, alors que l'inactivation de YTHDF2 ou YTHDF3 reste sans effet mesurable, la double déplétion affecte spécifiquement la lignée germinale femelle et inhibe l'ovogenèse (Lasman *et al.*, 2020a, Kontur *et al.*, 2020).

Enfin, le *reader* YT521-B, l'orthologue de YTHDC1 chez la drosophile, est impliqué dans l'épissage de Sxl (Hausmann *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, 2020, Lence *et al.*, 2017), un régulateur majeur du déterminisme du sexe. Chez le mâle, l'épissage de Sxl retient un intron, absent chez la femelle, qui engendre une protéine tronquée et inactive

## Introduction générale

et accélère la dégradation de l'ARNm. En revanche chez la femelle, l'élimination de l'intron mâle-spécifique permet l'obtention d'une protéine qui active une voie d'épissage en cascade aboutissant au phénotype femelle (Schütt et Nöthiger, 2000, Salz, 2011).

### 2.3.2. La transition maternelle à zygotique

La transition maternelle à zygotique (MZT), un des processus majeurs du développement embryonnaire, comprend la dégradation des ARNm et des protéines maternels et l'activation du génome zygotique (Le Moigne et Foucrier, 2001, Vastenhouw *et al.*, 2019).

Chez les Vertébrés, la MZT est contrôlée par la méthylation de l'adénosine des ARN maternels qui conduit à leur dégradation (Zhao *et al.*, 2017, Ivanova *et al.*, 2017, Sui *et al.*, 2020, Kontur *et al.*, 2020). Elle est médiée par YTHDF2 dont la déplétion dans l'embryon retarde l'élimination des transcrits maternels et entraîne un ralentissement du développement ainsi qu'une létalité dans la descendance chez *Danio rerio* (Zhao *et al.*, 2017). Cependant, le rôle exclusif d'YTHDF2 dans le contrôle de la MZT est contredit par la redondance des membres de la famille YTHDF dans le remaniement du transcriptome embryonnaire chez le poisson zèbre (Kontur *et al.*, 2020).

### 2.3.3. L'inactivation du chromosome X

L'inactivation du chromosome X est un mécanisme de compensation du dosage chromosomique chez les Mammifères. Un des deux chromosomes X est mis sous silence chez la femelle (XX) et compense un déséquilibre dans l'expression des gènes du chromosome X entre les sexes (mâle : XY).

Chez les Mammifères, l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femelle résulte de son recouvrement par le lncARN XIST (Kay *et al.*, 1993, Penny *et al.*, 1996). XIST est fortement méthylé par le complexe de méthylation recruté par RBM15 et dont l'invalidation de RBM15 ou de METTL3 altère la mise sous silence de gènes par XIST. Cette inactivation transcriptionnelle est potentiellement médiée par YTHDC1 dont la liaison à XIST non-méthylé permet la restauration de son activité répressive (Patil *et al.*, 2016). Le rôle de XIST dans l'inactivation du X serait ainsi dépendant de sa méthylation en 5' qui déclencherait l'hétérochromatinisation du X inactif (Coker *et al.*,



## Introduction générale

2020). Cependant, le rôle de sa méthylation en 3', également présente, reste à éclaircir.

Chez *D. melanogaster*, la compensation du second X chez la femelle dépend de l'acteur du déterminisme du sexe Sxl. Son épissage spécifique chez la femelle donne une protéine Sxl fonctionnelle. Cette protéine contrôle l'épissage de *TRA* (*Transformer*), impliqué dans le déterminisme du sexe, et de *MSL-2* (*male-specific lethal 2*) impliqué dans l'hyper-transcription du chromosome X chez le mâle. L'inhibition de l'épissage du transcrit MSL-2 médié par Sxl conduit à la répression de sa traduction et une faible transcription des chromosomes X chez la femelle (Schütt et Nöthiger, 2000, Penalva et Sánchez, 2003, Salz, 2011). Comme décrit précédemment, l'épissage du transcrit *Sxl* est dépendant de la m<sup>6</sup>A via YT521-B, ce qui reflète une certaine continuité de la régulation du développement et de la reproduction au niveau épitranscriptomique chez la drosophile.

### 2.3.4. La différenciation cellulaire

Les cellules souches embryonnaires représentent l'unique type cellulaire ayant la capacité de donner l'ensemble des tissus de l'embryon. Ces cellules sont divisées en deux catégories selon leur état de pluripotence. Un état « naïf » et un état « amorcé » où les changements phénotypiques ne sont pas encore observables bien que les modifications moléculaires indiquent les prémices d'une différenciation. Ces deux états de pluripotence sont contrôlés par une expression équilibrée entre différents facteurs, notamment des facteurs de pluripotence ou de différenciation (Weinberger *et al.*, 2016). La N<sup>6</sup>-méthyladénosine permet de maintenir les cellules dans un état équilibré où elles ont la capacité de s'auto-renouveler mais aussi de se différencier. En effet, la perte de la m<sup>6</sup>A, suite à une déplétion d'acteurs du complexe de méthylation, perturbe cet équilibre et oriente les cellules soit vers l'état naïf avec pour seule possibilité l'auto-renouvellement, soit vers l'état engagé dans un processus de différenciation (Heck et Wilusz, 2019).

Cette méthylation de l'ARN, qui régule la balance des cellules « naïves » et « amorcées », induit une différenciation rapide des cellules. La modulation de l'expression de régulateurs majeurs pour la pluripotence fait pencher la balance, notamment pour la mise en place du système nerveux chez les Bilatériens (Lence *et al.*, 2016, Rockwell et Hongay, 2019, Heck et Wilusz, 2019, Soldano *et al.*, 2020). Chez



## Introduction générale

les Vertébrés, Bertero et collaborateurs (2018) mettent en évidence l'implication de la m<sup>6</sup>A dans la différenciation du neuroectoderme *via* la voie de signalisation TGF- $\beta$ . Cette voie de signalisation fait intervenir les facteurs de transcription SMAD2/3 qui recrutent le complexe de méthylation. Ce complexe va déposer la m<sup>6</sup>A sur des transcrits cibles comprenant *NANOG*, un facteur de pluripotence, dont la méthylation engendre la dégradation. La dégradation de *NANOG* conduit à l'inhibition de la voie Activin-NODAL et à la différenciation cellulaire (Bertero *et al.*, 2018). Cette régulation des facteurs de pluripotence fait notamment intervenir des modifications épigénétiques, telles que la modification de l'histone H3K36me3. Cette triméthylation de l'histone guide le dépôt de la m<sup>6</sup>A sur des transcrits cibles, ce qui déstabilise ces ARNm et permet la différenciation (Huang *et al.*, 2019a). Cependant, l'importance de l'interaction entre les marques épigénétiques et épitranscriptomiques dans la mise en place du neuroectoderme requiert des études plus approfondies.

Néanmoins, la m<sup>6</sup>A est particulièrement enrichie dans le neuroectoderme de la drosophile, où l'acteur Spenito appartenant au MACOM promeut la neurogenèse *via* YT521-B (Lence *et al.*, 2016). Cette régulation de la neurogenèse passe notamment par le contrôle de la croissance axonale *via* la méthylation des transcrits de la *profiline* (Rockwell et Hongay, 2019) et FMR1, l'homologue de FMRP (*Fragile-X mental retardation RNA binding protein*) (Soldano *et al.*, 2020). Cependant, bien que cette boucle de régulation fasse intervenir l'homologue du *reader* YTHDC1 pour l'inhibition de la traduction de m<sup>6</sup>A-ARNm réprimant la croissance axonale, son implication plus précoce dans la différenciation des cellules neuronales reste encore inconnue (Soldano *et al.*, 2020).

## 3. Le modèle biologique *Crassostrea gigas*

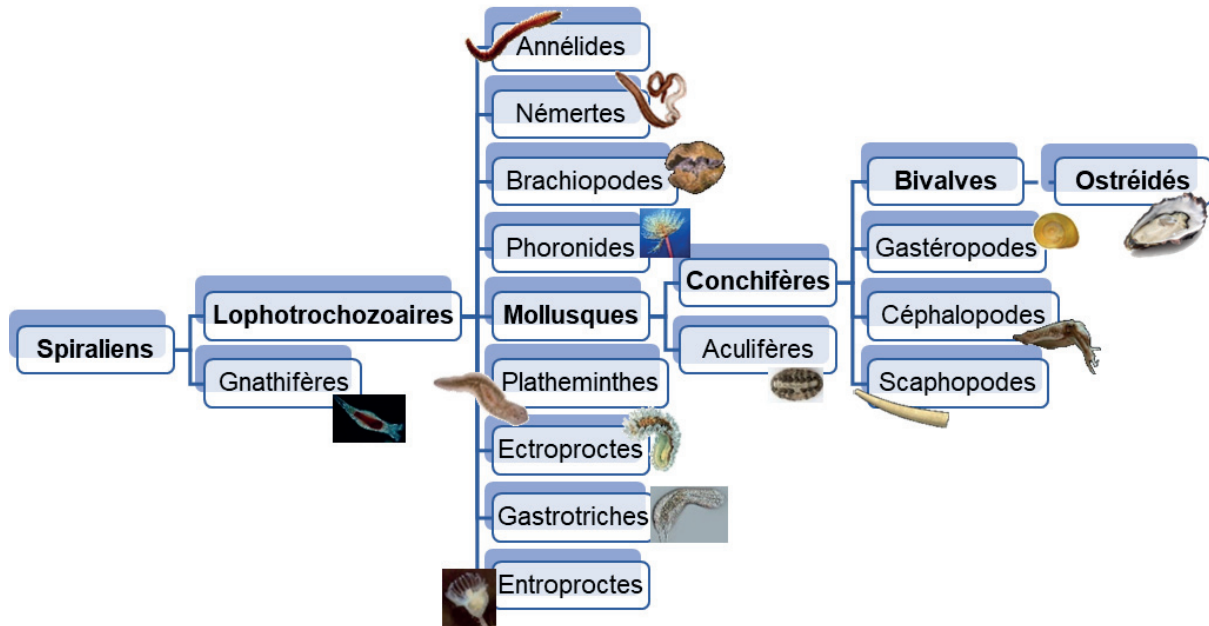
### 3.1. Un modèle d'intérêt

#### 3.1.1. La position phylogénétique

*Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793 ; *Magallana gigas*, Salvi & Mariottini, 2016) ou l'huître creuse du pacifique est un Mollusque Bivalve qui appartient au super-embranchement des Lophotrochozoaires. Les Lophotrochozoaires sont des animaux Spiraliens et se caractérisent généralement par une segmentation de l'œuf en spirale et par la présence d'un stade trochophore lors du développement. Au sein des

## Introduction générale

Bilatériens, les Lophotrochozoaires sont perçus comme le groupe frère des Ecdysozoaires, mais ils restent en comparaison encore peu décrits dans la littérature. En effet, les Ecdysozoaires comprennent les deux espèces modèles historiques, *D. melanogaster* et *C. elegans*, qui font l'objet de la majorité des études chez les « Invertébrés », bien que le super-embranchement des Lophotrochozoaires comprenne le plus grand nombre de phylums chez les Bilatériens. L'huître creuse fait partie de l'embranchement des Mollusques, qui avec les Annélides, représente la plus grande diversité morphologique du règne animal. Reflétant cette large biodiversité, la classe des Bivalves comprend 20 000 espèces qui sont retrouvées dans un panel d'habitats variés (Haszprunar et Wanninger, 2012). Néanmoins, la caractérisation de voies moléculaires dans ce clade depuis les années 2000 semble indiquer, de manière surprenante, une proximité plus importante avec les Vertébrés, qu'entre Lophotrochozoaires et Ecdysozoaires, pourtant les deux branches sœurs du groupe des Protostomiens (Dheilly *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2012, Riviere *et al.*, 2013, 2015, Penalzoa *et al.*, 2020). Parmi les Bivalves, *Crassostrea gigas* est une espèce emblématique de l'ordre des Ostréoidés et de la famille des Ostréidés (**Figure 14**).



**Figure 14 : Positionnement de *Crassostrea gigas* au sein des Spiraliens.**

Cet arbre phylogénétique simplifié illustre la position de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, au sein du clade des Spiraliens. D'après Marletaz *et al.*, 2019 et Haszprunar et Wanninger, 2012.

## Introduction générale

Sa position phylogénétique en fait une espèce d'intérêt pour l'étude de l'évolution des mécanismes biologiques notamment les mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques.

### 3.1.2. L'écologie de l'huître creuse

L'huître creuse est une espèce qui comprend une large zone de répartition au niveau des zones côtières, notamment de par ses capacités euryhaline et eurytherme, c'est-à-dire capable de tolérer de larges variations de salinités et de températures de la zone intertidale. Au cours de son développement, l'huître creuse change de biotope. Son développement comprend deux phases, une première phase pélagique avec une vie larvaire planctonique, suivi de la métamorphose qui conduit à la seconde phase dite benthique où l'animal devient sessile en créant un ciment pour s'attacher à des substrats meubles ou durs. L'huître adulte est un filtreur et représente de ce fait un bioaccumulateur de polluants. Sa présence dans de nombreux habitats marins anthropisés amène à la considérer comme une espèce sentinelle (His *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2018), utilisée comme un standard dans les tests d'embryotoxicité (norme ISO17244 : 2015).

### 3.1.3. L'intérêt économique

*C. gigas* une espèce introduite au début des années 70 en France. Celle-ci a été importée d'Asie, suite à de fortes mortalités de l'espèce endémique *Ostrea edulis*, et de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, pour relancer la filière ostréicole française (Grizel et Heral, 1991). En effet, la France appartient aux cinq pays, qui après la Chine, sont les plus gros producteurs d'huître creuse et le premier pays en Europe (Botta *et al.*, 2020). Avec 92 947 tonnes vendues en 2018, l'ostréiculture représente la première production conchylicole en France et la Normandie est la deuxième région produisant le plus important tonnage d'huître (Agreste, 2020). La production d'huître repose sur deux techniques d'obtention de juvéniles appelés naissains. Une première technique consiste en un captage naturel des larves, qui lors de la métamorphose vont se fixer sur les collecteurs. Le taux de recrutement du captage, qui peut varier grandement d'une année à l'autre car il est soumis aux pressions environnementales (Fleury *et al.*, 2020). La seconde technique, réalisée en éclosierie, consiste en un conditionnement d'individus adultes qui repose sur un apport alimentaire en phytoplancton *ad libitum*,

## Introduction générale

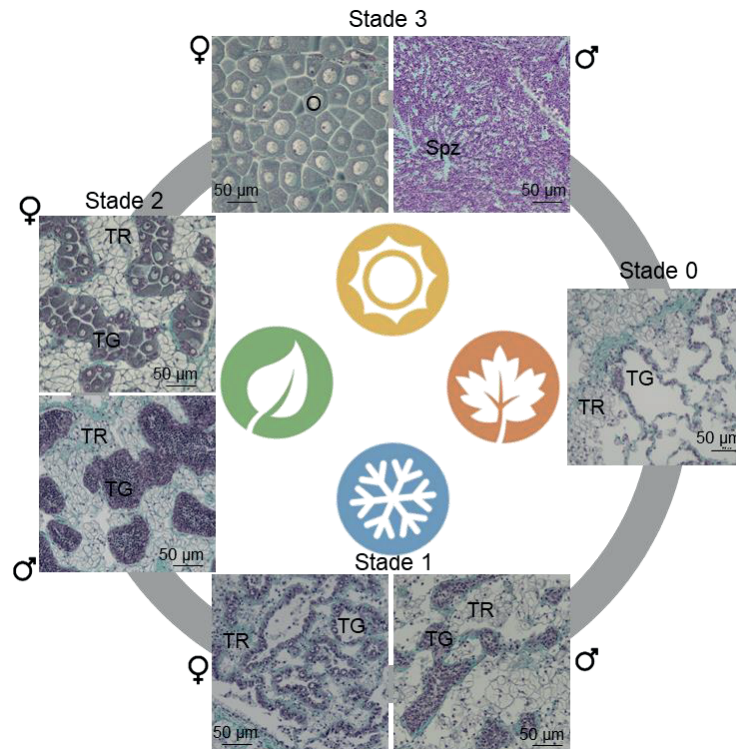
dans une eau à une température comprise entre 15 et 18°C. Ce conditionnement permet l'obtention des géniteurs indépendamment de la saisonnalité du cycle de reproduction, et permet la production de naissain tout au long de l'année en s'affranchissant des conditions extérieures. Cependant, cette technique requiert des connaissances notamment sur les stades de développement embryonnaires et larvaires afin de mieux maîtriser le développement précoce de l'huître creuse.

### 3.2. Le cycle de vie

L'huître creuse est un animal hermaphrodite irrégulier, dont la capacité de changement de sexe repose sur la régénération de la lignée germinale qui a lieu chaque année au sein de l'aire gonadique. Cette aire gonadique se compose d'un tissu conjonctif de réserve, qui est une source énergétique, et d'un tissu gonadique dont le développement se fait au détriment du tissu de réserve. Cette variation tissulaire de l'aire gonadique suit un cycle annuel saisonnier divisé en quatre stades. Le premier stade de la gamétogenèse est le stade 0 ou stade de repos sexuel qui a lieu de l'automne au début de l'hiver. Il se caractérise par des tubules gonadiques peu développés et un tissu de réserve en restructuration. Durant l'hiver, les tubules gonadiques se différencient en spermatogonies ou ovogonies et prolifèrent grâce à de nombreuses mitoses, c'est le stade 1 ou stade de proliférations goniales. À ce stade le tissu de réserve est entièrement reformé et occupe la majorité de l'aire gonadique. Le stade 2 est le stade de différenciation cellulaire qui se déroule au printemps. Lors de ce stade, la réserve énergétique est consommée au profit du tissu gonadique. Les cellules germinales entrent en méiose pour donner des ovocytes en prophase I, qui vont accumuler des réserves maternelles, et des spermatozoïdes. Le stade 3 a lieu en été où le tissu gonadique devient majoritaire dans l'aire gonadique. Ce stade de maturité sexuelle se termine par la ponte des gamètes matures à la fin de l'été (Berthelin *et al.*, 2000, Cherif-feildel, 2019) (**Figure 15**).

Au contact de l'eau de mer, l'ovocyte termine sa maturation avec la disparition de la vésicule germinative, environ 1 heure après la ponte. Suite à cette maturation, l'ovocyte est compétent pour la fécondation qui se déroule dans le milieu extérieur.

## Introduction générale



**Figure 15 : Schéma du cycle de reproduction de l'huître creuse.**

Représentation schématique du cycle de gamétogenèse de l'huître creuse selon le stade et le sexe. Les coupes histologiques d'aires gonadiques de *C. gigas* sont colorées au trichrome de Prenant-Gabe. TR : tissus de réserve, TG : tubule gonadique, O : ovocyte, Spz : spermatozoïdes (Cherif-Feildel communication personnelle).

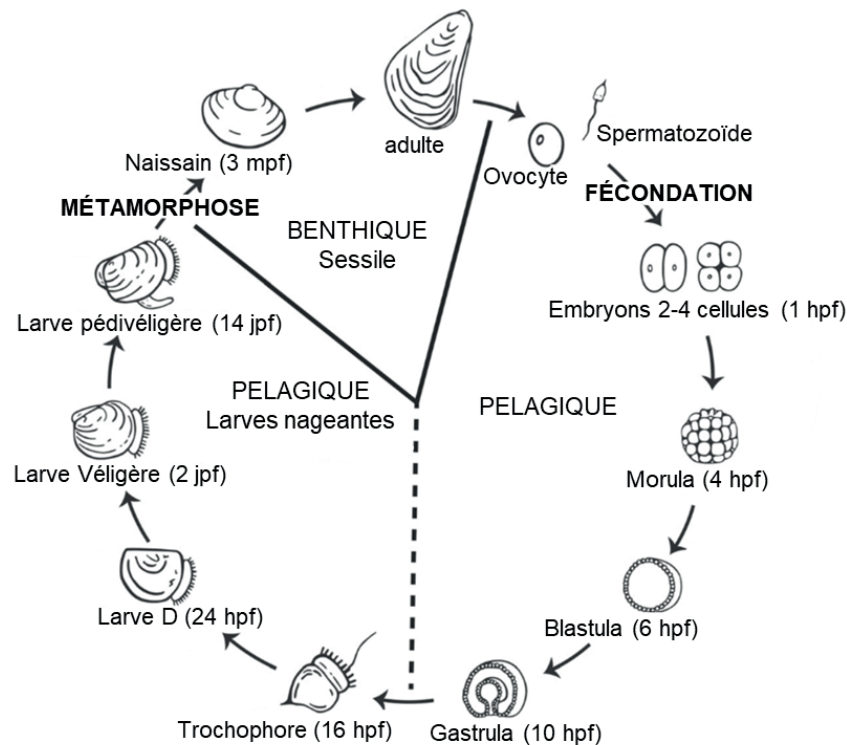
Chez les Bivalves, cette fécondation se réalise en 5 étapes (Bayne, 2017) :

1. Attraction des spermatozoïdes grâce à un gradient de concentration de molécules chimioattractantes sécrétées par l'ovocyte ;
2. Reconnaissance spermatozoïde-ovocyte *via* des protéines qui permettent l'interaction entre les gamètes
3. Libération du contenu de l'acrosome du spermatozoïde permettant la dissolution locale du chorion de l'ovocyte
4. Pénétration du spermatozoïde grâce au trou formé par le contenu acrosomique
5. Fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte et transfert du contenu génétique mâle dans le cytoplasme ovocytaire.

Après la fécondation, le développement précoce de l'huître commence par une phase embryo-larvaire grâce à la consommation des réserves maternelles de l'ovocyte. Elle est suivie par une phase planctonique nageuse au cours de laquelle

## Introduction générale

l'alimentation devient exogène et une phase de métamorphose où la larve pélagique se fixe au substrat et acquiert la morphologie de l'huître adulte (**Figure 16**).



**Figure 16 : Le cycle de de vie de l'huître creuse.**

Représentation schématique du cycle de vie de l'huître creuse simplifié. hpf : heure post-fécondation, jpf : jour pos-fécondation, mpf : mois post-fécondation Modifié d'après Vogeler *et al.*, 2016

Suite à la fécondation, l'œuf procède rapidement à une méiose complète, induisant une expulsion rapide du second globule polaire (Longwell et Stiles, 1968). Les mécanismes de la caryogamie ne sont pas documentés chez *C. gigas* mais diffèrent probablement peu de ce qui est observé chez les autres Mollusques. Le pronucléus mâle chemine dans le cytoplasme ovocytaire pendant la formation des globules polaires qui est déclenchée par la séparation de la membrane de fécondation (Galtsoff, 1964). Comme l'ensemble des Mollusques hors Céphalopodes, l'huître creuse présente une segmentation spiralée qui est rapidement inégale et asynchrone chez les Bivalves. La première division engendre un stade deux cellules où l'embryon comprend un petit blastomère dit micromère AB et un grand blastomère dit macromère CD. La seconde division permet l'obtention d'un embryon comprenant 4 cellules avec 3 micromères (A, B, C) et 1 macromère (D) (Dohmen, 1992). La synthèse d'ARN est active chez *C. gigas* dès la fin du stade 16 cellules (McLean et Whiteley, 1974) et la

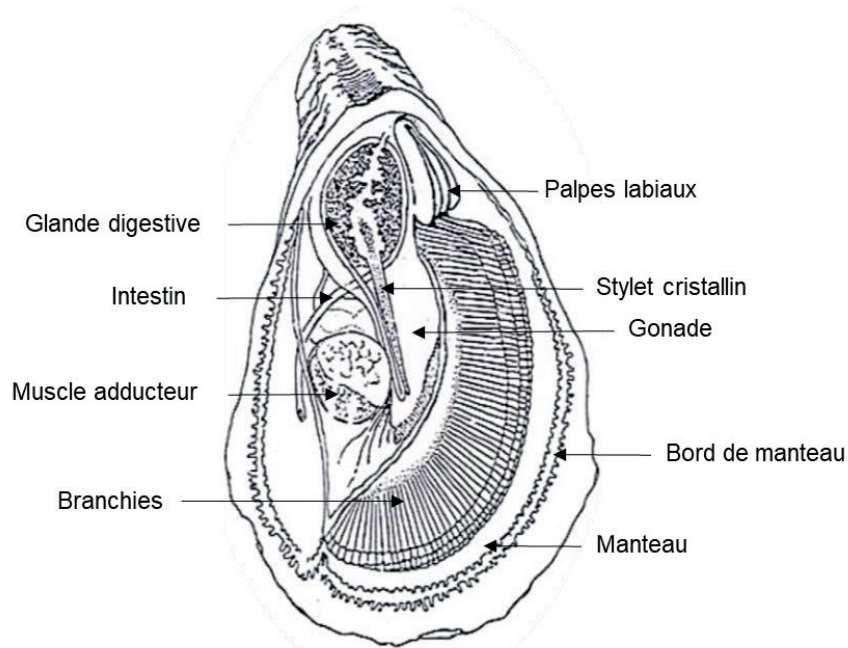


## Introduction générale

segmentation en spirale s'achève au stade morula atteint environ 4 heures post-fécondation (hpf), suivi du stade blastula environ 6 hpf à 21°C. C'est au stade blastula que l'embryon commence à être mobile avec des mouvements de rotation dus à l'apparition de cils au niveau des cellules de l'ectoderme. L'embryon acquiert ensuite une mobilité en « tire-bouchon » environ 10 hpf, qui marque le stade gastrula, caractérisé par la formation de deux dépressions opposées, le blastopore et un repli dorsal, ainsi que par la différenciation des cellules germinales primordiales (Fabioux *et al.*, 2004a).

Le premier stade larvaire est la larve trochophore atteint environ 16 hpf à 21°C. Cette larve en forme de toupie est caractéristique et porte des cils regroupés en position apicale (touffe apicale), d'une part, et d'autre part, en couronne en périphérie (prototroche) qui lui permettent de se déplacer librement dans la colonne d'eau. C'est aussi lors de ce stade que commence à se mettre en place la coquille primordiale. L'ébauche de la prodissoconque est produite par des cellules ectodermiques dorso-postérieures, appelées champs coquilliers, qui sécrètent le périostracum. C'est à partir du stade suivant, la larve D, que l'organogenèse est considérée comme complète 24 hpf avec la coquille appelée prodissoconque qui prend une forme de « D ». C'est au stade larve D que l'huître creuse démarre une alimentation exogène strictement planctotrophe environ 48 hpf. En effet, à partir de ce stade la larve est dite véligère car le prototroche se structure en velum, un organe cilié aux fonctions multiples liées aux déplacements, à la respiration et l'alimentation. Le développement de la larve se poursuit avec le stade pédivéligère marqué par la formation d'un pied fonctionnel utilisé pour se déplacer sur le substrat, et qui permet à la larve de devenir compétente pour la métamorphose. Ce stade pédivéligère est obtenu environ 14 jours après la fécondation et marque le début de la vie benthique de l'huître. Une fois immobile la larve sécrète un ciment pour se fixer au substrat grâce à son pied (Cranfield, 1975, Foulon *et al.*, 2018) et la métamorphose à lieu. La métamorphose se manifeste par la perte du velum et du pied qui laissent place aux branchies et palpes labiaux impliqués dans l'alimentation et par la calcification de la coquille pour donner la dissoconque (Bayne, 2017). Cette métamorphose induit une réorganisation des tissus pour donner place aux juvéniles ou naissains qui ont une morphologie proche de celle des adultes (**Figure 17**).

## Introduction générale



**Figure 17 : Anatomie interne de l'huître creuse**

Représentation schématique des principaux organes internes de l'huître creuse. Modifié d'après Howard *et al.*, 2004

### 3.3. Mécanismes moléculaires de régulation du développement de l'huître creuse

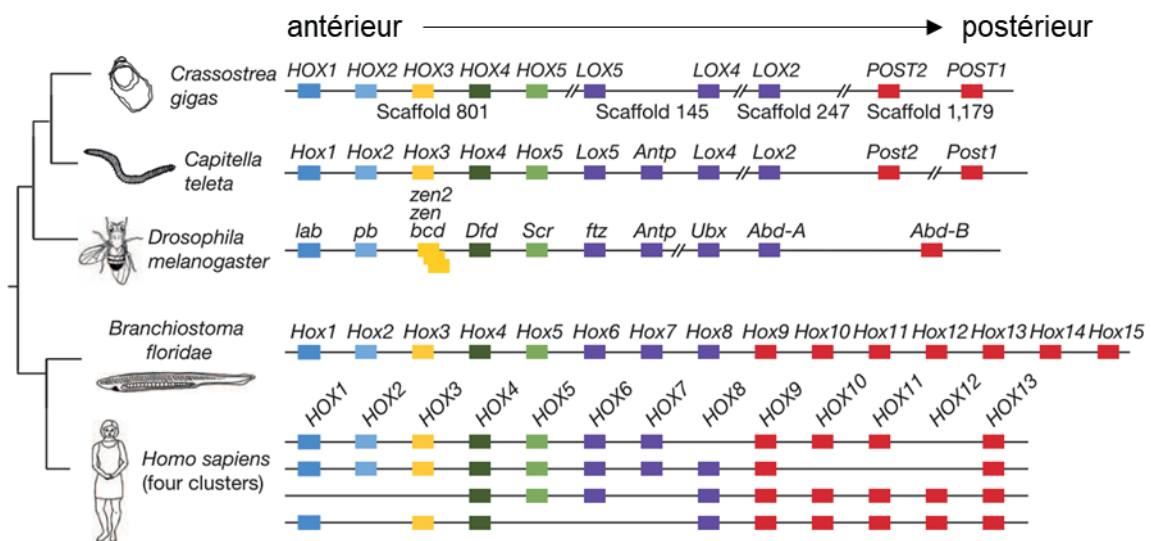
#### 3.3.1. Contrôle moléculaire du développement

L'acquisition de données moléculaires chez l'huître a mis en évidence la conservation de gènes de régulation du développement (Fabioux *et al.*, 2004b, Herpin *et al.*, 2005b, Dheilly *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2012, Riviere *et al.*, 2013, Paps *et al.*, 2015, Riviere *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2018). Ces données ont permis d'alimenter les connaissances sur l'évolution du développement chez les Protostomiens et plus particulièrement chez les Lophotrochozoaires. En effet, ces gènes ont tout d'abord été identifiés chez la drosophile *via* l'études de phénotypes mutants tels que *Antennapedia* et *Bithorax*. Des éléments importants pour l'organisation du plan général de l'organisme sont conservés chez l'huître comme les gènes *HOX*, certaines voies de signalisation, par exemple la voie BMP, ou encore des acteurs de l'élaboration de la lignée germinale tels que *VASA*.



## Introduction générale

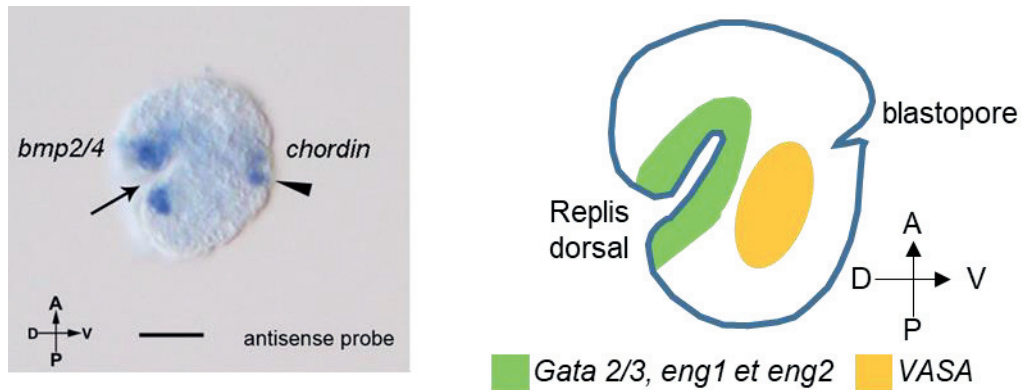
Les gènes *HOX* conservés chez *C. gigas* montrent une répartition en quatre clusters de gènes conservés chez les Bilatériens auxquels s'ajoutent des gènes spécifiques aux Lophotrochozoaires (Zhang *et al.*, 2012, Paps *et al.*, 2015) (**Figure 18**). Bien que l'expression colinéaire spatiale n'ait pas été explorée, l'expression colinéaire temporelle semble absente chez l'huître creuse (Zhang *et al.*, 2012, Paps *et al.*, 2015). En effet, l'expression colinéaire temporelle est restreinte aux clades des Vertébrés, Céphalocordés, quelques Arthropodes, Annélides et Polyplacophores (Barucca *et al.*, 2016, Gaunt, 2018).



**Figure 18 : Conservation des gènes HOX chez *C. gigas*.**

Représentation des clusters des gènes *HOX* chez l'huître creuse *C. gigas*, l'annélide polychète *C. teleta*, la drosophile *D. melanogaster*, l'amphioxus *B. floridae* et l'Homme *H. sapiens*. Modifié d'après Zhang *et al.*, 2012

L'étude de la voie BMP chez l'huître creuse montre une conservation de l'ensemble de la voie guidant la différenciation cellulaire selon l'axe dorso-ventral (Lelong *et al.*, 2000, Herpin *et al.*, 2005b, 2005a, 2007, Tan *et al.*, 2017, 2018). En effet, BMP2/4 est fortement exprimée en position dorsale formant un gradient opposé à l'expression ventrale de la chordine, au stade gastrula. Ces gradients guident potentiellement la formation de la coquille et de la lignée germinale selon l'axe dorso-ventral (Tan *et al.*, 2017) (**Figure 19**). Une observation confirmée par l'utilisation de l'inhibiteur de la voie BMP, la dorsomorphine, induisant notamment une perturbation de l'expression de gènes à l'origine de la mise en place de la coquille chez l'huître (Tan *et al.*, 2018).



**Figure 19 : Contrôle de l'axe dorso-ventral par BMP chez l'huître creuse.**

À droite : double hybridation de *bmp2/4* et de la *chordine* au stade gastrula chez l'huître creuse. À gauche : Représentation schématique de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place du champ coquiller (*gata2/3, engrailed 1 (eng1) et engrailed 2 (eng2)*) et de la lignée germinale (*vasa*) au stade gastrula chez *C. gigas*. La flèche indique le repli dorsal et le triangle le blastopore. A : antérieur, P : postérieur, D : dorsal, V : ventral. Modifié d'après Tan *et al.*, 2017

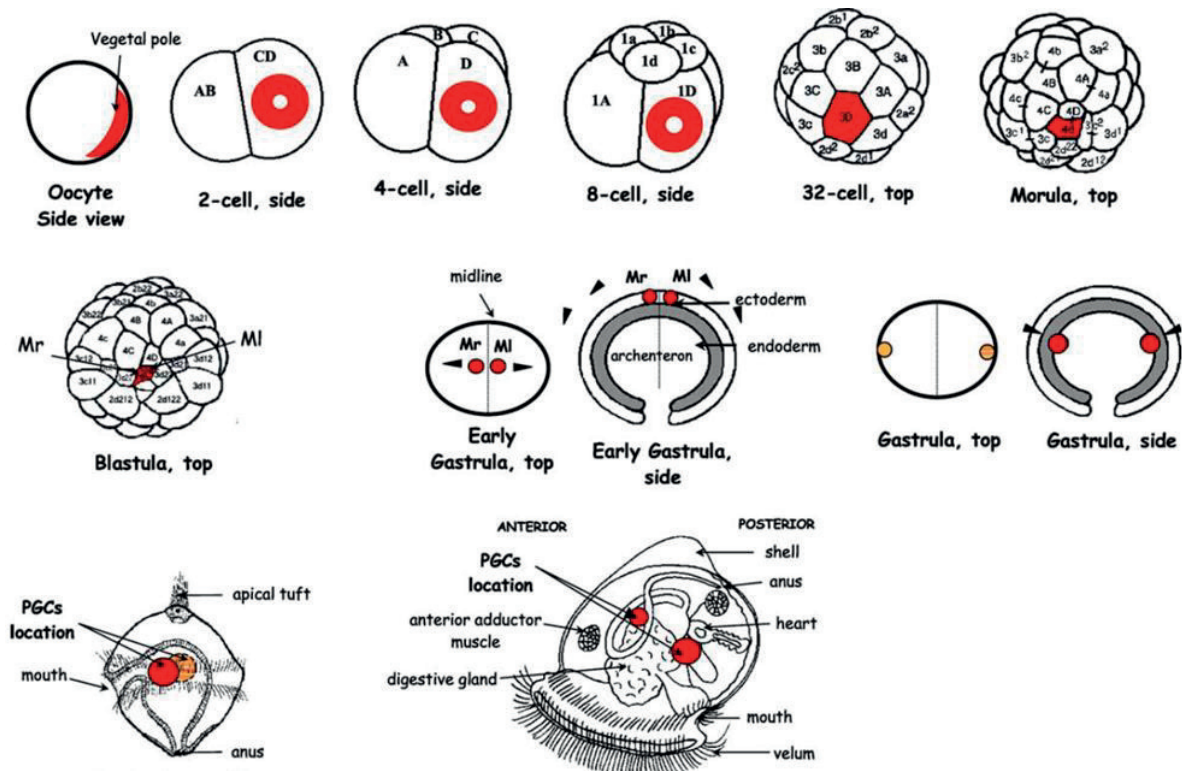
VASA est un acteur de la différenciation cellulaire responsable de la formation des cellules germinales dans l'embryon des Bilatériens. Cet acteur conservé chez l'huître creuse est transmis par le matériel maternel accumulé dans l'ovocyte. Il est potentiellement à l'origine de la formation des cellules germinales primordiales observées dès le stade gastrula (Fabioux *et al.*, 2004b, 2004a) (**Figure 20**). Fabioux et collaborateurs (2009) ont également démontré la conservation de son rôle dans la formation de la lignée germinale chez l'adulte. En effet, l'injection d'un ARN interférence visant VASA dans la gonade conduit à un arrêt de la prolifération et potentiellement de la différenciation des cellules germinales.

### 3.3.2. Régulation épigénétique chez l'huître creuse

L'étude des mécanismes épigénétiques chez *C. gigas* a permis de mettre en évidence la conservation des trois grands mécanismes contrôlant la transcription des gènes.

La 5mC des dinucléotides CpG et la machinerie enzymatique associée sont conservées chez l'huître creuse avec une méthylation en « mosaïque » typique des « Invertébrés » (Gavery et Roberts, 2010, Riviere *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014b, Sussarellu *et al.*, 2018, Fallet *et al.*, 2020).

## Introduction générale



**Figure 20 : Schéma de la localisation de *vasa* au cours du développement de l'huître creuse.**

En rouge ou orange est représenté la localisation de l'orthologue de *vasa* au cours de l'embryogenèse. Les flèches représentent le sens de migration des cellules. D'après Fabioux *et al.*, 2004

La majorité des 5mC est retrouvée dans les unités transcriptionnelles, ou « gene bodies », où le niveau de méthylation est corrélé avec le niveau de transcription (Gavery et Roberts, 2013, Riviere *et al.*, 2013, 2017, Wang *et al.*, 2014b). Néanmoins, comme chez les Mammifères, les promoteurs peuvent également être méthylés et réprimer la transcription (Rivière, 2014, Saint-carlier et Riviere, 2015). De par le contrôle de l'expression des gènes, cette marque épigénétique est cruciale au développement de l'huître. En effet, elle contrôle l'expression des gènes homéotiques et est associée à l'activation du génome zygotique, à la métamorphose et à la gamétogenèse (Riviere *et al.*, 2013, 2017, Saint-carlier et Riviere, 2015, Zhang *et al.*, 2018a).

Les modifications des histones sont largement décrites pour leurs implications dans la régulation du développement. Chez l'huître, les histones sont méthylées et certains éléments de la machinerie enzymatique associée, comme les histones déméthylases Jumonjis, sont conservés. La méthylation des histones, modifiée au

## Introduction générale

cours de l'embryogenèse, et l'expression des Jumonjis coïncident avec les étapes du développement et de la gamétogenèse (Fellous *et al.*, 2014a, 2019). L'inhibition des déméthylases Jumonji, au cours du développement de *C. gigas*, induit une hyperméthylation des histones et conduit à d'importantes altérations développementales, associées à une modification de l'expression de gènes. Ces altérations mettent en évidence le rôle majeur de ces modifications au cours du développement de l'huître (Fellous *et al.*, 2019).

Par ailleurs, seul les ARN non codants lncARN, miARN et piARN sont décrits chez les bivalves (Rosani *et al.*, 2016, Hongkuan *et al.*, 2020). Bien que récemment mis en évidence chez l'huître, ces ARN semblent impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques comme le développement, la reproduction et l'immunité (Xu *et al.*, 2014b, Yu *et al.*, 2016, Yue *et al.*, 2018a, Sun et Feng, 2018, Hongkuan *et al.*, 2020, Rosani *et al.*, 2020).

## 4. Objectifs

Le développement des organismes Bilatériens consiste en l'apparition de types cellulaires différenciés, à partir de la cellule œuf du zygote, qui s'associent pour former les tissus et organes de l'individu adulte. Le phénotype spécialisé de l'adulte repose alors sur l'hétérogénéité cellulaire qui provient d'un large panel de mécanismes moléculaires basés sur le génome zygotique transmis intégralement au travers des divisions cellulaires. La différenciation est donc fondée sur l'établissement et la régulation de transcriptomes spécifiques permettant l'obtention et le maintien de types cellulaires différenciés.

La régulation des transcriptomes dépend de mécanismes qui agissent aux niveaux pré-transcriptionnel, transcriptionnel et post-transcriptionnel. Récemment, il a été démontré un mécanisme post-transcriptionnel, l'épitranscriptomique. La  $N^6$ -méthyladénosine est capable d'influencer le devenir des transcrits sans modifier la séquence de l'ARN et repose sur une machinerie enzymatique complexe. L'activité de cette machinerie est sous l'influence de paramètres environnementaux au sens large et constitue un composant crucial du développement chez les Vertébrés et les Ecdysozoaires. Cependant, des différences existent et interrogent la présence, la conservation fonctionnelle et la sensibilité à l'environnement de la voie épitranscriptomique  $m^6A$  au cours de l'évolution.

## Introduction générale

L'huître creuse *C. gigas* présente un développement qui se déroule en une phase précoce pélagique et une phase tardive et une vie adulte benthique en milieu intertidal. Il implique des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et des histones qui sont sous l'influence de l'environnement. Les nombreuses données génomiques, transcriptomiques et épigénétiques acquises chez l'huître, ainsi que sa position phylogénétique en font un modèle au sein des Protostomiens. Néanmoins, le groupe des Lophotrochozoaires, auquel elle appartient, reste largement sous-décrit dans la littérature, notamment en regard de la diversité de formes et d'écologies qu'il abrite. Bien que des résultats préliminaires au laboratoire indiquaient la présence de m<sup>6</sup>A chez *C. gigas*, l'existence d'une voie épitranscriptomique chez les Lophotrochozoaires était inexplorée au début de ce travail. Cependant, l'étude d'une telle voie chez un Lophotrochozoaire est cruciale pour la compréhension de la régulation du développement et de son évolution.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une voie épitranscriptomiques chez *C. gigas* ? Dans quelle mesure ses composants sont-ils conservés ?

Le premier objectif de cette thèse est d'étudier la conservation de cette méthylation et de sa machinerie associée au cours du développement de l'huître creuse. La conservation de cette méthylation est étudiée par une mesure de la m<sup>6</sup>A-ARN aux différents stades embryon-larvaires et par une étude *in silico* des différents acteurs de la machinerie. Cette analyse *in silico* est complétée par une étude en spectrométrie de masse couplée à la technique du « RNA pull-down » pour identifier de potentiels *readers*. Leurs fonctions sont appréhendées grâce à l'analyse de transcriptomes développementaux et de l'étude de l'ontologie de gènes identifiés. Ces résultats sont développés dans le chapitre 1 sous la forme d'un article publié.

- Quelle est la signification biologique d'une voie m<sup>6</sup>A-ARN putative au cours du développement de l'huître ?

Dans la mesure où la voie épitranscriptomique est conservée et active dès les stades précoces, elle est susceptible de moduler les transcriptomes développementaux et de participer à l'élaboration des phénotypes *via* la régulation de transcrits spécifiques. Afin de comprendre comment cette méthylation régule les

## Introduction générale

transcriptomes développementaux de l'huître, les m<sup>6</sup>A-méthylomes sont caractérisés à différents stades du développement grâce à l'immunoprécipitation et séquençage des m<sup>6</sup>A-ARN (MeRIP-seq). Ces résultats permettent d'identifier les transcrits ciblés par la m<sup>6</sup>A mais aussi de suivre le niveau et la localisation de la méthylation sur les transcrits. Cette analyse apporte des indices sur les fonctions de contrôle du devenir des ARN par la m<sup>6</sup>A, et plus largement de la régulation épitranscriptomique des processus développementaux. Sa caractérisation chez un Lophotrochozoaire permet également d'envisager l'évolution de tels mécanismes. Ce travail correspond au chapitre 2 qui est développé sous la forme d'un article en cours de préparation.

- Les épitranscriptomes peuvent-ils constituer un vecteur de transmission intergénérationnelle de traits de vie parentaux chez l'huître ?

Les ARN maternels accumulés pendant l'ovogenèse constituent la seule ressource pour la traduction avant l'activation du génome zygotique dans l'embryon. Comme les épitranscriptomes sont sous l'influence d'acteurs enzymatiques, il est possible que les conditions environnementales lors de la gamétogenèse soient reflétées dans les épitranscriptomes et transmis à la génération suivante *via* les gamètes. Par ailleurs, il est démontré que l'exposition de géniteurs à des stress environnementaux a des effets néfastes sur la descendance. Le chapitre 3 est dédié à l'examen de l'hypothèse de la participation de la m<sup>6</sup>A à la transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel.



# **Chapitre I :**

**Caractérisation d'une voie  
épitranscriptomique au  
cours du développement**





# Chapitre I : Caractérisation d'une voie épitranscriptomique au cours du développement

## 1. Préambule


La N<sup>6</sup>-méthyladénosine est une modification de l'ARN prépondérante chez les Eucaryotes avec un rôle crucial dans le développement des Bilatériens. Ce rôle est porté en partie par la machinerie associée qui comporte trois classes de protéines : Les *writers* qui portent l'activité catalytique de méthylation, les *erasers*, qui sont les déméthylases et les *readers* qui ont la capacité de se lier à la m<sup>6</sup>A sont les médiateurs de ses effets biologiques. En effet, cette méthylation et donc la machinerie associée contrôle notamment l'épissage, la traduction et la stabilité des m<sup>6</sup>A-ARN (Meyer *et al.*, 2015, Lence *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2018, Kasowitz *et al.*, 2018, Kan *et al.*, 2020). De par le contrôle du devenir des m<sup>6</sup>A-ARN cette voie épitranscriptomique est impliquée dans la régulation de processus clé du développement comme la MZT (Zhao *et al.*, 2017), la compensation du second chromosome X chez la femelle (Patil *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017), la différenciation cellulaire et la gamétogenèse (Lence *et al.*, 2016, Tang *et al.*, 2017, Lasman *et al.*, 2020a).

Bien que cette voie épitranscriptomique semble conservée au sein des Bilatériens, seuls les groupes des Vertébrés et des Ecdysozoaires ont été explorés et montrent des spécificités. Ce chapitre rapporte les résultats de l'étude de la conservation de la m<sup>6</sup>A et de la machinerie enzymatique chez *C. gigas*. La conservation de cette méthylation est explorée par les techniques de *dotblot* et par spectrométrie de masse. La machinerie associée est identifiée par une recherche *in silico*, dont la fonction de liaison à la m<sup>6</sup>A de certains *readers* est validée par capture à l'aide d'un m<sup>6</sup>A-oligo couplé à la spectrométrie de masse. L'étude de cette voie épitranscriptomique et en particulier de la machinerie chez l'huître creuse met en évidence, pour la première fois à notre connaissance, sa conservation chez un Lophotrochozoaire. De plus, l'analyse de la variation de la m<sup>6</sup>A et de l'expression des acteurs de sa machinerie révèle pour la première fois l'implication de cette voie épitranscriptomique dans la régulation de processus développementaux chez l'huître creuse. L'ensemble de ces résultats

## **Chapitre I : Caractérisation d'une voie épitranscriptomique au cours du développement**

apporte de nouvelles connaissances sur l'évolution et le rôle développemental de cette voie de régulation du devenir des ARN.

# A functional m<sup>6</sup>A-RNA methylation pathway in the oyster *Crassostrea gigas* assumes epitranscriptomic regulation of lophotrochozoan development

Lorane Le Franc<sup>1,2</sup>, Benoit Bernay<sup>3</sup>, Bruno Petton<sup>4</sup>, Marc Since<sup>5</sup>, Pascal Favrel<sup>1,2</sup> and Guillaume Rivière<sup>1,2</sup> 

1 UNICAEN, CNRS, BOREA, Normandie Univ, Caen, France

2 Laboratoire Biologie des organismes et Ecosystèmes aquatiques (BOREA), Muséum d'Histoire naturelle, CNRS, IRD, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, Université des Antilles, Caen, France

3 UNICAEN, ICORE, PROTEOGEN Core Facility, Caen, SF, France

4 Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre Bretagne, Normandie Univ, Plouzané, France

5 UNICAEN, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, SF ICORE, PRISMM Core Facility, Normandie Univ, Caen, France

## Keywords

development; epitranscriptomics; methylation; oyster; RNA

## Correspondence

G. Rivière, UNICAEN, CNRS, BOREA, Normandie Univ, 14000 Caen, France

Tel: +33231565113

E-mail: guillaume.riviere@unicaen.fr

(Received 7 February 2020, revised 13 June 2020, accepted 28 July 2020)

doi:10.1111/febs.15500

N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is a prevalent epitranscriptomic mark in eukaryotic RNA, with crucial roles for mammalian and ecdysozoan development. Indeed, m<sup>6</sup>A-RNA and the related protein machinery are important for splicing, translation, maternal-to-zygotic transition and cell differentiation. However, to date, the presence of an m<sup>6</sup>A-RNA pathway remains unknown in more distant animals, questioning the evolution and significance of the epitranscriptomic regulation. Therefore, we investigated the m<sup>6</sup>A-RNA pathway in the oyster *Crassostrea gigas*, a lophotrochozoan model whose development was demonstrated under strong epigenetic influence. Using mass spectrometry and dot blot assays, we demonstrated that m<sup>6</sup>A-RNA is actually present in the oyster and displays variations throughout early oyster development, with the lowest levels at the end of cleavage. In parallel, by *in silico* analyses, we were able to characterize at the molecular level a complete and conserved putative m<sup>6</sup>A machinery. The expression levels of the identified putative m<sup>6</sup>A writers, erasers and readers were strongly regulated across oyster development. Finally, RNA pull-down coupled to LC-MS/MS allowed us to prove the actual presence of readers able to bind m<sup>6</sup>A-RNA and exhibiting specific developmental patterns. Altogether, our results demonstrate the conservation of a complete m<sup>6</sup>A-RNA pathway in the oyster and strongly suggest its implication in early developmental processes including MZT. This first demonstration and characterization of an epitranscriptomic regulation in a lophotrochozoan model, potentially involved in the embryogenesis, bring new insights into our understanding of developmental epigenetic processes and their evolution.

## Abbreviations

2/8 C, two- to eight-cell embryos; ALKBH5, AlkB homologue 5; B, blastula; CAN, acetonitrile; Cg-m<sup>6</sup>A-BPs, oyster m<sup>6</sup>A-interacting protein; D, D-larvae; E, oocytes; eIF3, eukaryotic initiation factor 3; F E, fertilized oocytes; FTO, fat mass and obesity-associated protein; G, gastrula; GO, Gene Ontology; HAKAI, RING finger E3 ubiquitin ligase; HNRNPA2B1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1; hpf, hours postfertilization; M, morula; m<sup>6</sup>A, N<sup>6</sup>-methyladenosine; METTL, methyltransferase-like; MZT, maternal-to-zygotic transition; Prrc2a, proline-rich coiled-coil 2a; RBM15, RNA-binding motif 15; SAM, S-adenosyl-methionine; SPRI, solid-phase reversible immobilization; SSW, sterile sea water; TPM, transcripts per kilobase per million reads; WTAP, Wilms' tumour 1-associated protein; YTHDC, YTH domain-containing protein; YTHDF, YTH domain family protein; ZC3H13, zinc finger CCCH-type containing 13.

## Introduction

The N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is the prevalent chemical RNA modification in all eukaryotic coding and non-coding RNAs [1]. Messenger RNAs are the most heavily m<sup>6</sup>A-methylated RNAs, with m<sup>6</sup>A bases lying mostly in their 3' UTRs, at the vicinity of their stop codon [2-4] and also in 5' UTRs and long internal exons [4,5]. N<sup>6</sup> methylation of RNA adenosines is responsible for RNA processing and, like DNA methylation or histone modifications, contributes to the regulation of gene expression without changing the DNA or mRNA sequence. Therefore, m<sup>6</sup>A constitutes a new layer of post-transcriptional gene regulation, which is emerging or has been proven critical in various biological processes, and is referred to as epitranscriptomic [2].

The dynamics and biological outcomes of m<sup>6</sup>A levels are the results of the activity of a complex protein machinery comprising writers, erasers and readers. The addition of a methyl group to the 6<sup>th</sup> nitrogen of RNA adenosines is catalysed by m<sup>6</sup>A writers with distinct properties. Methyltransferase-like 16 (METTL16) is a 'stand-alone' class I methyltransferase that recognizes the UACA\*GAGAA consensus sequence (with \* indicating the target adenosine) [6]. By contrast, METTL3 transfers methyl groups to adenosines within the RRA\*CH motif [2,3,7]. METTL3 is only active within a tripartite 'core complex' [8] comprising METTL3, METTL14 which enhances the methyltransferase activity supported by the MTA-70 domain of METTL3 [9,10] and the regulator protein Wilms' tumour 1-associated protein (WTAP) [4,9,11]. This core complex can interact with virilizer-like (or KIAA1429) [12], RING finger E3 ubiquitin ligase (HAKAI) [12,13], zinc finger CCCH-type containing 13 (ZC3H13) [12,14], RNA-binding motif 15 (RBM15) and RBM15B [7,15] which are suspected to intervene in the core complex activity and target specificity. The demethylation of adenosines has been demonstrated to be an active process catalysed by eraser enzymes belonging to the Fe(II)/2-oxoglutarate dioxygenase family: AlkB homologue 5 (ALKBH5) [16,17] and the fat mass and obesity-associated protein (FTO) [17,18].

A growing number of reader proteins which recognize the m<sup>6</sup>A-RNA mark are being described. They may be divided into two classes depending on the presence of a YT521-B homology (YTH) domain in their primary sequence. The YTH protein family includes YTH domain family protein 1-3 (YTHDF1-3) and YTH domain-containing protein 2 (YTHDC2), which are cytosolic m<sup>6</sup>A readers involved in m<sup>6</sup>A-RNA stability and translation [19-22]. The fifth YTH member is YTHDC1, which is present in the nucleus and controls

splicing [23] and nuclear export [24] of m<sup>6</sup>A-RNA. The second class of readers comprises proteins without YTH domain which are involved in several molecular mechanisms. For example, the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRNPA2B1) is important for miRNA processing [25]. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins 1-3 (IGF2BP1-3) [26] and proline-rich coiled-coil 2a (Prrc2a) [27] participate in RNA stability, while eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) guides cap-independent translation [5].

The m<sup>6</sup>A epitranscriptomes underlie important biological functions, most of which being related to developmental processes, including the control of cell differentiation [27-32], maternal-to-zygotic transition (MZT) [33], sex determination [7,34] and gametogenesis [16,21,35,36]. Such critical epitranscriptomic outcomes are conserved in the animal evolution and were characterized in both vertebrates and ecdysozoans, that is mammals and drosophila.

However, such conserved biological significance originates in diverse epitranscriptomic mechanisms. Indeed, not all ecdysozoans bear a complete m<sup>6</sup>A-RNA machinery, such as *C. elegans* whose genome is devoid of the related protein machinery with the exception of a putative orthologue of METTL16 [37,38]. In addition, no m<sup>6</sup>A eraser has been described to date in nonvertebrate models, and especially ecdysozoans such as the drosophila or *C. elegans* [38-40], where it cannot be excluded that m<sup>6</sup>A-RNA methylation could be removed by the activity of characterized 6mA-DNA demethylases [41,42]. This situation may illustrate a growing complexity of epitranscriptomic mechanisms during the animal phylogeny and raises fundamental questions about its evolution and its presence in organisms distant from mammals and ecdysozoans. However, to date, no data about a possible epitranscriptomic regulation are available to our knowledge in lophotrochozoans, the understudied sister group of ecdysozoans within protostomes, although representing an important range of metazoan biodiversity.

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* (i.e. *Magallana gigas*) is a bivalve mollusc whose great ecological and economical significance allowed its emergence as a model species within lophotrochozoan organisms. As such, an important amount of genetic, transcriptomic and epigenetic data has been generated in this model. Interestingly, the embryo-larval development of *C. gigas* is described to be under the strong epigenetic influence of DNA methylation [43-47] and histone marks [48-50]. Besides, oyster develop exposed to external environmental conditions, and in other models, the

m<sup>6</sup>A methylation of RNA and/or the expression of its machinery can be induced by heat stress, UV exposure or endocrine disruptors [5,51-54], questioning the presence of an m<sup>6</sup>A pathway in *C. gigas* and its significance in oyster early development.

To investigate this, we measured m<sup>6</sup>A levels in RNA across the entire embryo-larval life of the oyster using mass spectrometry and dot blot. We also searched the available *in silico* resources for putative conserved m<sup>6</sup>A-related proteins in *C. gigas* genomic data as well as their cognate expression kinetics using RNA-Seq assembly analyses. We also performed RNA pull-down with a synthetic m<sup>6</sup>A-RNA oligonucleotide coupled to liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS) to characterize potential oyster m<sup>6</sup>A-binding proteins. To our knowledge, this study is the first report unravelling epitranscriptomic mechanisms outside vertebrate and ecdysozoan animal models.

## Results

### m<sup>6</sup>A is present in oyster RNA, differentially affects distinct RNA populations and displays variations during embryonic life

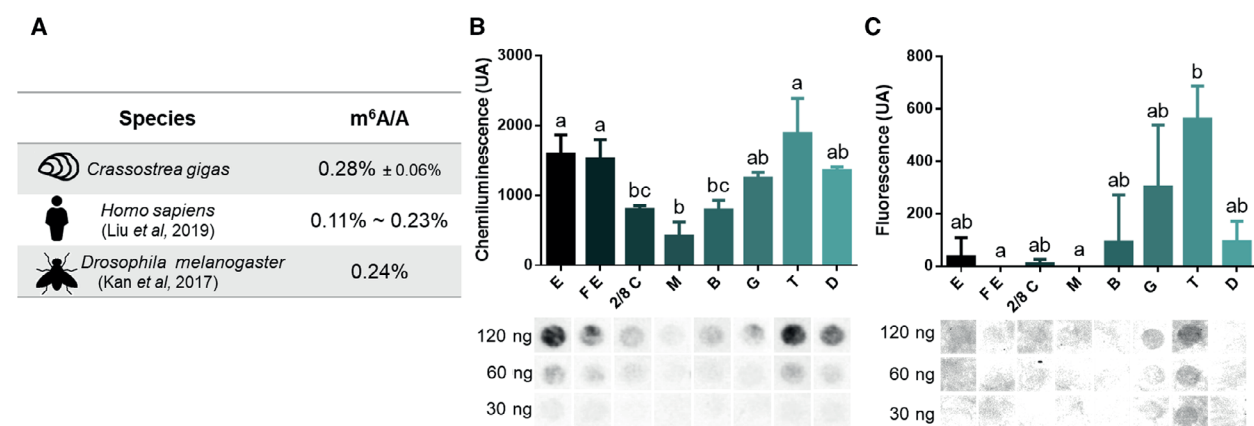
Mass spectrometry measurements revealed that m<sup>6</sup>A is present in oyster RNA, with global m<sup>6</sup>A/A levels of ca. 0.3%, a value comparable to what has been found in the human and the fruit fly (Fig. 1A). Immunoblot assays indicate that total and polyA + RNA present variable amounts of m<sup>6</sup>A during oyster development

and that these variations display distinct profiles suggesting specific methylation patterns between RNA populations. Indeed, m<sup>6</sup>A methylation in total RNA is the highest in the early stages (oocytes and fertilized oocytes) then gradually decreases until the morula stage before gradually increasing again up to the trochophore stage when it recovers its maximum (Fig. 1B). In contrast, m<sup>6</sup>A levels in polyA + RNA are hardly detected in early stages but display a peak in the gastrula and trochophore stages (Fig. 1C).

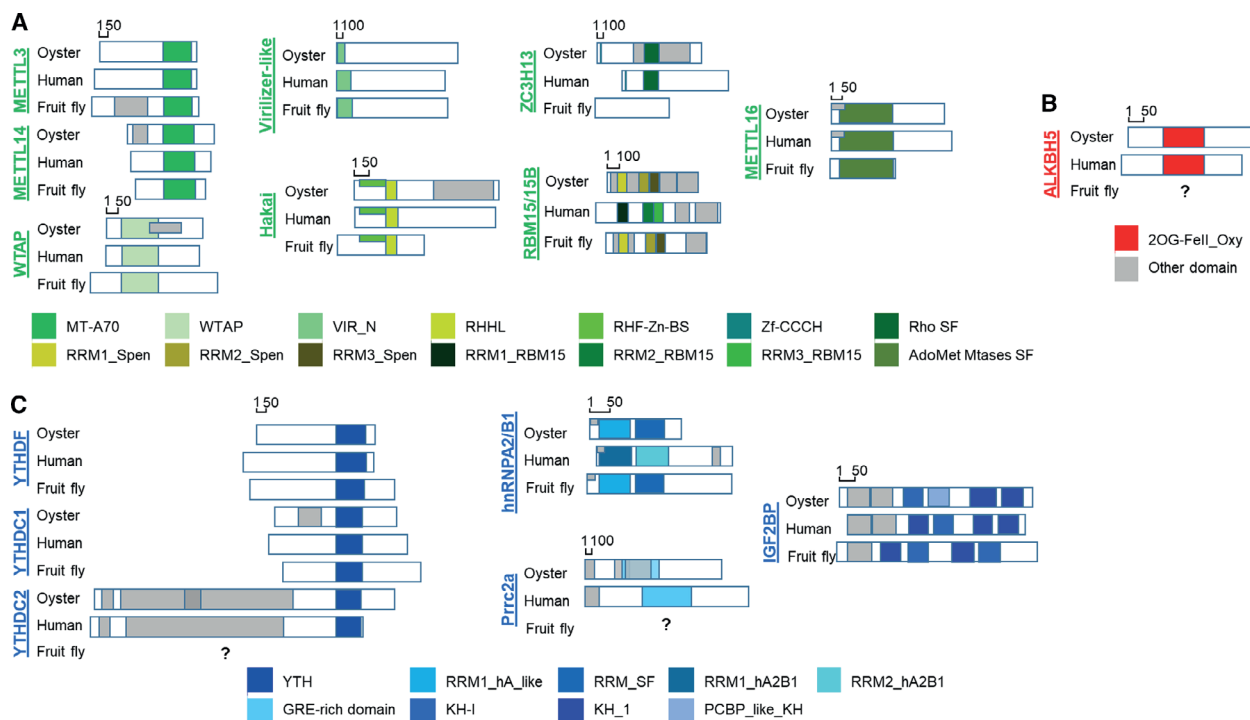
### m<sup>6</sup>A machinery is conserved at the molecular level in the oyster

*In silico* analyses led to the identification of oyster sequences encoding putative orthologues of m<sup>6</sup>A writers, erasers and readers that are present in the human and/or in the human and the fruit fly.

All the eight m<sup>6</sup>A-RNA writers characterized in the human and/or drosophila at the time of the study, namely METTL3, METTL14, WTAP, virilizer-like, HAKAI, ZC3H13, RBM15/15B and METTL16, were present in the oyster at the gene level. The encoded protein primary sequences all display the specific domains required for enzymatic activity and/or binding. They include MT-A70 and AdoMetMtases SF domains for METTL3, METTL14 and METTL16, respectively, that bear the methyltransferase activity. Oyster WTAP and virilizer-like orthologues exhibit WTAP and VIR\_N domains, respectively, that are required in their human counterparts to bind and



**Fig. 1.** m<sup>6</sup>A levels across oyster development. (A) m<sup>6</sup>A level quantified by LC-MS/MS in *Crassostrea gigas* embryo-larval stages pooled from oocytes to D-larvae ( $n = 3$ ) is compared to the m<sup>6</sup>A level in *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster*; (B) dot blot quantification of m<sup>6</sup>A in total RNA throughout oyster development ( $n = 3$ ); (C) dot blot quantification of m<sup>6</sup>A in polyA + RNAs throughout oyster development ( $n = 3$ ), Kruskal–Wallis test,  $\alpha < 0.05$ . E, egg; F E, fertilized egg; 2/8C: two- to eight-cell embryos; M, morula; B, blastula; G, gastrula; T, trochophore; D, D-larvae. Chemiluminescence (B) and fluorescence (C) are measured as a ratio between dot intensity of development stages and their respective controls for each amount of RNA (120, 60 and 30 ng). Data are presented as mean ± SD ( $n = 3$ ).



**Fig. 2.** The putative conserved m<sup>6</sup>A machinery in *Crassostrea gigas*. Domain architecture of actors of the m<sup>6</sup>A machinery identified by *in silico* analyses in the oyster compared to the fruit fly and human, (A) writer proteins; (B) eraser protein; (C) reader proteins. Putative domains involved in m<sup>6</sup>A processes are coloured (writers, green; eraser, red; readers, blue). Other domains identified but not involved in m<sup>6</sup>A processes are indicated in grey. Only one isoform is represented for each protein and each species for clarity (see Fig. S2 for other isoforms).

activate the catalytic subunit of the m<sup>6</sup>A-RNA methyltransferase complex. Oyster Hakai and RBM15/15B present RHHL, RHF-Zn-BS and specific RRM domains, respectively, similar to human and fruit fly orthologues. Besides, the oyster ZC3H13 bears the Rho SF domain present in the human, but not in the fruit fly orthologue (Fig. 2A).

*Crassostrea gigas* also presents a putative m<sup>6</sup>A-RNA eraser, ALKBH5, which is present in the human but has not been characterized in drosophila. The oyster ALKBH5 exhibits a 2OG-FeII\_Oxy domain suggestive of a presumably conserved catalytic functionality through Fe<sup>2+</sup>-dependent oxoglutarate oxidation. Of note, no orthologue of the human FTO eraser could be identified in the oyster genomic or transcriptomic databases available to date (Fig. 2B).

Many m<sup>6</sup>A reader orthologues have also been found in the oyster, including proteins containing a YTH domain, such as YTHDF, YTHDC1 and YTHDC2. An oyster Prrc2a-like protein produces homology with the human Prrc2a, especially within the m<sup>6</sup>A-binding GRE-rich domain. Oyster readers also include a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-coding gene,

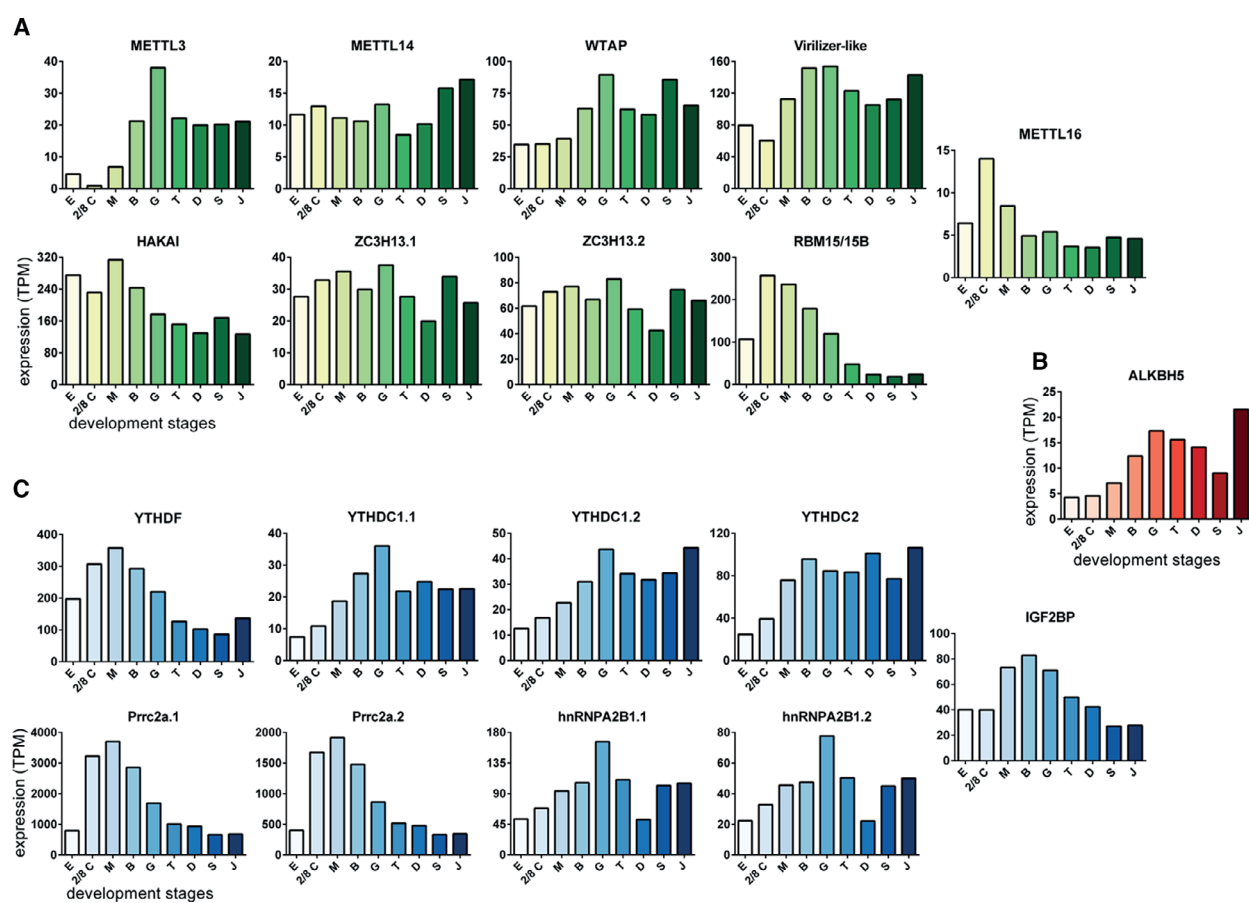
hnRNP A2B1, with greater sequence similarity with the drosophila counterpart than with the human orthologue. Similarly, the IGF2BP-coding sequence has also been found in *C. gigas* (Fig. 2C). Five oyster sequences display homologies with eIF3a which is able to bind m<sup>6</sup>A-RNA [5], but it was not possible to discriminate whether a unique oyster predicted protein was an eIF3a orthologue.

Overall, these results indicate the conservation of a complete m<sup>6</sup>A-RNA machinery in the oyster. The complete list of the identified genes encoding the conserved m<sup>6</sup>A machinery actors and their isoforms, as well as the related information, is given in the Data S1.

### Oyster putative m<sup>6</sup>A actors display expression level variations across development

RNA-Seq data analyses showed that all the oyster m<sup>6</sup>A-related genes were expressed during the early life (Fig. 3). Their expression level displayed gene-specific profiles, most of them being variable throughout oyster development.





**Fig. 3.** Gene expression of the putative m<sup>6</sup>A machinery throughout oyster development. Expression levels of writers (A), eraser (B) and readers (C) identified by *in silico* analysis at each development stage were inferred from the GigaTON database. Expression levels are given in transcripts per kilobase per million reads (TPM) as the mean of the GigaTON values according to the Table S2. E, egg; 2/8C, two- to eight-cells; M, morula; B, blastula; G, gastrula; T, trochophore; D, D-larvae; S, spat; J, juvenile.

The expression of writers belonging to the core methylation complex is weak overall. METTL3 and WTAP share similar profiles with little expression increasing up to the gastrulation and remaining stable afterwards. In contrast, METTL14 displays a weak expression level across the embryo-larval life. The expression profile of virilizer-like resembles WTAP, while HAKAI, RBM15/15B and METTL16 seem to have mRNA levels which decrease after cleavage, whereas those of ZC3H13 transcript variants seem to drop at the D larva stage. Interestingly, METTL16 mRNA levels display an opposite developmental profile when compared to METTL3 expression, with the highest values during cleavage which decrease later on (Fig. 3A).

ALKBH5 transcripts are weakly represented within oyster early embryos, and the higher TPM values are found in gastrulas. However, maximum levels are observed after metamorphosis in juveniles (Fig. 3B).

Regarding m<sup>6</sup>A putative readers, the expression of YTH family genes during development showed different patterns. In fact, YTHDF is the most represented YTH domain-bearing actor and YTHDF TPM values are ca. fivefold higher than all the other oyster YTH readers. YTHDF is strongly expressed at the beginning of development until a peak at the morula stage. Prrc2a is the most represented reader at the mRNA level in oyster embryos, and the sum of the TPM of the two Prrc2a oyster isoforms is at most ca. 20-fold higher than that of YTH family. However, Prrc2a and YTHDF transcript content profiles are similar across oyster development and also remind of the IGF2BP mRNA levels.

By contrast, the two isoforms of YTHDC1 identified by *in silico* analysis, YTHDC1.1 and YTHDC1.2, display similar patterns together with YTHDC2, with a maximum representation in gastrulas. The



expression of hnRNPA2B1 isoforms has likewise patterns except for a marked drop at the D-larvae stage (Fig. 3C).

### Oyster orthologues of m<sup>6</sup>A-RNA-interacting proteins bind m<sup>6</sup>A RNA *in vitro*

To determine whether oyster proteins can bind m<sup>6</sup>A-RNA, we performed RNA pull-down of cytoplasmic and nuclear embryonic cell extracts using a methylated versus a nonmethylated oligonucleotide, followed by LC/MS-MS characterization and identification of the captured proteins with the Mascot software.

In nuclear extracts, we detected 591 proteins able to bind both the methylated and unmethylated oligos. We identified 43 proteins specific to unmethylated RNA, while 131 proteins specifically bind the m<sup>6</sup>A-methylated oligo. In cytosolic extracts, there were 646, 436 and 36 of such proteins, respectively. Regardless of the methylation status, more proteins in the cytoplasmic extracts can bind to the RNA oligonucleotides than in the nuclear extracts (1118 vs. 765 proteins, respectively). However, more nuclear proteins are found exclusively bound to the m<sup>6</sup>A-containing oligo than cytoplasmic proteins (131 vs. 36, i.e. 17% vs. 3%, respectively). In addition, many nuclear and cytoplasmic proteins can bind both the methylated and the nonmethylated oligo (591 vs. 646, i.e. 77% vs. 58%). An important number of proteins in the cytoplasmic extract were found exclusively bound to the nonmethylated oligo, whereas only a limited number of nuclear proteins display such a specificity (436 vs. 43, i.e. 39% vs. 6%). Among the 167 m<sup>6</sup>A-specific proteins in oyster extracts, only 5 were found in both the nuclear and cytoplasmic extracts. These results show that oyster proteins can directly or indirectly bind m<sup>6</sup>A-RNA, and suggest an important compartmentalization of m<sup>6</sup>A-related processes.

Among the identified proteins in this assay, four of the putative oyster m<sup>6</sup>A readers are found, YTHDC1, hnRNPA2B1, IGF2BP and eIF3. In the nuclear extracts, YTHDC1 is uncovered as m<sup>6</sup>A-specific whereas hnRNPA2B1 and IGF2BP were present complexed with both the m<sup>6</sup>A- and A-oligos. In the cytoplasmic extracts, YTHDC1 and eIF3a are m<sup>6</sup>A-specific while hnRNPA2B1 and IGF2BP were pulled down by both methylated and unmethylated oligos (Fig. 4A).

These results demonstrate that some proteins in the oyster can specifically bind m<sup>6</sup>A-RNA and that the putative m<sup>6</sup>A reader orthologues in the oyster are conserved at the protein level and are able to interact with m<sup>6</sup>A-RNA.

### The m<sup>6</sup>A-interacting protein-coding genes display clustered expression regulation and functional annotation during oyster development

The mRNA expression level of the genes encoding the 162 oyster m<sup>6</sup>A-interacting protein (Cg-m<sup>6</sup>A-BPs) was examined using RNA-Seq databases. Most of them display a specific and regulated expression level across oyster developmental stages. However, three main expression clusters could be distinguished according to their developmental mRNA expression level profile. Cluster 1 includes genes that show high expression at the beginning of the embryo life (i.e. cleavage) and strongly decrease after gastrulation; the cluster 2 contains weakly expressed genes except in the latest examined larval phases, after gastrulation (i.e. trochophore and D-larvae); and cluster 3 groups genes that show an expression peak during gastrulation (Fig. 4B).

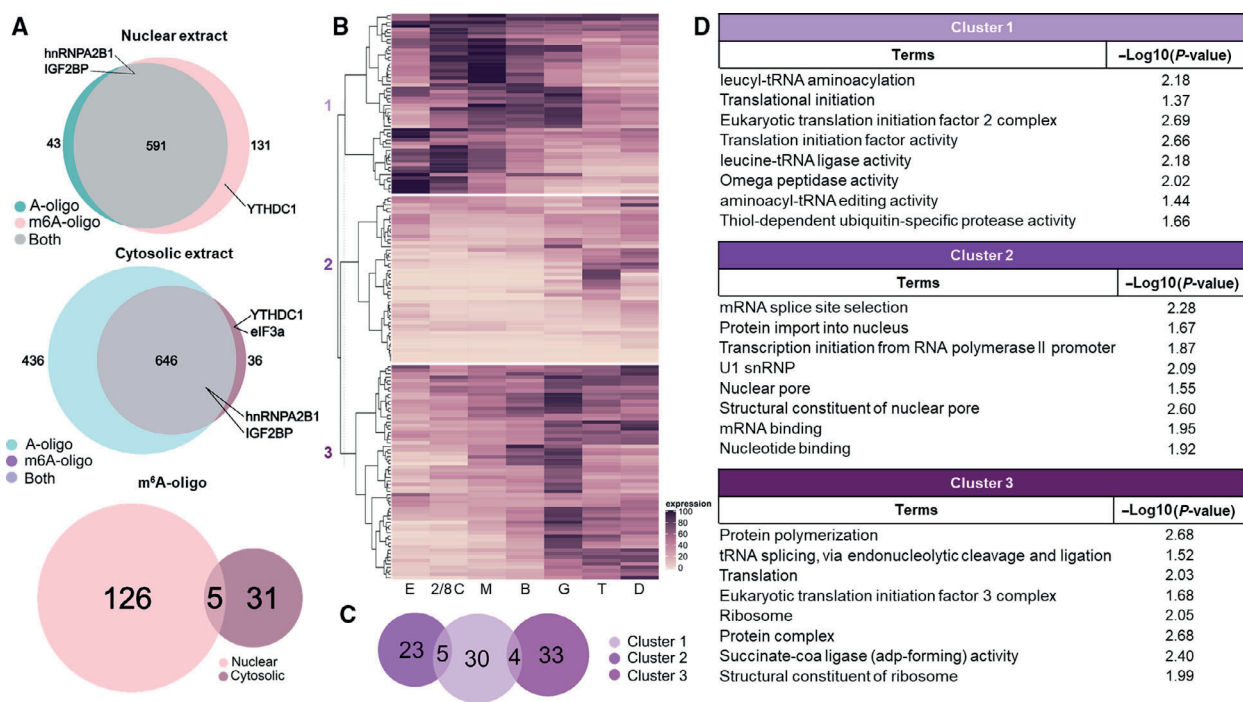
The Gene Ontology annotation of the Cg-m<sup>6</sup>A-BP genes reveals that the distinct clusters are related to distinct functional pathways as indicated by the little—if any—common GO terms between them (Fig. 4C). However, the functional pathways of all three gene clusters point out to their implication in translation and its regulation, although the terms enriched in each cluster illustrate different aspects of translation, such as translation initiation (cluster 1), splicing and nuclear export (cluster 2) and ribosomal and mitochondrial processes (cluster 3), respectively (Fig. 4D).

## Discussion

This work demonstrates that m<sup>6</sup>A-RNA is present and variable during the embryo-larval life of the oyster and that *C. gigas* exhibits putative conserved and functional m<sup>6</sup>A-RNA writers, eraser and readers. The dynamics of such mark and of its actors strongly suggest a biological significance of the epitranscriptomic pathway in the control of development of a lophotrochozoan species, which has, to date, never been demonstrated to our knowledge.

### m<sup>6</sup>A-RNA levels vary across oyster development

Using mass spectrometry and immunological measurements, we showed that oyster RNA is m<sup>6</sup>A-methylated. The global proportion of N<sup>6</sup>-methyladenosine in RNA in the developing oyster (0.28%) is similar to those observed elsewhere in the animal kingdom, such as in the fruit fly (0.24%) [34] or the human (0.11–0.23%) [55] (Fig. 1A), despite those values are difficult to compare because they were not measured within the same developmental phase (adult flies and human cell



**Fig. 4.** Characterization of m<sup>6</sup>A-RNA-binding proteins in oyster development. (A) Venn diagram representation of proteins bound to the A- and/or m<sup>6</sup>A-oligos in nuclear and cytosolic fractions of oyster embryo-larval stages. The number of proteins identified is indicated. Some actors characterized in this study are highlighted: eIF3, YTHC1, hnRNPA2B1 and IGF2BP. (B) Heatmap of gene expression levels of the proteins that bind specifically to the m<sup>6</sup>A-oligo throughout oyster development. The expression level is normalized regarding the maximum value for each gene according to the GigaTON database. (C) GO term distribution among the three expression clusters in B. (D) Examples of GO term enrichment within the expression clusters of the m<sup>6</sup>A-bound proteins. The -log<sub>10</sub>(P-value) associated with each term is given. E, egg; 2/8C: two- to eight-cells; M, morula; B, blastula; G, gastrula; T, trochophore; D, D-larvae; S, spat; J, juvenile.

lines vs. oyster embryos). However, the comparable magnitude of m<sup>6</sup>A-RNA amounts between taxa, in contrast to DNA methylation [46], may indicate conserved biological significance of epitranscriptomic processes between groups. The amount of m<sup>6</sup>A in total RNA displays a striking decrease during cleavage and then recovers its maximum levels at the end of the gastrulation (Fig. 1B). Therefore, the m<sup>6</sup>A decrease in total RNA during cleavage, that is before the transcription of the zygotic genome starts, reflects a degradation of maternal m<sup>6</sup>A-RNAs or their demethylation. However, all RNA populations do not exhibit the same pattern; indeed, polyA<sup>+</sup> RNAs are m<sup>6</sup>A methylated only after cleavage. The extent of polyadenylation of oyster maternal messenger RNAs accumulating during vitellogenesis is unknown. Therefore, which maternal RNA population(s) is methylated in oyster oocytes is unclear. Nevertheless, the observation that m<sup>6</sup>A-RNA levels are variable and affecting distinct RNA populations across embryonic stages strongly favours an important biological significance of m<sup>6</sup>A-

RNA in oyster development. We hypothesize that oyster maternal messenger RNAs are poorly polyadenylated and that m<sup>6</sup>A, aside polyadenylation, might play a role in the stability of quiescent maternal mRNAs. Alternatively, other maternal RNA populations such as snRNA, miRNA, rRNA or lncRNA might be methylated [6,15,25,56], which become demethylated or degraded up to the morula stage. The later increase in m<sup>6</sup>A RNA after cleavage could therefore be the result of the methylation of the increasingly transcribed RNAs from the blastula stage, including polyadenylated mRNAs.

### The m<sup>6</sup>A-RNA machinery is conserved in the oyster and regulated during development

The important regulation of m<sup>6</sup>A levels during oyster development assumes the presence of a related protein machinery. We identified *in silico* cDNA sequences encoding conserved putatively functional orthologues of m<sup>6</sup>A-RNA writers, eraser and readers in the oyster,

with great confidence (homologies ranging from ca. 30% to 65% with their human counterpart, see Data S1). The writers include all the members of the methylation complex (METTL3, METTL14, WTAP, virilizer-like, Hakai, ZC3H13, RBM15/15B) identified to date in the human and the fruit fly [7,8,11,12,14,15]. We also identified an orthologue of the stand-alone METTL16 m<sup>6</sup>A methyltransferase. Each orthologue bears the conserved domain(s) demonstrated to be implicated in the catalytic and/or binding activity of their cognate counterpart in other species, such as the MT-A70 domain which transfers methyl groups from the S-adenosyl-methionine (SAM) to the N<sup>6</sup> nitrogen of RNA adenines [8]. Of the two proteins that can erase RNA methylation, only ALKBH5, which is important for mouse spermatogenesis [16], was identified at the cDNA level in the oyster. Indeed, no *C. gigas* sequence displayed significant homology with the mammalian FTO protein, whose functional significance remains controversial [17]. Most of the characterized m<sup>6</sup>A-RNA readers are also present at the molecular level in the oyster and are putatively able to bind m<sup>6</sup>A regarding their primary sequence, such as the YTHDC and YTHDF family members [19,21,23,57], Prrc2A [27], HnRNPA2B1 [25] and IGF2BP [26]. Of note, some of these readers have not been characterized to date in *D. melanogaster* but display strong homologies between humans and oysters. In mammals, eIF3a has important functional outcomes in cap-independent translational stress response [5]. However, it was not possible to ascribe a single oyster sequence as a unique eIF3a orthologue (Data S1), although its presence was demonstrated by RNA pull-down (see below) (see Data S2). Altogether, *in silico* results show the conservation of a complete m<sup>6</sup>A-RNA machinery in the oyster. To date to our knowledge, this is the first demonstration in a lophotrochozoan organism of an epitranscriptomic pathway. Its presence suggests its ancestral origin and questions its biological significance in oyster development.

To investigate this, we analysed the expression level of the m<sup>6</sup>A machinery genes using RNA-Seq data. Our results indicate that the core methylation complex (METTL3, METTL14 and WTAP) would not be active during cleavage because of the absence of METTL3 and little WTAP expression. METTL16 catalyses the downregulation of SAM methyl donor availability in mammals [58]. If METTL16 function is conserved in the oyster as suggested by the high sequence homology, the peak in METTL16 expression, together with the weak expression of the core complex in 2/8 cell embryos, is consistent with an absence of m<sup>6</sup>A-RNA up to the blastula stage. Then, the core

complex would likely be active as soon as the end of cleavage (i.e. since the blastula stage), in line with the increase in m<sup>6</sup>A levels observed at the same time. The correlation between the increasing METTL3 expression and m<sup>6</sup>A-RNA levels after cleavage strongly favours the conservation of the methyltransferase activity of the oyster MT-A70 domain. Interpreting the regulation of the m<sup>6</sup>A activity by the other methyltransferase complex members (i.e. virilizer-like, HAKAI, ZC3H13 and RBM15/15B) is difficult because how—or even if—oyster orthologues act within the complex is not known. Nevertheless, their specific expression profiles may reflect their implication in the regulation of distinct biological contexts. There might be little functional significance of active m<sup>6</sup>A-RNA erasure during oyster development, consistent with the normal embryonic phenotype of ALKBH5 knockdown mice [16]. Overall, the m<sup>6</sup>A readers display distinct developmental expression patterns. While YTHDF and Prrc2a peak during cleavage, YTHDC1, YTHDC2, IGF2BP and hnRNPA2B1 mRNA levels gradually increase up to the gastrulation and remain mostly highly expressed afterwards (except for hnRNPA2B1 and IGF2BP). These profiles evoke the mediation of distinct biological functions depending on the reader and the developmental phases. Therefore, we hypothesized that YTHDF and Prrc2a might participate in the blastulean transition in the oyster. Indeed, in the zebrafish, a YTHDF reader triggers the maternal-to-zygotic transition through the decay of the maternal m<sup>6</sup>A RNAs during cleavage [33]. The role in the axon myelination and specification of mouse oligodendrocytes [27] is unlikely conserved for Prrc2a because the oyster orthologue is expressed before the neurogenesis is detected in trochophore stages [59]. Alternatively, the early expression of Prrc2a suggests that it might rather compete with YTHDF for m<sup>6</sup>A-RNA targets [27], thereby possibly acting in oyster MZT, bringing new perspectives into this process which remains poorly understood in lophotrochozoans. In mammals, m<sup>6</sup>A is implicated in the embryonic cell fate [30,31] notably via the regulation of cell differentiation by YTHDC2 [32] or hnRNPA2B1 [29]. In the oyster, YTHDC1, YTHDC2, IGF2BP and hnRNPA2B1 have their maximum expression during gastrulation correlated to the second m<sup>6</sup>A peak, suggesting similar implications.

### Putative oyster m<sup>6</sup>A readers actually bind m<sup>6</sup>A-RNA *in vitro*

To better approach the developmental processes involving m<sup>6</sup>A in the oyster, we characterized the

proteins that can interact with m<sup>6</sup>A-RNA using a methylated RNA pull-down/mass spectrometry assay. We identified 162 proteins able to specifically bind the m<sup>6</sup>A-RNA oligo in embryonic cell extracts, demonstrating the actual presence of genuine m<sup>6</sup>A readers in the oyster. Most (ca. 75%) of these proteins were found in nuclear extracts and only 5 were found in both the cytoplasmic and nuclear fractions, showing an important compartmentalization of the epitranscriptomic pathway. Regarding the little number of m<sup>6</sup>A readers in other animals, and because the assay conditions do not discriminate between direct and indirect interactions, we hypothesize that most of these proteins indirectly bind m<sup>6</sup>A via a limited number of 'scaffold' m<sup>6</sup>A readers. Such authentic readers that only bind the m<sup>6</sup>A-RNA oligo in our assay likely include YTHDC1 and eIF3a, which have been demonstrated to directly bind m<sup>6</sup>A in other species, demonstrating the conservation of the m<sup>6</sup>A-binding capacity and specificity of the YTH domain in the oyster. Besides, YTHDC1 is found in both cell fractions, suggesting its implication in the trafficking of m<sup>6</sup>A-RNA across the nuclear envelope [24], and reinforcing the hypothesis that YTH proteins could participate in oyster MZT and cell differentiation. The presence of the oyster eIF3a in the cytoplasm is consistent with a conserved role in m<sup>6</sup>A-mediated translation processes, such as cap-independent translation [5].

### Possible functions of m<sup>6</sup>A-RNA in oyster development

We investigated the expression level and the functional annotation of the 162 genes encoding the m<sup>6</sup>A-interacting proteins across oyster early life. These genes can be clustered into three successive expression phases corresponding to three distinct functional pathways, which are independent albeit all mostly related to translation regulation. The cluster 1 is mostly expressed during the cleavage and the associated GO terms are related to the initiation of translation, consistent with maternal RNA consumption before MZT is complete and the zygotic genome becomes fully activated. The genes within cluster 3 show an expression peak during gastrulation. Their ontology terms evoke ribosomal and mitochondrial processes, the latter being required for energy supply and signalling integration during gastrulation [60-63]. The cluster 2 contains genes that peak after gastrulation and which are related to splicing and nuclear export. Such functional annotations are in line with a fine regulation of transcript variant translation within the distinct cell lineages in the three cell layers of the late embryos.

Taken together, our findings bring to light a possible implication of m<sup>6</sup>A in oyster development. First, during cleavage the decrease in m<sup>6</sup>A-RNA, the weak expression of methyltransferase complex genes, the maximum of YTHDF gene expression and the expression of Cg-m<sup>6</sup>A-BPs related to the initiation of the translation strongly suggest the implication of m<sup>6</sup>A in MZT in *C. gigas*. Second, the increasing m<sup>6</sup>A level during gastrula stage is correlated to the increase in methyltransferase complex gene expression. In addition, the increased RNA level of readers putatively related to cell differentiation and the peak of gene expression of Cg-m<sup>6</sup>A-BPs associated with ribosomal and mitochondrial processes support the hypothesis of a m<sup>6</sup>A implication in gastrulation. Finally, the highest m<sup>6</sup>A level at the trochophore stage, the gene expression of the methyltransferase complex and of readers associated with cell differentiation, as well as high RNA level of Cg-m<sup>6</sup>A-BPs related to splicing and nuclear export, are correlated with the fine cell differentiation taking place at this stage. However, inferring the biological significance of m<sup>6</sup>A in development from the indirect and incomplete functional annotation of the oyster genome is only limited. Characterization of the precise targets of m<sup>6</sup>A and how their individual methylation is regulated across development, for example, using high-throughput sequencing of precipitated m<sup>6</sup>A-RNA (MeRIP-seq), could be extremely relevant to better understand this issue. In addition, despite sequence conservation and binding ability of oyster actor orthologues strongly suggest functional conservation, future dedicated studies such as biochemical inhibition or gene inactivation could help demonstrate their genuine biological function. Besides, there seems to be an inverse correlation between m<sup>6</sup>A-RNA and 5mC-DNA levels during the considered oyster developmental window [46]. This may suggest an interplay between epigenetic and epitranscriptomic marks, possibly competing for methyl donor availability [58] or linked by histone epigenetic pathways [64,65].

Regarding the potential influence of the environment on m<sup>6</sup>A and the accumulation of RNA in oocytes, we are at present investigating our hypothesis that m<sup>6</sup>A may convey intergenerational epitranscriptomic inheritance of maternal life traits in the oyster. On an evolutionary perspective, the presence of a putatively fully conserved epitranscriptomic pathway in the oyster suggests that it was already present in the bilaterian common ancestor thereby favouring an important biological significance. Why *Drosophila* and *Caenorhabditis* seem to have lost specific m<sup>6</sup>A-RNA erasers could be related to a subfunctionalization of the DMAD [41] and NMAD-1 [42]. N<sup>6</sup>-methyladenine



DNA demethylase activity broadened towards RNA. However, more work is required to better understand the evo-devo implications of our results.

To conclude, in this work we report the discovery and characterization of a putatively complete epitranscriptomic pathway in a lophotrochozoan organism, the oyster *Crassostrea gigas*. This pathway includes the m<sup>6</sup>A mark in RNA and the actors of all the aspects of its regulation (writers, eraser and readers) which are conserved at the molecular level and putatively functional. We show that m<sup>6</sup>A levels are variable across oyster development and that m<sup>6</sup>A differentially affects distinct RNA populations. Expression levels of the related enzymatic machinery are consistent with the observed m<sup>6</sup>A level variations. We demonstrate the m<sup>6</sup>A binding capacity and specificity of putative oyster m<sup>6</sup>A readers in the cytoplasm and nucleus of embryolarval cells. These readers mediate distinct putative biological outcomes depending on the development stage considered. From these results, we hypothesize that early decay of maternal m<sup>6</sup>A RNA participates in maternal-to-zygotic transition during cleavage and that later *de novo* zygotic m<sup>6</sup>A methylation contributes to gastrulation and cell differentiation. This first characterization of an m<sup>6</sup>A-epitranscriptomic pathway in a lophotrochozoan organism, together with its potential implication in development, opens new perspectives on the evolution of epigenetic mechanisms and on the potential epitranscriptomic inheritance of environmentally induced life traits.

## Methods

### Animals

Broodstock oysters [66] and oyster embryos [46] were obtained at the IFREMER marine facilities (Argenton, France) as previously described. Briefly, gametes of mature broodstock oysters were obtained by stripping the gonads and filtering the recovered material on a 60- $\mu$ m mesh to remove large debris. Oocytes were collected as the remaining fraction on a 20- $\mu$ m mesh and spermatozoa as the passing fraction on a 20- $\mu$ m mesh. Oocytes were pre-incubated in 5 L of UV-treated and 1- $\mu$ m-filtered sterile sea water (SSW) at 21 °C until germinal vesicle breakdown. Fertilization was triggered by the addition of ca. 10 spermatozooids per oocyte. After the expulsion of the second polar body was assessed by light microscopy, embryos were transferred into 150-L tanks of oxygenated SSW at 21 °C. The development stages were determined by light microscopy observation. The stages collected were oocytes (E, immediately before sperm addition), fertilized oocytes (F E, immediately before transfer to 150-L tanks), two- to eight-cell embryos

(2/8C, ca. 1.5 h postfertilization (hpf)), morula (M, ca. 4 hpf), blastula (B, ca. 6 hpf), gastrula (G, ca. 10 hpf), trochophore (T, ca. 16 hpf) and D-larvae (D, ca. 24 hpf). For each development stage, 3 million embryos were collected as the remaining fraction on a 20- $\mu$ m mesh and centrifuged at 123 *g* for 5 min at room temperature. Supernatant was discarded, and samples of 1 million embryos were then snap-frozen in liquid nitrogen directly after resuspension in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (1 mL/10<sup>6</sup> embryos) and stored at –80 °C. Three distinct experiments were realized (February to May 2019) using the gametes of 126 to 140 broodstock animals, respectively.

### RNA extraction

#### Total RNA extraction

RNA was extracted using phenol–chloroform followed by affinity chromatography as previously described [67]. Briefly, embryos were ground in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) and RNA was purified using affinity chromatography (NucleoSpin RNA II Kit, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Potential contaminating DNA was removed by digestion with rDNase (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions for 15 min at 37 °C; then, RNA was purified using Beckman Coulter's solid-phase reversible immobilization (SPRI) paramagnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, paramagnetic beads and RNAs were mixed slowly and incubated for 5 min at room temperature followed by 2 min on a magnetic rack. Cleared supernatant was removed, and beads were washed three times with 70% ethanol. After 4 min of drying at room temperature, RNAs were mixed slowly with RNase-free water and incubated for 1 min at room temperature on the magnetic rack. Eluted total RNA was stored at –80 °C.

#### PolyA RNA enrichment

PolyA RNA was extracted from total RNA by oligo-dT affinity chromatography (NucleoTrap mRNA Kit, Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Briefly, up to 130  $\mu$ g of total RNAs was mixed with oligo-dT latex beads and incubated for 5 min at 68 °C then for 10 min at room temperature. After centrifugation (2000 *g* and then 11 000 *g*), the pellets were washed three times on the microfilter and dried by centrifugation at 11 000 *g* for 1 min. Finally, polyA + RNA was incubated with RNase-free water for 7 min at 68 °C then centrifuged at 11 000 *g* for 1 min. Eluted polyA + RNA was stored at –80 °C until needed.

Total and polyA-enriched RNA purity and concentrations were assayed by spectrophotometry (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

## m<sup>6</sup>A quantification by LC-MS/MS

### RNA hydrolysis

To generate nucleosides for quantification against standard curves, 5 µg of total RNA was denatured for 10 min at 70 °C followed by 10 min on ice and hydrolysed with 100 U nuclease S1 (50 U·µL<sup>-1</sup>, Promega, Madison, WI, USA) in nuclease S1 buffer (Promega) in a final reaction volume of 25 µL for 2 h at 37 °C under gentle shaking. Samples were then incubated with alkaline phosphatase buffer (Promega) for 5 min at room temperature, before 10 U alkaline phosphatase (Promega) was added and incubated further for 2 h at 37 °C under gentle shaking. Ten extra units of alkaline phosphatase was added after 1 h of incubation to complete the reaction. Finally, samples were centrifuged at 20 000 *g* for 10 min at 4 °C, and the supernatant containing digested total RNA was collected and kept at -20 °C before quantification.

### m<sup>6</sup>A quantification

The apparatus was composed of a NexeraX<sup>2</sup> UHPLC system coupled with LCMS-8030 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) mass spectrometer using an electrospray interface in positive mode. The column (1.7 µm, 100 × 3 mm) was a HILIC ACQUITY<sup>®</sup> Amide (Waters, Milford, MA, USA) maintained at 35 °C. The injection volume and run-to-run time were 3 µL and 10 min, respectively. The flow rate was set to 1 mL·min<sup>-1</sup>. Mobile phase was initially composed of a mixture of ammonium formate solution (10 mM) containing 0.2% (v/v) formic acid and 95% acetonitrile (ACN), and it was maintained for 1 min. Then, a linear gradient was applied to reach 83% ACN for 6 min. The composition returned to the initial conditions, and the column was equilibrated for 3 min.

The mass spectrometer was running in the multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode. LABSOLUTIONS 5.86 SP1 software (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to process the data. The desolvation temperature was 230 °C, source temperature was 400 °C, and nitrogen flows were 2.5 L·min<sup>-1</sup> for the cone and 15 L·min<sup>-1</sup> for the desolvation. The capillary voltage was +4.5 kV. For each compound, two transitions were monitored from the fragmentation of the [M + H]<sup>+</sup> ion. The first transition (A in Table S1) was used for quantification and the second one (B in Table S1) for confirmation of the compound according to European Commission Decision 2002/657/EC (Table S1).

Blank plasma samples were analysed to check specificity. Calibrators were prepared using diluted solutions of A (Toronto Research Chemical, Toronto, Canada) and m<sup>6</sup>A (Carbosynth, Berkshire, UK) in water at 1, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 ng·mL<sup>-1</sup>. The calibration curves were drawn by plotting the ratio of the peak area of A and m<sup>6</sup>A. For both nucleosides, a quadratic regression with 1/C weighting

resulted in standard curves with  $R^2 > 0.998$  and more than 75% of standards with back-calculated concentrations within 15% of their nominal values as recommended for by the European Medicines Agency for bioanalytical methods [68]. The limits of quantifications for both compounds were considered as the lowest concentrations of the calibration curve.

m<sup>6</sup>A/A ratios were calculated for each single sample using the determined concentrations. Final results are the average of three technical replicates.

### m<sup>6</sup>A quantification by immunoblotting

Immunological quantification of m<sup>6</sup>A was performed by dot blot using total and polyA + RNAs. Dogfish total RNA (A. Gautier, personal communication) and a synthetic unmethylated RNA oligo (Eurogentec, Liege, Belgium) were used as positive and negative controls, respectively. RNA samples were denatured for 15 min at 55 °C with gentle shaking in denaturing solution (2.2 M formaldehyde, 50% formamide, 0.5X MOPS, DEPC water) followed by 2 min on ice. Blotting was performed on a vacuum manifold as follows: a nylon membrane (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare life Sciences, Chicago, IL, USA) was prehydrated in DEPC water for 5 min; then, each well was washed twice with 10X SSC (Sigma-Aldrich) before RNA was spotted onto the membrane and incubated for 15 min at room temperature. Then, vacuum aspiration was applied and each well was washed twice with 10X SSC. After heat cross-linking for 2 h at 70 °C, the membrane was rehydrated with DEPC water for 5 min, washed with PBS and then PBST (PBS, 0.1% Tween-20) for 5 min each and blocked with two 5-min incubations with blocking buffer (PBS, 0.1% Tween-20, 10% dry milk, 1% BSA) at room temperature. The blocked membrane was incubated overnight at 4 °C under gentle shaking with the anti-m<sup>6</sup>A primary antibody (Total RNA: Millipore (Burlington, MA, USA) ABE572, 1: 1000 dilution in blocking buffer; polyA + RNA: Diagenode (Liege, Belgium) C15200082, 1: 500 dilution in blocking buffer) followed by four washes of PBST for 5 min. The secondary antibody (Total RNA: Dako (Santa Clara, CA, USA) P0447 goat anti-mouse HRP antibody, 1: 10 000 dilution; polyA + RNA: Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) A21202 donkey anti-mouse Alexa 488, 1: 250 dilution) was diluted in PBST supplemented with 5% dry milk and added onto the membrane for 1 h 30 min (total RNA) or 1 h (polyA + RNA) at room temperature under gentle shaking. Membranes were extensively washed in PBST (at least 4 washes of 5 min for total RNA and 5 min and then 1 h for polyA + RNA); then, total and polyA + RNA immunoblots were visualized using chemiluminescence (ECL kit, Promega) or fluorescence scanning at 480–530 nm (ProXPRESS, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), respectively. The amount of m<sup>6</sup>A was inferred from dot intensity

measurements using IMAGEJ (v.1.49) (<https://Imagej.net>). Signal intensities were determined as ‘integrated densities as a percentage of the total’ which corresponds to the area under the curve of the signal of each dot after membrane background and negative control signal subtraction.

### **In silico analyses**

All protein and RNA sequences of the m<sup>6</sup>A machinery of *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster* (Data S1) were recovered by their published designation (i.e. ‘METTL3’ or ‘YTHDF’) and their identified protein sequence (i.e. RefSeq accession number NP) collected from NCBI and used as query sequences to search for putative homologue sequences in *Crassostrea gigas* databases. The presence of oyster orthologue RNA and protein sequences was investigated by reciprocal BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) on the *Crassostrea gigas* GigaTON [69] and NCBI databases, and results were compared between the two oyster databases. Domain prediction was performed with CD search software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) with default settings on protein sequences of *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* and *Crassostrea gigas*. The GRE-rich domain identified in vertebrate Prrc2a sequence [27] was performed with ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>).

### **Protein machinery mRNA expression analyses**

The transcriptome data of the different development stages are available on the GigaTON database [69,70]. The correspondence between development stages in our study and the GigaTON database were assessed using light microscopy based on the morphological description by Zhang *et al.* [70] (Table S2). Expression data were expressed in TPM (transcripts per kilobase per million reads) [71] to provide a normalized comparison of gene expression between all samples. The actual presence of some transcripts that display unclear or chimeric sequences within available oyster databases was assessed using RT-PCR (Data S1).

### **Protein m<sup>6</sup>A RNA pull-down**

#### **Protein extraction and RNA affinity chromatography**

Protein extraction and RNA affinity chromatography were performed as described previously [27] with some modifications as follows. Equal amounts (1 million individuals) of each developmental stage (oocyte to D-larvae) were pooled together then homogenized in 3.5 volumes of buffer A (10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.9, DEPC water, 1X protease inhibitor cocktail, DTT 0.5 mM) by extensive pipetting (ca. 30 times) and incubated for 10 min at 4 °C. Embryos were ground with 10 slow 23-G

needle syringe strokes and centrifuged at 500 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was diluted in 0.11 volume of buffer B (1.4 M KCl, 0.03 M MgCl<sub>2</sub>, HEPES 0.3 M, pH 7.9, DEPC water), centrifuged at 10 000 g for 1 h at 4 °C, and the supernatant containing cytosolic proteins was stored at –80 °C. The pellet of the first centrifugation, containing nuclei, was resuspended in two volumes of buffer C (0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, water DEPC). Nuclei were then lysed with a 23-G needle (10 vigorous syringe strokes) followed by centrifugation at 25 000 g for 30 min at 4 °C, and the supernatant containing nuclear proteins was stored at –80 °C.

To identify putative proteins able to bind m<sup>6</sup>A-RNA, the cytosolic and nuclear fractions were submitted to affinity chromatography using 5'-biotin-labelled RNA oligonucleotides either bearing N<sup>6</sup>-methylated adenosines or not. The methylated adenosines were designed to lie within RRACH motifs, according to the conserved methylated consensus sequence in other organisms [2,3,7,33,72] (oligo-m<sup>6</sup>A: 5'Biotin-AGAAAAGACAACCAACGAGRR-m<sup>6</sup>A-CWCAUCAU-3'; oligo-A: 5'Biotin-AGAAAAGACAACCAACGAGRRACWCAUCAU-3', R = A or G, W = A or U, Eurogentec).

For RNA pull-down, streptavidin-conjugated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin, Invitrogen) were preblocked with 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> tRNA (Sigma-Aldrich) and 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> BSA for 1 h at 4 °C under gentle rotation followed by three washes with 0.1 M NaCl. To avoid the identification of nontarget proteins, cytosolic and nuclear protein extracts were cleared with preblocked magnetic beads in binding buffer (50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 0.1% NP-40, DEPC water, 1 mM DTT, 0.4 U·μL<sup>-1</sup> RNAsin) for 1 h at 4 °C under gentle rotation. After incubation on magnetic rack, the supernatants containing putative target proteins were collected and mixed with preblocked magnetic beads and oligo-m<sup>6</sup>A or oligo-A for 2 h at 4 °C under gentle rotation. The beads binding putative target proteins were washed three times with binding buffer and diluted in 50 mM ammonium bicarbonate.

### **Identification of m<sup>6</sup>A-binding proteins by LC-MS/MS**

Protein samples were first reduced, alkylated and digested with trypsin then desalted and concentrated onto a μC18 Omix (Agilent, Santa Clara, CA, USA) before analysis.

The chromatography step was performed on a nanoElute (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) ultra-high-pressure nanoflow chromatography system. Peptides were concentrated onto a C18 PepMap 100 (5 mm × 300 μm i.d.) pre-column (Thermo Scientific) and separated at 50 °C onto a reversed-phase Reprosil column (25 cm × 75 μm i.d.) packed with 1.6 μm C18-coated porous silica beads (Ionopticks, Parkville, Vic., Australia). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% formic

acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 400 nL·min<sup>-1</sup>, and the gradient profile was as follows: from 2% to 15% B within 60 min, followed by an increase to 25% B within 30 min and further to 37% within 10 min, followed by a washing step at 95% B and re-equilibration.

MS experiments were carried out on an TIMS-TOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a modified nano-electrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). The system was calibrated each week, and mass precision was better than 1 ppm. A 1600 spray voltage with a capillary temperature of 180 °C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the mass range from 100 to 1700 m/z. In the experiments described here, the mass spectrometer was operated in PASEF mode with exclusion of single-charged peptides. A number of 10 PASEF MS/MS scans were performed during 1.16 s from charge range 2–5.

The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using the MASCOT 2.6.1 program (Matrix Science, London, UK) with a *Crassostrea gigas* UniProt database (including 25 982 entries). The variable modifications allowed were as follows: C-carbamidomethylation, K-acetylation, methionine oxidation and deamidation (NQ). The 'Trypsin' parameter was set to 'Semispecific'. Mass accuracy was set to 30 ppm and 0.05 Da for MS and MS/MS mode, respectively. Mascot data were then transferred to Proline validation software (<http://www.profi-proteomics.fr/proline/>) for data filtering according to a significance threshold of < 0.05 and the elimination of protein redundancy on the basis of proteins being evidenced by the same set or a subset of peptides (Data S2).

### Gene ontology analysis

The mRNA sequences of the characterized m<sup>6</sup>A-binding proteins were identified using TBLASTN [73–75] against the GigaTON database [69] with default settings. Gene ontology (GO) analyses were carried out with the GO annotations obtained from GigaTON database gene universe [69]. GO term enrichment tests were performed using the GOSEQ (V1.22.0) R package [76] with *P*-values calculated by the Wallenius method and filtered using REVIGO [77]. GO terms with a *P*-value < 0.05 were considered significantly enriched (Data S3).

### Statistical analyses and graph production

Results are given as the mean ± SD of three independent experiments unless otherwise stated. They were analysed using one-way ANOVA or Kruskal–Wallis tests when required, depending on the normality of result distribution. The normality was tested using the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity of variances with Bartlett's tests. Statistics and graphics were computed with PRISM v.6 (GraphPad), R

(v.3.6.1) and RSTUDIO (v.1.0.153) softwares. The R packages *eulerr* [78] and *Complexheatmap* [79] were used for production of specific figures.

### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge PRISMM core facility collaborators R. Delepée and S. Lagadu for their expertise in m<sup>6</sup>A/A UHPLC-MS/MS quantification. We also thank J. Pontin for technical assistance and J. Le Grand for help with sampling. This work was supported by the French national programme CNRS EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière 'HERITAGE' to G. Rivière) and the Council of the Normandy Region (RIN ECUME to P. Favrel).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

GR and LLF designed the experiment. LLF, GR, BB, BP and MS involved in benchwork and bioinformatics. LLF, GR, BB and MS analysed the data. LLF, GR, PF, BB, MS and BP wrote and edited the manuscript.

### References

- Saletore Y, Meyer K, Korlach J, Vilfan ID, Jaffrey S & Mason CE (2012) The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome Biol* **13**, 175.
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE & Jaffrey SR (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* **149**, 1635–1646.
- Dominissini D, Moshitch-moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-hirsch J, Amariglio N, Kupiec M *et al.* (2012) Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq. *Nature* **485**, 201–206.
- Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, Haripal B, Zucker-Scharff I, Moore MJ, Park CY *et al.* (2015) A majority of m<sup>6</sup>A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev* **29**, 2037–2053.
- Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian SB & Jaffrey SR (2015) 5' UTR m<sup>6</sup>A promotes cap-independent translation. *Cell* **163**, 999–1010.
- Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP & Conrad NK (2017) The U6 snRNA m<sup>6</sup>A



- methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell* **169**, 824–835.e14.
- 7 Lence T, Akhtar J, Bayer M, Schmid K, Spindler L, Ho CH, Kreim N, Andrade-Navarro MA, Poeck B, Helm M & *et al.* (2016) m<sup>6</sup>A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature* **540**, 242–247.
  - 8 Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG & Rottman FM (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N<sup>6</sup>-adenosine)-methyltransferase. *RNA* **3**, 1233–1247.
  - 9 Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu YY, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X *et al.* (2013) A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nat Chem Biol* **10**, 93–95.
  - 10 Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, Gong Z, Wang Q, Huang J, Tang C *et al.* (2016) Structural basis of N<sup>6</sup>-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature* **534**, 575–578.
  - 11 Ping X-LL, Sun B-FF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang W-JJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen Y-SS *et al.* (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res* **24**, 177–189.
  - 12 Yue Y, Liu J, Cui X, Cao J, Luo G, Zhang Z, Cheng T, Gao M, Shu X, Ma H *et al.* (2018) VIRMA mediates preferential m<sup>6</sup>A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov* **4**, 10.
  - 13 Růžicka K, Zhang M, Campilho A, Bodi Z, Kashif M, Saleh M, Eeckhout D, El-Showk S, Li H, Zhong S *et al.* (2017) Identification of factors required for m<sup>6</sup>A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol* **215**, 157–172.
  - 14 Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, Carl SH, Masiello I, Hares T, Villaseñor R, Hess D *et al.* (2018) Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m<sup>6</sup>A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev* **32**, 1–15.
  - 15 Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M & Jaffrey SR (2016) m<sup>6</sup>A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* **537**, 369–373.
  - 16 Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH *et al.* (2013) ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell* **49**, 18–29.
  - 17 Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur J-J, Chen Q *et al.* (2017) Reversible methylation of m<sup>6</sup>A in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* **541**, 371–375.
  - 18 Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang YGYY-GGYY-G, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YGYY-GGYY-G & *et al.* (2011) N<sup>6</sup>-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* **7**, 885–887.
  - 19 Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G *et al.* (2014) N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **505**, 117–120.
  - 20 Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H & He C (2015) N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* **161**, 1388–1399.
  - 21 Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y, Qi M, Lu Z, Shi H, Wang J *et al.* (2017) Ythdc2 is an N<sup>6</sup>-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res* **27**, 1115–1127.
  - 22 Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C & He C (2017) YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res* **27**, 315–328.
  - 23 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen Y-S, Hao Y-J, Sun B-F, Sun H-Y, Li A, Ping X-L, Lai W-Y *et al.* (2016) Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell* **61**, 507–519.
  - 24 Roundtree IA, Luo G-ZZ, Zhang Z, Wang X, Zhou T, Cui Y, Sha J, Huang X, Guerrero L, Xie P *et al.* (2017) YTHDC1 mediates nuclear export of N<sup>6</sup>-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife* **6**, 1–28.
  - 25 Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie SFSSF & Tavazoie SFSSF (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m<sup>6</sup>A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell* **162**, 1299–1308.
  - 26 Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, Zhao BS, Mesquita A, Liu C, Yuan CL *et al.* (2018) Recognition of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol* **20**, 285–295.
  - 27 Wu R, Li A, Sun B, Sun J-GG, Zhang J, Zhang T, Chen Y, Xiao Y, Gao Y, Zhang Q *et al.* (2018) A novel m<sup>6</sup>A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination. *Cell Res* **29**, 23–41.
  - 28 Bertero A, Brown S, Madrigal P, Osnato A, Ortmann D, Yiangou L, Kadiwala J, Hubner NC, De Los Mozos IR, Sadee C *et al.* (2018) The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m<sup>6</sup>A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* **555**, 256–259.
  - 29 Kwon J, Jo YJ, Namgoong S & Kim NH (2019) Functional roles of hnRNPA2/B1 regulated by METTL3 in mammalian embryonic development. *Sci Rep* **9**, 8640.
  - 30 Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, Mansour AAF, Kol N, Salmon-Divon M, Hershkovitz V, Peer E, Mor N, Manor YS *et al.* (2015) m<sup>6</sup>A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science* **347**, 1002–1006.

- 31 Batista PJ, Molinie B, Wang J, Qu K, Zhang J, Li L, Bouley DM, Lujan E, Haddad B, Daneshvar K *et al.* (2014) M<sup>6</sup>A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **15**, 707–719.
- 32 Wojtas MN, Pandey RR, Mendel M, Homolka D, Sachidanandam R & Pillai RS (2017) Regulation of m<sup>6</sup>A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell* **68**, 374–387.e12.
- 33 Zhao BS, Wang X, Beadell AV, Lu Z, Shi H, Kuuspalu A, Ho RK & He C (2017) M<sup>6</sup>A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* **542**, 475–478.
- 34 Kan L, Grozhik AV, Vedanayagam J, Patil DP, Pang N, Lim K-S, Huang Y-C, Joseph B, Lin C-J, Despici V *et al.* (2017) The m<sup>6</sup>A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nat Commun* **8**, 15737.
- 35 Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, Leu NA, Xu Y, Gregory BD, Schultz RM & Wang PJ (2018) Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet* **14**, 1–28.
- 36 Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, Azzi C, Morgan M, Moreira PN, Monahan J, Carrieri C, Enright AJ, O'Carroll D *et al.* (2017) The RNA m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *Mol Cell* **67**, 1059–1067.e4.
- 37 Lence T, Paolantoni C, Worpenberg L & Roignant JY (2019) Mechanistic insights into m<sup>6</sup>A RNA enzymes. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1862**, 222–229.
- 38 Balacco DL & Soller M (2018) The m<sup>6</sup>A writer: rise of a machine for growing tasks. *Biochemistry* **58**, 363–378.
- 39 Lence T, Soller M & Roignant JY (2017) A fly view on the roles and mechanisms of the m<sup>6</sup>A mRNA modification and its players. *RNA Biol* **14**, 1232–1240.
- 40 Robbens S, Rouzé P, Cock JM, Spring J, Worden AZ & Van De Peer Y (2008) The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *J Mol Evol* **66**, 80–84.
- 41 Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J *et al.* (2015) N<sup>6</sup>-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* **161**, 893–906.
- 42 Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizábal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C & Shi Y (2015) DNA methylation on N<sup>6</sup>-adenine in *C. elegans*. *Cell* **161**, 868–878.
- 43 Riviere G, He Y, Tecchio S, Crowell E, Sourdain P, Guo X & Favrel P (2017) Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet* **13**, 1–16.
- 44 Sussarellu R, Lebreton M, Rouxel J, Akcha F, Riviere G & Rivière G (2018) Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat Toxicol* **196**, 70–78.
- 45 Rondon R, Grunau C, Fallet M, Charlemagne N, Sussarellu R, Chaparro C, Montagnani C, Mitta G, Bachère E, Akcha F & *et al.* (2017) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environ Epigenet* **3**, 1–13.
- 46 Riviere G, Wu G-CC, Fellous A, Goux D, Sourdain P & Favrel P (2013) DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. *Mar Biotechnol* **15**, 1–15.
- 47 Saint-Carlier E & Riviere G (2015) Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Lett* **589**, 1459–1466.
- 48 Fellous A, Favrel P & Riviere G (2015) Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Genomics* **19**, 23–30.
- 49 Fellous A, Favrel P, Guo X & Riviere G (2014) The Jumonji gene family in *Crassostrea gigas* suggests evolutionary conservation of Jmj-C histone demethylases orthologues in the oyster gametogenesis and development. *Gene* **538**, 164–175.
- 50 Fellous A, Le Franc L, Jouaux A, Goux D, Favrel P & Rivière G (2019) Histone methylation participates in gene expression control during the early development of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genes (Basel)* **10**, 695.
- 51 Zhou J, Wan J, Gao X, Zhang X, Jaffrey SR & Qian S-B (2015) Dynamic m<sup>6</sup>A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* **526**, 591–594.
- 52 Lu Z, Ma Y, Li Q, Liu E, Jin M, Zhang L & Wei C (2019) The role of N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*). *Cell Stress Chaperones* **24**, 333–342.
- 53 Xiang Y, Laurent B, Hsu C, Nachtergaele S, Lu Z, Sheng W, Xu C, Chen H, Ouyang J, Wang S *et al.* (2017) m<sup>6</sup>A RNA methylation regulates the UV-induced DNA damage response. *Nature* **543**, 573–576.
- 54 Cayir A, Barrow TM, Guo L & Byun HM (2019) Exposure to environmental toxicants reduces global N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes. *Environ Res* **175**, 228–234.
- 55 Liu J, Li K, Cai J, Zhang M, Zhang X, Xiong X, Meng H, Xu X, Huang Z, Fan J & *et al.* (2020) Landscape and regulation of M<sup>6</sup>A and M<sup>6</sup>Am methylome across human and mouse tissues. *Mol Cell* **77**, 426–440.
- 56 Ren W, Lu J, Huang M, Gao L, Li D, Greg Wang G & Song J (2019) Structure and regulation of ZCCHC4 in m<sup>6</sup>A-methylation of 28S rRNA. *Nat Commun* **10**, 5042.

- 57 Theler D, Dominguez C, Blatter M, Boudet J & Allain FHT (2014) Solution structure of the YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA. *Nucleic Acids Res* **42**, 13911–13919.
- 58 Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T & Igarashi K (2017) S-adenosylmethionine synthesis is regulated by selective N6-adenosine methylation and mRNA degradation involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep* **21**, 3354–3363.
- 59 Yurchenko OV, Skiteva OI, Voronezhskaya EE & Dyachuk VA (2018) Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia). *Front Zool* **15**, 1–21.
- 60 Ratnaparkhi A (2013) Signaling by folded gastrulation is modulated by mitochondrial fusion and fission. *J Cell Sci* **126**, 5369–5376.
- 61 Ren L, Zhang C, Tao L, Hao J, Tan K, Miao K, Yu Y, Sui L, Wu Z, Tian J & *et al.* (2017) High-resolution profiles of gene expression and DNA methylation highlight mitochondrial modifications during early embryonic development. *J Reprod Dev* **63**, 247–261.
- 62 Prudent J, Popgeorgiev N, Bonneau B, Thibaut J, Gadet R, Lopez J, Gonzalo P, Rimokh R, Manon S, Houart C *et al.* (2013) Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish. *Nat Commun* **4**, 2330.
- 63 Dumollard R, Duchen M & Carroll J (2007) The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* **77**, 21–49.
- 64 Huang H, Weng H, Zhou K, Wu T, Zhao BS, Sun MM, Chen Z, Deng X, Xiao G, Auer F *et al.* (2019) Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m<sup>6</sup>A RNA modification co-transcriptionally. *Nature* **567**, 414–419.
- 65 Wang Y, Li Y, Yue M, Wang J, Kumar S, Wechsler-Reya RJ, Zhang Z, Ogawa Y, Kellis M, Duester G & *et al.* (2018) N 6-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci* **21**, 195–206.
- 66 Petton B, Pernet F, Robert R & Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* **3**, 257–273.
- 67 Riviere G, Fellous A, Franco A, Bernay B & Favrel P (2011) A crucial role in fertility for the oyster angiotensin-converting enzyme orthologue CgACE. *PLoS One* **6**, e27833.
- 68 EMA (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
- 69 Riviere G, Klopp C, Ibouniyamine N, Huvet A, Boudry P & Favrel P (2015) GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics* **16**, 1–12.
- 70 Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wu F, Chen Y *et al.* (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54.
- 71 Li B, Ruotti V, Stewart RM, Thomson JA & Dewey CN (2010) RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty. *Bioinformatics* **26**, 493–500.
- 72 Qi ST, Ma JY, Wang ZB, Guo L, Hou Y & Sun QY (2016) N6 -methyladenosine sequencing highlights the involvement of mRNA methylation in oocyte meiotic maturation and embryo development by regulating translation in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **291**, 23020–23026.
- 73 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- 74 Cock PJA, Chilton JM, Grüning B, Johnson JE & Soranzo N (2015) NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience* **4**, 39.
- 75 Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K & Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 1–9.
- 76 Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK & Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* **11**, R14.
- 77 Supek F, Bošnjak M, Škunca N & Šmuc T (2011) Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800.
- 78 Larsson J. (2019) eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses. R package version 6.1.0. <https://cran.r-project.org/package=eulerr>
- 79 Gu Z, Eils R & Schlesner M (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**, 2847–2849.

## Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Data S1.** Complete list of *in silico* identified putative m<sup>6</sup>A machinery proteins and their respective BLAST results.

**Data S2.** Identified proteins by RNA pull down coupled with mass spectrometry with m<sup>6</sup>A or A-oligo, in nuclear or cytosolic protein extracts.

**Data S3.** Complete list of GO terms of clustered genes of m<sup>6</sup>A interacting proteins (p-value < 0.05).

**Table S1.** Transitions used for each compound. A: first transition, B: second transition.

**Table S2.** Table of correspondence between development stages in our study, and the GigaTON database.

### 3. Supporting information

**Data S1**: Complete list of *in silico* identified putative m<sup>6</sup>A machinery proteins and their respective BLAST results

**Data S2**: Identified proteins by RNA pull down coupled with mass spectrometry with m<sup>6</sup>A or A-oligo, in nuclear or cytosolic protein extracts

**Data S3**: Complete list of GO terms of clustered genes of m<sup>6</sup>A interacting proteins (p-value<0,05)

**Table S1**: Transitions used for each compound. A: first transition, B: second transition

**Table S2**: Table of correspondence between development stages in our study, and the GigaTON database.

Data S1: Complete list of in silico identified putative m6A machinery proteins and their respective BLAST results

Probable assembly artefact highlighted in grey

Specie	database	sequence accession number	length	conserved domain
<b><u>METTL3</u></b>				
<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 21361827 (NP_062826.2)	580	MT-A70
<i>Drosophila melanogaster</i> (IME4)	NCBI	gi 21355141 (NP_651204.1)	608	MT-A70 MDN1
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_PHUM_PHUM423190.1.1	554	MT-A70
	NCBI	gi 762092209 (XP_011428532.1)	555	MT-A70
<b><u>METTL14</u></b>				
<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 24308265 (NP_066012.1)	456	MT-A70
<i>Drosophila melanogaster</i> (CG7818)	NCBI	gi 19920926 (NP_609205.1)	397	MT-A70
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_MET14.1.1	495	MT-A70 MttA_Hfc106
		CHOYP_LOC100743733.1.1	723	MT-A70 7tmA_NPR-like_invertebrate
	NCBI	gi 762082967 (XP_011424173.1)	470	MT-A70 MttA_Hfc106
<b><u>WTAP</u></b>				
<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 395455090 (NP_001257460.1)	396	WTAP
		gi 23199974 (NP_690596.1)	151	WTAP
		gi 395455092 (NP_001257461.1)	170	WTAP
<i>Drosophila melanogaster</i> (FL(2)D)	NCBI	gi 24653459 (NP_523732.2)	536	WTAP
		gi 24653461 (NP_725327.1)	412	WTAP
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_FL2D.1.1	406	WTAP IncA
		CHOYP_SODM.1.2	252	WTAP IncA
		CHOYP_LOC100121674.1.1	290	WTAP IncA
	NCBI	gi 762078268 (XP_011453082.1)	406	WTAP IncA

**VIRILIZER-LIKE**

<i>Homo sapiens</i> (Virilizer-like, VIRMA)	NCBI	gi 33946282 (NP_056311.2)	1812	VIR_N	
		gi 33946280 (NP_892121.1)	1147	VIR_N	
<i>Drosophila melanogaster</i> (Virilizer)	NCBI	gi 17864576 (NP_524900.1)	1854	VIR_N	
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_VIR.1.1	2021	VIR_N	
	NCBI	gi 762120202 (XP_011443024.1)	2023	VIR_N	
		gi 762120200 (XP_011443023.1)	2023	VIR_N	
		gi 1139822239 (XP_019927346.1)	2022	VIR_N	
		gi 1139822241 (XP_019927347.1)	2021	VIR_N	
		gi 1139822243 (XP_019927348.1)	1717	VIR_N	PTZ00249 super family

**HAKAI**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 209180481 (NP_079090.2)	491	RHF-Zn-BS	RHHL	
		gi 546230945 (NP_001271220.1)	490	RHF-Zn-BS	RHHL	
<i>Drosophila melanogaster</i>	NCBI	gi 19921556 (NP_609993.1)	302	RHF-Zn-BS	RHHL	
		gi 24585301 (NP_724217.1)	311	RHF-Zn-BS	RHHL	
		gi 442628448 (NP_788075.2)	464	RHF-Zn-BS	RHHL	
		gi 442628450 (NP_001260593.1)	473	RHF-Zn-BS	RHHL	
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_LOC100864501.1.1	504	RHF-Zn-BS	RHHL	PHA03247 super family
	NCBI	gi 762140345 (XP_011453340.1)	498	RHF-Zn-BS	RHHL	PHA03247 super family
		gi 762140347 (XP_011453341.1)	497	RHF-Zn-BS	RHHL	PHA03247 super family

**ZC3H13**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 1060099240 (NP_001317493.1)	1669	Zf-CCCH	Rho SF
		gi 1060099108 (NP_001317496.1)	1668	Zf-CCCH	Rho SF

		gij116008442 (NP_055885.3)	1564	Zf-CCCH	Rho SF		
<i>Drosophila melanogaster</i> (CG7358)	NCBI	gi 24643154 (NP_573339.1)	1150				
		gij665392303 (NP_001285418.1)	1139				
		gij665392305 (NP_001285419.1)	842				
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_BRAFLDRAFT_120702.1.1	1631	Zf-CCCH	Rho SF	dnaA super family	PTZ00121
		CHOYP_LOC100568158.1.1	1611	Zf-CCCH	Rho SF	dnaA super family	PTZ00121
	NCBI	gij762096734 (XP_011430912.1)	1400	Rho SF	dnaA super family	PTZ00121	
		gij762096736 (XP_011430913.1)	1400	Rho SF	dnaA super family	PTZ00121	
		gij762096738 (XP_011430914.1)	1380	Rho SF	PHA03307	PTZ00121	
		gij762096740 (XP_011430915.1)	1329	Rho SF	PTZ00121		

### RBM15/15B

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 47933339 (NP_073605)	977	RRM1_RBM15	RRM2_RBM15	RRM3_RBM15	SF-CC1	SPOC	
		gi 319996623 (NP_001188474)	969	RRM1_RBM15	RRM2_RBM15	RRM3_RBM15	SF-CC1	SPOC	
		gij54607124 (NP_037418)	890	RRM1_RBM15	RRM2_RBM15	RRM3_RBM15	U2AF_Ig SF	SPOC	
<i>Drosophila melanogaster</i> (SPENITO/NITO)	NCBI	gi 24586450 (NP_724633)	793	RRM1_Spen	RRM2_Spen	RRM3_Spen	RRM	SPOC	
		gij19921778 (NP_610339)	793	RRM1_Spen	RRM2_Spen	RRM3_Spen	RRM	SPOC	
		gij665399388 (NP_001286174)	793	RRM1_Spen	RRM2_Spen	RRM3_Spen	RRM	SPOC	
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_LOC663518.1.1	717	RRM1_Spen	RRM2_Spen	RRM3_Spen	RRM	SPOC	PTZ00449 SF
	NCBI	gij762129377 (XP_011447812)	717	RRM1_Spen	RRM2_Spen	RRM3_Spen	RRM	SPOC	PTZ00449 SF

### METTL16

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 122114654 (NP_076991.3)	562	AdoMet Mtases SF	S-adenosylmethionine binding site
<i>Drosophila melanogaster</i> (CG7544)	NCBI	gi 19922302 (NP_611015.1)	305	AdoMet Mtases SF	
	GIGATON	CHOYP_LOC100561572.1.1	527	AdoMet Mtases SF	S-adenosylmethionine binding site



<i>Crassostrea gigas</i>	NCBI	gij762141911 (XP_011454156.1)	538	AdoMet Mtases SF	S-adenosylmethionine binding site
		gij762141913 (XP_011454157.1)	527	AdoMet Mtases SF	S-adenosylmethionine binding site

### ALKBH5

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	<b>gij148539642 (NP_060228.3)</b>	394	2OG-FeII_Oxy
<i>Drosophila melanogaster</i>				
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	<b>CHOYP_BRAFLDRAFT_126925.1.1</b>	403	2OG-FeII_Oxy
	NCBI	gij762097205 (XP_011431161.1)	374	2OG-FeII_Oxy

### YTHDC1

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	<b>gij72534750 (NP_001026902.1)</b>	727	YTH
		gij94536805 (NP_588611.2)	709	YTH
		gij1061213987 (NP_001317627.1)	735	YTH
<i>Drosophila melanogaster</i> (YT521)	NCBI	<b>gij24656811 (NP_647811.2)</b>	721	YTH
		gij24656816 (NP_728876.1)	710	YTH
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	<b>CHOYP_YTDC1.2.2</b>	636	YTH CDC27
		CHOYP_LOC586835.1.1	545	YTH CDC27
	NCBI	gij762070401 (XP_011447601.1)	636	YTH CDC27

### YTHDC2

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	<b>gij269847874 (NP_073739.3)</b>	1430	YTH HrpA R3H_DEXH_helicase DEXHc_YTHDC2 OB_NTP_bind
		gij1066536696 (NP_001332904.1)	1268	YTH HrpA DEXHc_YTHDC2 OB_NTP_bind
		gij1066546270 (NP_001332905.1)	1130	YTH HrpA DEAD-like_helicase_N_SF ANKYR OB_NTP_bind
<i>Drosophila melanogaster</i>				
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	<b>CHOYP_YTDC2.1.1</b>	1572	YTH HrpA R3H super family Ank_2
	NCBI	gij762086858 (XP_011425711.1)	1572	YTH HrpA R3H super family Ank_2



**YTHDF**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 29791407 (AAH50284.1)	559	YTH	RPA_2b-aaRSs_OBF_like	PHA03247 super family
		gi 12803469 (AAH02559.1)	579	YTH		
		gi 31419299 (AAH52970.1)	585	YTH		
<i>Drosophila melanogaster</i> (CG6422)		gi 21356147 (NP_651322.1)	700	YTH		
		gi 24649883 (NP_733067.1)	699	YTH		
		gi 161078590 (NP_001097905.1)	694	YTH		
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_COX1.6.15	532	YTH		
		CHOYP_LOC100371022.1.1	531	YTH		
	NCBI	gi 762146089 (XP_011456337.1)	522	YTH		

**hnRNPA2B1**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 4504447 (NP_002128.1)	341	RRM1_hA2B1	RRM2_hA2B1	Putative DNA binding site	hnRNPA1
		gi 14043072 (NP_112533.1)	353	RRM1_hA2B1	RRM2_hA2B1	Putative DNA binding site	hnRNPA1
<i>Drosophila melanogaster</i> (hrb98DE)	NCBI	gi 24650831 (NP_733249.1)	364	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		gi 17738267 (NP_524543.1)	365	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		gi 24650838 (NP_733252.1)	361	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		gi 24650833 (NP_733250.1)	360	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_LOC100748395.1.7	229	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		CHOYP_LOC100748395.2.7	394	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		CHOYP_LOC100748395.3.7	315	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		CHOYP_LOC100748395.4.7	372	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		CHOYP_LOC100748395.6.7	315	RRM1_hA_like	RRM_SF	Putative DNA binding site	
		CHOYP_AGAP_AGAP002374.1.1	236	RRM_SF			

		CHOYP_LOC100748395.5.7	205	RRM_SF
	NCBI	gi 762104361 (XP_011434715.1)	370	RRM1_hA_like RRM_SF Putative DNA binding site
		gi 762104364 (XP_011434716.1)	369	RRM1_hA_like RRM_SF Putative DNA binding site
		gi 762104366 (XP_011434717.1)	363	RRM1_hA_like RRM_SF Putative DNA binding site
		gi 762104368 (XP_011434718.1)	353	RRM1_hA_like RRM_SF Putative DNA binding site

**Prrc2a**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 314122241 (NP_004629.3)	2157	GRE-rich domain BAT2_N
<i>Drosophila melanogaster</i>				
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_LOC100559941.1.2	2578	GRE-rich domain BAT2_N PTZ00121 PTZ00449
		CHOYP_LOC100559941.2.2	2554	GRE-rich domain BAT2_N PTZ00121 PTZ00449
			gi 1139830093 (XP_019928978.1)	2922

**IGF2BP**

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gi 56237027 (NP_006537.3)	577	KH-I KH-1 RRM1_IGF2BP1 RRM2_IGF2BP1
		gi 238624257 (NP_001153895.1)	438	KH-I KH-1 RRM1_IGF2BP1 RRM_SF super family
		gi 64085377 (NP_006539.3)	599	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM1_IGF2BP2 RRM2_IGF2BP2
		gi 56118219 (NP_001007226.1)	556	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM1_IGF2BP2 RRM2_IGF2BP2
		gi 631226390 (NP_001278798.1)	605	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM1_IGF2BP2 RRM_SF super family
		gi 631226392 (NP_001278801.1)	542	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM_SF super family
		gi 631226396 (NP_001278802.1)	536	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM2_IGF2BP2
		gi 631226394 (NP_001278803.1)	493	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM2_IGF2BP2
		gi 631226398 (NP_001278804.1)	463	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM_SF super family
		gi 30795212 (NP_006538.2)	579	KH-I KH-1 PCBP_like_KH RRM1_IGF2BP3 RRM2_IGF2BP3
		gi 386764188 (NP_001036268.2)	631	KH-I KH-1 RRM2_VICKZ

<i>Drosophila melanogaster</i> (IGF-II binding protein)	NCBI	gij386764191 (NP_001245616.1)	638	KH-I	KH-1	RRM2_VICKZ
		gij17530887 (NP_511111.1)	566	KH-I	KH-1	
		gij24641097 (NP_727451.1)	573	KH-I	KH-1	
		gij281360685 (NP_001162717.1)	580	KH-I	KH-1	
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	<b>CHOYP_LOC100114171.1.1</b>	607	KH-I	KH-1	PCBP_like_KH RRM1_VICKZ RRM_SF super family
	NCBI	gij762079091 (XP_011412002.1)	611	KH-I	KH-1	PCBP_like_KH RRM1_VICKZ RRM_SF super family
		gij762079093 (XP_011412008.1)	607	KH-I	KH-1	PCBP_like_KH RRM1_VICKZ RRM_SF super family
		gij762079095 (XP_011412017.1)	590	KH-I	KH-1	PCBP_like_KH RRM1_VICKZ RRM_SF super family

### elf3a

<i>Homo sapiens</i>	NCBI	gij4503509(NP_003741.1)	1382	PINT	Smc super family	U2AF_lg super family	dnaA super family	Rho SF
<i>Drosophila melanogaster</i> (IGF-II binding protein)	NCBI	gij665393171 (NP_730838.3)	1140	PINT	DUF5401	Rho SF		
		gij24643988 (NP_649470.2)	1140	PINT	DUF5401	Rho SF		
<i>Crassostrea gigas</i>	GIGATON	CHOYP_BRAFLDRAFT_75590.1.1	155					
		CHOYP_UBP47.2.2	1253	PAM	DUF5401			
		CHOYP_MROH1.1.1	1046	PAM	DUF5401			
	NCBI	gij762160635 (XP_011418535.1)	759	PAM	DUF5401			
		gij762122193 (XP_011444042.1 )	1252	PAM	DUF5401			



**Data S2:** Identified proteins by RNA pull down coupled with mass spectrometry with m6A or A-oligo, in nuclear or cytosolic protein extracts

Proteins identified in nuclear extracts

Oligo	Accession	Description	Oligo	Accession	Description
m6A	K1PTY5_CRAGI	Protocadherin Fat 4	A	K1QNA2_CRAGI	Vitellogenin-6
m6A	K1QNA2_CRAGI	Vitellogenin-6	A	K1PTY5_CRAGI	Protocadherin Fat 4
m6A	K1QBR5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QBR5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PFG1_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PFG1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1P9A4_CRAGI	Beta-1,3-glucan-binding protein	A	K1P9A4_CRAGI	Beta-1,3-glucan-binding protein
m6A	K1QHI5_CRAGI	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	A	K1QHI5_CRAGI	Pyruvate carboxylase, mitochondrial
m6A	K1QQ94_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R5B4_CRAGI	Proteasome activator complex subunit 4
m6A	K1R5B4_CRAGI	Proteasome activator complex subunit 4	A	K1QQ94_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R164_CRAGI	Galectin-4	A	K1QXR4_CRAGI	Pancreatic lipase-related protein 2
m6A	K1PNI6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	A	K1RWS2_CRAGI	Transcriptional activator protein Pur-alpha
m6A	K1QMX5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PNI6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
m6A	K1PQP2_CRAGI	Nucleolin	A	K1R3U2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QXR4_CRAGI	Pancreatic lipase-related protein 2	A	K1R7V7_CRAGI	Tubulin beta chain
m6A	K1R7V7_CRAGI	Tubulin beta chain	A	K1QMX5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RGT5_CRAGI	Metalloendopeptidase	A	K1R9B6_CRAGI	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
m6A	K1QSX8_CRAGI	ATPase family AAA domain-containing protein 2B	A	K1QQ68_CRAGI	Tubulin alpha chain
m6A	K1R9B6_CRAGI	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	A	K1PQP2_CRAGI	Nucleolin
m6A	K1RWS2_CRAGI	Transcriptional activator protein Pur-alpha	A	K1RLF8_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 3
m6A	K1RLF8_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 3	A	K1R164_CRAGI	Galectin-4
m6A	K1R3U2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QVJ8_CRAGI	Piwi-like protein 1
m6A	K1QQ68_CRAGI	Tubulin alpha chain	A	K1RGT5_CRAGI	Metalloendopeptidase
m6A	K1QVJ8_CRAGI	Piwi-like protein 1	A	K1PH76_CRAGI	Y-box factor-like protein (Fragment)
m6A	K1PVA1_CRAGI	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	A	K1QI16_CRAGI	Tubulin alpha chain
m6A	K1QKB5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QSX8_CRAGI	ATPase family AAA domain-containing protein 2B
m6A	K1QHM2_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	A	K1QK56_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QI16_CRAGI	Tubulin alpha chain	A	K1QKB5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QSQ9_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase an3	A	K1PE00_CRAGI	Tubulin alpha chain
m6A	K1QQ27_CRAGI	Pancreatic lipase-related protein 2	A	K1QQ27_CRAGI	Pancreatic lipase-related protein 2
m6A	K1QMA4_CRAGI	RRP5-like protein	A	K1PVA1_CRAGI	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
m6A	K1PEP0_CRAGI	40S ribosomal protein S8	A	K1PEP0_CRAGI	40S ribosomal protein S8
m6A	K1QXX7_CRAGI	Myosin heavy chain, non-muscle (Fragment)	A	K1QXX7_CRAGI	Myosin heavy chain, non-muscle (Fragment)
m6A	K1QK56_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RK12_CRAGI	40S ribosomal protein S23
m6A	K1PNR3_CRAGI	Clathrin heavy chain	A	K1QSQ9_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase an3
m6A	K1PN21_CRAGI	Tubulin beta chain	A	K1PNR3_CRAGI	Clathrin heavy chain
m6A	K1RG73_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase	A	K1QMA4_CRAGI	RRP5-like protein
m6A	K1RD58_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QHM2_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
m6A	K1QU53_CRAGI	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	A	K1QU53_CRAGI	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial
m6A	K1R473_CRAGI	Tubulin alpha chain	A	K1PJC1_CRAGI	Adipophilin
m6A	K1PH76_CRAGI	Y-box factor-like protein (Fragment)	A	K1RG73_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase
m6A	K1PE00_CRAGI	Tubulin alpha chain	A	K1QFM6_CRAGI	Vitellogenin
m6A	K1PJC1_CRAGI	Adipophilin	A	K1R6Q7_CRAGI	DNA topoisomerase I
m6A	K1R6Z7_CRAGI	ATP synthase subunit alpha	A	K1R6Z7_CRAGI	ATP synthase subunit alpha
m6A	K1R545_CRAGI	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (Fragment)	A	K1QGS8_CRAGI	Elongation factor 1-alpha
m6A	K1RI55_CRAGI	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	A	K1QWZ6_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
m6A	K1QGS8_CRAGI	Elongation factor 1-alpha	A	K1RD58_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QFM6_CRAGI	Vitellogenin	A	K1QLS3_CRAGI	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
m6A	K1R6Q7_CRAGI	DNA topoisomerase I	A	K1S1S1_CRAGI	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
m6A	K1Q988_CRAGI	Band 4.1-like protein 3	A	K1R0L4_CRAGI	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha

m6A	K1QLS3_CRAGI	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	A	K1RWW5_CRAGI	ATP synthase subunit beta
m6A	K1RWW5_CRAGI	ATP synthase subunit beta	A	K1QA13_CRAGI	Calcium-transporting ATPase
m6A	K1S2N7_CRAGI	Innexin	A	K1QFN2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1P421_CRAGI	Histone H2A	A	K1R545_CRAGI	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (Fragment)
m6A	K1RK12_CRAGI	40S ribosomal protein S23	A	K1R252_CRAGI	Putative methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial
m6A	K1QKD6_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PMT6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1
m6A	K1QWZ6_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	A	K1RGB7_CRAGI	Epidermal retinal dehydrogenase 2
m6A	K1QFN2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R466_CRAGI	T-complex protein 1 subunit gamma
m6A	K1PHW2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R294_CRAGI	T-complex protein 1 subunit beta
m6A	K1PJ06_CRAGI	Importin subunit alpha-1	A	K1RIT6_CRAGI	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial
m6A	K1QA13_CRAGI	Calcium-transporting ATPase	A	K1QIR8_CRAGI	78 kDa glucose-regulated protein
m6A	K1R0L4_CRAGI	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	A	K1R155_CRAGI	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
m6A	K1R115_CRAGI	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	A	K1QH74_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
m6A	K1QB61_CRAGI	Protocadherin Fat 4	A	K1S2N7_CRAGI	Innexin
m6A	K1Q4H2_CRAGI	Nodal modulator 3	A	K1R435_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 4
m6A	K1QWK2_CRAGI	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	A	K1R5U4_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase 1
m6A	K1R466_CRAGI	T-complex protein 1 subunit gamma	A	K1QBK6_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 1
m6A	K1QFW9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1Q988_CRAGI	Band 4.1-like protein 3
m6A	K1R5U4_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase 1	A	K1R420_CRAGI	Non-specific serine/threonine protein kinase
m6A	A5LGH1_CRAGI	Voltage-dependent anion channel	A	A5LGH1_CRAGI	Voltage-dependent anion channel
m6A	K1S4Q2_CRAGI	T-complex protein 1 subunit delta (Fragment)	A	K1PHW2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1REG6_CRAGI	DNA helicase	A	K1REG6_CRAGI	DNA helicase
m6A	K1PUL2_CRAGI	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	A	K1QAE5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R294_CRAGI	T-complex protein 1 subunit beta	A	K1QWT8_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PMT6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	A	K1QRL6_CRAGI	Methenyltetrahydrofolate synthetase domain-containing protein
m6A	K1RGB7_CRAGI	Epidermal retinal dehydrogenase 2	A	K1QYB3_CRAGI	Ig-like and fibronectin type-III domain-containing protein C25G4.10
m6A	K1R435_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 4	A	K1QKD6_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R252_CRAGI	Putative methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	A	K1R115_CRAGI	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
m6A	K1QAE5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1S4Q2_CRAGI	T-complex protein 1 subunit delta (Fragment)
m6A	K1QIR8_CRAGI	78 kDa glucose-regulated protein	A	K1QWK2_CRAGI	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2
m6A	K1QYB3_CRAGI	Ig-like and fibronectin type-III domain-containing protein C25G4.10	A	K1R0S3_CRAGI	T-complex protein 1 subunit theta
m6A	K1QI14_CRAGI	40S ribosomal protein S3a	A	K1QFW9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PNQ5_CRAGI	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	A	K1Q0Z3_CRAGI	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11
m6A	K1S1S1_CRAGI	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	A	K1PNQ5_CRAGI	Heat shock protein HSP 90-alpha 1
m6A	K1QM19_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RBF6_CRAGI	Uncharacterized protein yfeX
m6A	K1R420_CRAGI	Non-specific serine/threonine protein kinase	A	K1R4D4_CRAGI	40S ribosomal protein SA
m6A	K1R4R9_CRAGI	Mitotic apparatus protein p62	A	K1QI14_CRAGI	40S ribosomal protein S3a
m6A	K1R0S3_CRAGI	T-complex protein 1 subunit theta	A	K1PUL2_CRAGI	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
m6A	K1RAJ1_CRAGI	T-complex protein 1 subunit alpha	A	K1RFT1_CRAGI	Band 4.1-like protein 3
m6A	K1QH74_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	A	K1PJ06_CRAGI	Importin subunit alpha-1
m6A	K1QRL6_CRAGI	Methenyltetrahydrofolate synthetase domain-containing protein	A	K1QT21_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX5
m6A	K1QUC6_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QM19_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RIT6_CRAGI	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	A	K1QXS6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2-like protein 1
m6A	K1RBF6_CRAGI	Uncharacterized protein yfeX	A	K1QMX8_CRAGI	DNA replication licensing factor MCM7
m6A	K1PCS4_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, Y-linked	A	K1PD57_CRAGI	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1-like protein
m6A	K1Q620_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R953_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase

m6A	K1QWX2_CRAGI	60S acidic ribosomal protein P0	A	K1RJH5_CRAGI	Polyadenylate-binding protein
m6A	K1PD57_CRAGI	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1-like protein	A	K1RSZ6_CRAGI	40S ribosomal protein S7
m6A	K1Q4S5_CRAGI	Cadherin-87A	A	K1R7A2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RQA0_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	A	K1QUC6_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QMX8_CRAGI	DNA replication licensing factor MCM7	A	K1QWX2_CRAGI	60S acidic ribosomal protein P0
m6A	K1QPX8_CRAGI	Alkyl/aryl-sulfatase BDS1	A	K1RNB5_CRAGI	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
m6A	K1QZW0_CRAGI	Polyadenylate-binding protein 2	A	K1PCS4_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, Y-linked
m6A	K1RWX7_CRAGI	Metabotropic glutamate receptor 3	A	K1Q923_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX4
m6A	K1RFT1_CRAGI	Band 4.1-like protein 3	A	K1QPX8_CRAGI	Alkyl/aryl-sulfatase BDS1
m6A	K1RNB5_CRAGI	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	A	K1R4R9_CRAGI	Mitotic apparatus protein p62
m6A	K1QBK6_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 1	A	K1RAJ1_CRAGI	T-complex protein 1 subunit alpha
m6A	K1Q0Z3_CRAGI	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	A	K1Q0L1_CRAGI	60S ribosomal protein L23a
m6A	K1R953_CRAGI	Acetyl-CoA carboxylase	A	K1Q620_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QNN9_CRAGI	MICOS complex subunit MIC60	A	K1QG58_CRAGI	Actin
m6A	K1QXS6_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2-like protein 1	A	K1Q4H2_CRAGI	Nodal modulator 3
m6A	K1RJH5_CRAGI	Polyadenylate-binding protein	A	K1Q260_CRAGI	Nucleolar protein 58
m6A	K1R0Y9_CRAGI	ADP,ATP carrier protein	A	K1QF01_CRAGI	40S ribosomal protein S4
m6A	K1R4D4_CRAGI	40S ribosomal protein SA	A	K1PUM2_CRAGI	Histone H2A
m6A	K1QWT8_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QNN9_CRAGI	MICOS complex subunit MIC60
m6A	K1Q0L1_CRAGI	60S ribosomal protein L23a	A	K1RQA0_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
m6A	K1Q260_CRAGI	Nucleolar protein 58	A	K1QZW0_CRAGI	Polyadenylate-binding protein 2
m6A	K1QT04_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QBN0_CRAGI	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
m6A	K1Q9K6_CRAGI	Histone H3	A	K1Q850_CRAGI	Nucleolar complex protein 3 homolog
m6A	K1QT21_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX5	A	K1RH18_CRAGI	Sarcalumenin
m6A	K1QBN0_CRAGI	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	A	K1QQ05_CRAGI	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain
m6A	K1PLY1_CRAGI	DNA polymerase	A	K1QT04_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QBH0_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RLC5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit epsilon
m6A	K1Q923_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX4	A	K1Q9K6_CRAGI	Histone H3
m6A	K1QG58_CRAGI	Actin	A	K1QBW8_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QQB6_CRAGI	40S ribosomal protein S14	A	K1Q9W5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit eta
m6A	K1QDX9_CRAGI	Ribosome biogenesis protein BMS1-like protein	A	K1R0Y9_CRAGI	ADP,ATP carrier protein
m6A	K1QF01_CRAGI	40S ribosomal protein S4	A	K1QP17_CRAGI	Caprin-1
m6A	K1RLC5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit epsilon	A	K1QYB6_CRAGI	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
m6A	K1QY12_CRAGI	Dynamin-1-like protein	A	K1R7I9_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
m6A	K1R0W4_CRAGI	Signal recognition particle subunit SRP72	A	K1QMB9_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
m6A	K1QX26_CRAGI	Endoplasmic	A	K1PM50_CRAGI	40S ribosomal protein S16
m6A	K1QHS8_CRAGI	Ribonucleoside-diphosphate reductase	A	K1P8W6_CRAGI	60S ribosomal protein L4
m6A	K1QQ05_CRAGI	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain	A	K1PXH5_CRAGI	Putative saccharopine dehydrogenase
m6A	K1QFP5_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	A	K1PBZ4_CRAGI	Regulator of nonsense transcripts 1
m6A	K1QP17_CRAGI	Caprin-1	A	K1R4L8_CRAGI	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial
m6A	K1R7A2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QFP5_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial
m6A	K1R4L8_CRAGI	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	A	K1RIG6_CRAGI	LSM14-like protein A
m6A	K1R591_CRAGI	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	A	K1R591_CRAGI	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
m6A	K1R7I9_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	A	K1RSA6_CRAGI	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial
m6A	K1QBW8_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R1B1_CRAGI	35 kDa SR repressor protein
m6A	K1RSZ6_CRAGI	40S ribosomal protein S7	A	K1QZU8_CRAGI	Calcium-transporting ATPase
m6A	K1QDZ5_CRAGI	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	A	K1QX26_CRAGI	Endoplasmic



m6A	K1PGW7_CRAGI	Transmembrane protein 2	A	K1Q358_CRAGI	60S acidic ribosomal protein P2
m6A	K1QMB9_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	A	K1P112_CRAGI	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial
m6A	K1RNZ6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	A	K1QHS8_CRAGI	Ribonucleoside-diphosphate reductase
m6A	K1Q9W5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit eta	A	K1PXN5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit zeta
m6A	K1Q404_CRAGI	DNA topoisomerase 2	A	K1R7J6_CRAGI	Putative sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2
m6A	K1R7J6_CRAGI	Putative sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2	A	K1Q5H6_CRAGI	FACT complex subunit SSRP1
m6A	K1P8W6_CRAGI	60S ribosomal protein L4	A	K1QTD9_CRAGI	Nucleolar protein 56
m6A	K1RSA6_CRAGI	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	A	K1QC78_CRAGI	Ras-related protein Rab-14
m6A	K1RW85_CRAGI	Adenosylhomocysteinase	A	K1Q9M7_CRAGI	Histone H1-delta
m6A	K1PS27_CRAGI	DNA helicase	A	K1RNZ6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D
m6A	K1RH18_CRAGI	Sarcalumenin	A	K1QAH9_CRAGI	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit
m6A	K1Q5H6_CRAGI	FACT complex subunit SSRP1	A	K1RLT4_CRAGI	Signal recognition particle subunit SRP68
m6A	K1PH66_CRAGI	Fibrinolytic enzyme, isozyme C	A	K1RWX7_CRAGI	Metabotropic glutamate receptor 3
m6A	K1PF10_CRAGI	PAN2-PAN3 deadenylation complex catalytic subunit PAN2	A	K1RA35_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
m6A	K1Q358_CRAGI	60S acidic ribosomal protein P2	A	K1QE71_CRAGI	DNA helicase
m6A	K1PXH5_CRAGI	Putative saccharopine dehydrogenase	A	K1PS27_CRAGI	DNA helicase
m6A	K1Q8S0_CRAGI	Nucleolar complex protein 3 homolog	A	K1Q4Y8_CRAGI	Histone H1oo
m6A	K1QYB6_CRAGI	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	A	K1PGW7_CRAGI	Transmembrane protein 2
m6A	K1PV79_CRAGI	Importin subunit alpha	A	K1RAB9_CRAGI	Epoxide hydrolase 4
m6A	K1PV49_CRAGI	RuvB-like helicase	A	K1Q9P5_CRAGI	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta
m6A	K1PRL4_CRAGI	60S ribosomal protein L38 (Fragment)	A	K1QL67_CRAGI	60S ribosomal protein L7a
m6A	K1QL67_CRAGI	60S ribosomal protein L7a	A	K1PLY1_CRAGI	DNA polymerase
m6A	K1PAY7_CRAGI	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	A	K1R996_CRAGI	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4
m6A	K1R6L5_CRAGI	NADH-cytochrome b5 reductase	A	K1Q404_CRAGI	DNA topoisomerase 2
m6A	K1R1B1_CRAGI	35 kDa SR repressor protein	A	K1QBH0_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QHQ6_CRAGI	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	A	K1R0W4_CRAGI	Signal recognition particle subunit SRP72
m6A	K1QZU8_CRAGI	Calcium-transporting ATPase	A	K1RN77_CRAGI	Nuclear autoantigenic sperm protein
m6A	K1RN77_CRAGI	Nuclear autoantigenic sperm protein	A	K1PA54_CRAGI	Replication factor C subunit 3
m6A	K1PZ23_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily C member 3	A	K1Q4S5_CRAGI	Cadherin-87A
m6A	K1R005_CRAGI	Filamin-C (Fragment)	A	K1QEF2_CRAGI	ADP-ribosylation factor-like protein 15
m6A	K1RA35_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	A	K1QYT5_CRAGI	Phosphate carrier protein, mitochondrial
m6A	K1R2V1_CRAGI	Importin subunit beta-1	A	K1QDX9_CRAGI	Ribosome biogenesis protein BMS1-like protein
m6A	K1QAH9_CRAGI	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit	A	K1QB61_CRAGI	Protocadherin Fat 4
m6A	K1QET2_CRAGI	Coatomer subunit alpha	A	K1R0D7_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (Fragment)
m6A	K1RAB9_CRAGI	Epoxide hydrolase 4	A	K1PM76_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial
m6A	K1QGK2_CRAGI	Coatomer subunit beta	A	K1PRL4_CRAGI	60S ribosomal protein L38 (Fragment)
m6A	K1PXN5_CRAGI	T-complex protein 1 subunit zeta	A	K1RW85_CRAGI	Adenosylhomocysteinase
m6A	K1QHX2_CRAGI	La-related protein 7	A	K1PAY7_CRAGI	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial
m6A	K1PZ08_CRAGI	Ras-related protein Rab-7a	A	K1PZ08_CRAGI	Ras-related protein Rab-7a
m6A	K1RK68_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QY12_CRAGI	Dynamin-1-like protein
m6A	K1QOR4_CRAGI	ATP-binding cassette sub-family F member 2	A	K1QFN1_CRAGI	60S ribosomal protein L23
m6A	K1QW72_CRAGI	Catalase	A	K1RDW8_CRAGI	Golgi apparatus protein 1
m6A	K1PPP8_CRAGI	Vigilin	A	K1RSS3_CRAGI	Myosin heavy chain, striated muscle
m6A	K1QVW3_CRAGI	Alkylglycerone-phosphate synthase	A	K1QGK2_CRAGI	Coatomer subunit beta
m6A	K1PBZ4_CRAGI	Regulator of nonsense transcripts 1	A	K1PV79_CRAGI	Importin subunit alpha
m6A	K1Q6W5_CRAGI	FACT complex subunit spt16	A	K1QN79_CRAGI	40S ribosomal protein S11
m6A	K1R5F2_CRAGI	14-3-3 protein epsilon	A	K1PV49_CRAGI	RuvB-like helicase
m6A	K1RLT4_CRAGI	Signal recognition particle subunit SRP68	A	K1QG65_CRAGI	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar
m6A	K1RSS3_CRAGI	Myosin heavy chain, striated muscle	A	K1PK85_CRAGI	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1



m6A	K1RNN9_CRAGI	Cytoskeleton-associated protein 5	A	K1QVN9_CRAGI	T-complex protein 1 subunit eta
m6A	K1QN11_CRAGI	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	A	K1QGB4_CRAGI	40S ribosomal protein S17
m6A	K1PA54_CRAGI	Replication factor C subunit 3	A	K1QK18_CRAGI	Cytochrome b5
m6A	K1QC78_CRAGI	Ras-related protein Rab-14	A	K1QVW3_CRAGI	Alkylglycerone-phosphate synthase
m6A	K1QW36_CRAGI	60S ribosomal protein L6	A	K1QN11_CRAGI	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8
m6A	K1Q9P5_CRAGI	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	A	K1RJS5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q253_CRAGI	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	A	K1Q6W5_CRAGI	FACT complex subunit spt16
m6A	K1QHK9_CRAGI	Dynein heavy chain, cytoplasmic	A	K1QQB6_CRAGI	40S ribosomal protein S14
m6A	K1QFN1_CRAGI	60S ribosomal protein L23	A	K1PKF5_CRAGI	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4
m6A	K1P112_CRAGI	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	A	K1PH66_CRAGI	Fibrinolytic enzyme, isozyme C
m6A	K1QE71_CRAGI	DNA helicase	A	K1PY89_CRAGI	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
m6A	K1PK85_CRAGI	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	A	K1QUK3_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX41
m6A	K1QTD9_CRAGI	Nucleolar protein 56	A	K1R2V1_CRAGI	Importin subunit beta-1
m6A	K1P9N7_CRAGI	14-3-3 protein zeta	A	K1PV86_CRAGI	Phosphoglycerate mutase family member 5
m6A	K1RG19_CRAGI	Protein FAM98A	A	K1QJ08_CRAGI	60S ribosomal protein L26
m6A	K1PMP3_CRAGI	Protoporphyrinogen oxidase	A	K1QLU6_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase
m6A	K1QVN9_CRAGI	T-complex protein 1 subunit eta	A	K1QDN1_CRAGI	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (Fragment)
m6A	K1QG65_CRAGI	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	A	K1QPP2_CRAGI	Elongation factor Tu, mitochondrial
m6A	K1PM76_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	A	K1R834_CRAGI	60S ribosomal protein L9
m6A	K1PM50_CRAGI	40S ribosomal protein S16	A	K1R005_CRAGI	Filamin-C (Fragment)
m6A	K1QEF9_CRAGI	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	A	K1QET2_CRAGI	Coatomer subunit alpha
m6A	K1RKC1_CRAGI	Far upstream element-binding protein 3	A	K1RKC1_CRAGI	Far upstream element-binding protein 3
m6A	K1PY89_CRAGI	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	A	K1RG19_CRAGI	Protein FAM98A
m6A	K1RIZ3_CRAGI	Bone morphogenetic protein 7	A	K1Q056_CRAGI	Calpain-A
m6A	K1RA95_CRAGI	Filamin-A	A	K1QKJ0_CRAGI	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1
m6A	K1PWZ3_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	A	K1QDZ5_CRAGI	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
m6A	K1Q812_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	A	K1PPP8_CRAGI	Vigilin
m6A	K1PFS5_CRAGI	Elongation factor 1-gamma	A	K1RHB2_CRAGI	Nucleolar RNA helicase 2
m6A	K1PX23_CRAGI	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	A	K1PH31_CRAGI	Protein arginine N-methyltransferase 1
m6A	K1QSV1_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1Q6V6_CRAGI	Replication factor C subunit 4
m6A	K1Q6X5_CRAGI	Protein disulfide-isomerase	A	K1P150_CRAGI	40S ribosomal protein S26
m6A	K1RAU3_CRAGI	DNA ligase	A	K1PX23_CRAGI	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1
m6A	K1PXG6_CRAGI	Serine/threonine-protein phosphatase	A	K1QFZ8_CRAGI	Ceramide kinase-like protein
m6A	K1RIG6_CRAGI	LSM14-like protein A	A	K1S2S8_CRAGI	Signal recognition particle 54 kDa protein
m6A	K1QWK6_CRAGI	Metalloendopeptidase	A	K1R1T8_CRAGI	Nucleolar protein 56
m6A	K1RCW3_CRAGI	Elongation factor 1-beta	A	K1QRZ3_CRAGI	40S ribosomal protein S13
m6A	K1QK18_CRAGI	Cytochrome b5	A	K1PMP3_CRAGI	Protoporphyrinogen oxidase
m6A	K1Q056_CRAGI	Calpain-A	A	K1P9N7_CRAGI	14-3-3 protein zeta
m6A	K1Q9M7_CRAGI	Histone H1-delta	A	K1Q0R4_CRAGI	ATP-binding cassette sub-family F member 2
m6A	K1P7L5_CRAGI	Transmembrane 9 superfamily member	A	K1QWC3_CRAGI	40S ribosomal protein S3
m6A	K1QSU3_CRAGI	Protein I(2)37Cc	A	K1Q812_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial
m6A	K1PLF9_CRAGI	Arginine kinase	A	K1P5V7_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
m6A	K1Q1F4_CRAGI	60S ribosomal protein L3 (Fragment)	A	K1R2N0_CRAGI	Histone H4
m6A	K1R1T8_CRAGI	Nucleolar protein 56	A	K1QLK8_CRAGI	GTP-binding protein SAR1b
m6A	K1QGB4_CRAGI	40S ribosomal protein S17	A	K1QHX2_CRAGI	La-related protein 7
m6A	K1QJ08_CRAGI	60S ribosomal protein L26	A	K1S6V7_CRAGI	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform
m6A	K1Q4Y8_CRAGI	Histone H1oo	A	K1Q3W9_CRAGI	FAS-associated factor 2-B
m6A	K1PKF5_CRAGI	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	A	K1QG72_CRAGI	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor

m6A	K1QYT5_CRAGI	Phosphate carrier protein, mitochondrial	A	K1QHQ6_CRAGI	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial
m6A	K1RHB2_CRAGI	Nucleolar RNA helicase 2	A	K1QFR2_CRAGI	Calnexin
m6A	K1RJJ7_CRAGI	Histone H5	A	K1S1X3_CRAGI	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5
m6A	K1PS84_CRAGI	Alpha-crystallin B chain	A	K1PWZ3_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta
m6A	K1R2N0_CRAGI	Histone H4	A	K1QW41_CRAGI	Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1
m6A	K1PZP6_CRAGI	Coatomer subunit gamma	A	K1RK68_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RGJ7_CRAGI	Neogenin	A	K1RA95_CRAGI	Filamin-A
m6A	K1R9P5_CRAGI	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	A	K1QMV5_CRAGI	Annexin
m6A	K1RUM2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QW72_CRAGI	Catalase
m6A	K1RJ97_CRAGI	Multifunctional protein ADE2	A	K1QXQ8_CRAGI	DNA helicase
m6A	K1RJS5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1P7L5_CRAGI	Transmembrane 9 superfamily member
m6A	K1QW41_CRAGI	Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1	A	K1P8G1_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
m6A	K1R834_CRAGI	60S ribosomal protein L9	A	K1PZ23_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily C member 3
m6A	K1QLK8_CRAGI	GTP-binding protein SAR1b	A	K1RIZ3_CRAGI	Bone morphogenetic protein 7
m6A	K1QDH9_CRAGI	Myosin-11	A	K1RNN9_CRAGI	Cytoskeleton-associated protein 5
m6A	K1QEF2_CRAGI	ADP-ribosylation factor-like protein 15	A	K1R6L5_CRAGI	NADH-cytochrome b5 reductase
m6A	K1PUX5_CRAGI	Casein kinase II subunit alpha	A	K1R5F2_CRAGI	14-3-3 protein epsilon
m6A	K1QLU6_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase	A	K1P9D0_CRAGI	Stress-70 protein, mitochondrial
m6A	K1QUK3_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX41	A	K1RGJ7_CRAGI	Neogenin
m6A	K1S2S8_CRAGI	Signal recognition particle 54 kDa protein	A	K1PZP6_CRAGI	Coatomer subunit gamma
m6A	K1PY73_CRAGI	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	A	K1RJ97_CRAGI	Multifunctional protein ADE2
m6A	K1S6V7_CRAGI	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	A	K1R6F5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX23
m6A	K1QPC6_CRAGI	Nucleolar complex protein 2-like protein	A	K1PS84_CRAGI	Alpha-crystallin B chain
m6A	K1QPP2_CRAGI	Elongation factor Tu, mitochondrial	A	K1P9S7_CRAGI	Brix domain-containing protein 2
m6A	K1QDN1_CRAGI	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (Fragment)	A	K1PI40_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R996_CRAGI	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	A	K1QAI2_CRAGI	Ufm1-specific protease 2
m6A	K1RDW8_CRAGI	Golgi apparatus protein 1	A	K1REP0_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1S3G2_CRAGI	HMGB1	A	K1QJM1_CRAGI	60S ribosomal protein L30
m6A	K1QR48_CRAGI	Calcium-binding mitochondrial carrier protein ScaMC-2	A	K1S3G2_CRAGI	HMGB1
m6A	K1P5V7_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	A	K1PXD4_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX6
m6A	K1PV86_CRAGI	Phosphoglycerate mutase family member 5	A	K1RJJ7_CRAGI	Histone H5
m6A	K1QWC3_CRAGI	40S ribosomal protein S3	A	K1Q3W3_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial
m6A	K1PZ70_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	A	K1RJW8_CRAGI	Protein DEK
m6A	K1PTL4_CRAGI	Odr-4-like protein	A	K1RN97_CRAGI	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor
m6A	K1QRM1_CRAGI	Nuclear pore protein	A	K1QW36_CRAGI	60S ribosomal protein L6
m6A	K1PVD7_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	A	K1RA63_CRAGI	Transmembrane protein 2
m6A	K1QFR2_CRAGI	Calnexin	A	K1R9T2_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
m6A	K1Q273_CRAGI	60S ribosomal protein L14	A	K1PM66_CRAGI	60S ribosomal protein L12
m6A	K1R0M2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1Q273_CRAGI	60S ribosomal protein L14
m6A	K1R5W3_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PXG6_CRAGI	Serine/threonine-protein phosphatase
m6A	K1QXQ8_CRAGI	DNA helicase	A	K1QPC6_CRAGI	Nucleolar complex protein 2-like protein
m6A	K1QPY8_CRAGI	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	A	K1RCW3_CRAGI	Elongation factor 1-beta
m6A	K1Q6V6_CRAGI	Replication factor C subunit 4	A	K1Q324_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
m6A	K1QMS2_CRAGI	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	A	K1PLA7_CRAGI	Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment)
m6A	K1Q7T5_CRAGI	Protein disulfide-isomerase	A	K1RBI9_CRAGI	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2
m6A	K1QRZ3_CRAGI	40S ribosomal protein S13	A	K1RCL2_CRAGI	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13-B
m6A	K1R4Z3_CRAGI	Malate dehydrogenase, mitochondrial	A	K1QKV1_CRAGI	Cytochrome b-c1 complex subunit 6
m6A	K1PJ85_CRAGI	26S protease regulatory subunit 6A	A	K1QVU0_CRAGI	Synaptojanin-2-binding protein

m6A	K1PB87_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QRG9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PXU6_CRAGI	60S ribosomal protein L24	A	K1PZ70_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial
m6A	K1R6S5_CRAGI	40S ribosomal protein S9	A	K1Q350_CRAGI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
m6A	K1PVH5_CRAGI	Centromere/kinetochore protein zw10-like protein	A	K1PXU6_CRAGI	60S ribosomal protein L24
m6A	K1R512_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QZQ8_CRAGI	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8
m6A	K1QK68_CRAGI	Myosin-2 essential light chain	A	K1RUM2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PUV4_CRAGI	40S ribosomal protein S24	A	K1REY2_CRAGI	Dysferlin
m6A	K1R5U8_CRAGI	UBX domain-containing protein 4	A	K1Q6X5_CRAGI	Protein disulfide-isomerase
m6A	K1PW39_CRAGI	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	A	K1QWK6_CRAGI	Metalloendopeptidase
m6A	K1R790_CRAGI	Retinol dehydrogenase 13	A	K1QDH9_CRAGI	Myosin-11
m6A	K1QT61_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (Fragment)	A	K1QQR1_CRAGI	Major vault protein
m6A	K1RG28_CRAGI	Kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	A	K1RAH2_CRAGI	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
m6A	K1QKV1_CRAGI	Cytochrome b-c1 complex subunit 6	A	K1PH13_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
m6A	K1P9S7_CRAGI	Brix domain-containing protein 2	A	K1PY73_CRAGI	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1
m6A	K1QN79_CRAGI	40S ribosomal protein S11	A	K1Q7T5_CRAGI	Protein disulfide-isomerase
m6A	K1QEJ0_CRAGI	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	A	K1PF55_CRAGI	Elongation factor 1-gamma
m6A	K1S1X3_CRAGI	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	A	K1PW39_CRAGI	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial
m6A	K1R9T2_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	A	K1R1C5_CRAGI	Signal recognition particle receptor subunit beta
m6A	K1QED7_CRAGI	Replication protein A subunit	A	K1Q1F4_CRAGI	60S ribosomal protein L3 (Fragment)
m6A	K1QQK5_CRAGI	Metabotropic glutamate receptor 2	A	K1QNS4_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily C member 9
m6A	K1RN97_CRAGI	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor	A	K1QY85_CRAGI	Transport protein Sec31A
m6A	K1PJS7_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase	A	K1QWP1_CRAGI	Nucleoporin seh1
m6A	K1R6F5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX23	A	K1RAU3_CRAGI	DNA ligase
m6A	K1R8R6_CRAGI	Fructose-bisphosphate aldolase	A	K1R5W3_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QY85_CRAGI	Transport protein Sec31A	A	K1QF31_CRAGI	Serine/threonine-protein kinase PLK
m6A	K1QF31_CRAGI	Serine/threonine-protein kinase PLK	A	K1Q667_CRAGI	tRNA-splicing ligase RtcB homolog
m6A	K1Q5J7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QRM1_CRAGI	Nuclear pore protein
m6A	K1QPFO_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R790_CRAGI	Retinol dehydrogenase 13
m6A	K1P6Y1_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R0M2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QJM1_CRAGI	60S ribosomal protein L30	A	K1QNT7_CRAGI	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
m6A	K1PXD4_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX6	A	K1QIV3_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PH31_CRAGI	Protein arginine N-methyltransferase 1	A	K1QR48_CRAGI	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2
m6A	K1PAM6_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R4F7_CRAGI	Ras-related protein Rab-6B
m6A	K1RFU6_CRAGI	Proteasome activator complex subunit 3	A	K1PIC5_CRAGI	Transmembrane protein 85
m6A	K1Q324_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	A	K1RKZ5_CRAGI	DNA damage-binding protein 1
m6A	K1QRG9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QW21_CRAGI	39S ribosomal protein L40, mitochondrial
m6A	K1S6H7_CRAGI	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	A	K1PB87_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QE94_CRAGI	Alpha-galactosidase	A	K1R150_CRAGI	Ras-related protein Rab-1A
m6A	K1Q7Q2_CRAGI	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	A	K1PVZ3_CRAGI	Cold shock domain-containing protein E1
m6A	K1Q7G8_CRAGI	Fatty acid synthase	A	K1QSD9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QXH3_CRAGI	Translational activator GCN1	A	K1PPW8_CRAGI	Coatomer subunit beta
m6A	K1P8G1_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	A	K1QKG9_CRAGI	Cysteine desulfurase, mitochondrial
m6A	K1QKQ8_CRAGI	THO complex subunit 4-A	A	K1RK83_CRAGI	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
m6A	K1RA63_CRAGI	Transmembrane protein 2	A	K1QE94_CRAGI	Alpha-galactosidase
m6A	K1QAA2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RIJ1_CRAGI	Synaptobrevin (Fragment)
m6A	K1PLA7_CRAGI	Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment)	A	K1PJB0_CRAGI	Heat shock protein 70 B2
m6A	K1QIV3_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R6S5_CRAGI	40S ribosomal protein S9
m6A	K1RAH2_CRAGI	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	A	K1PAM6_CRAGI	Uncharacterized protein

m6A	K1QXA9_CRAGI	Sortilin-related receptor	A	K1QY71_CRAGI	Histone H2B
m6A	K1QSD9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1P6Y1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q3W3_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	A	K1PNY5_CRAGI	Splicing factor, proline-and glutamine-rich
m6A	K1R3T3_CRAGI	Transcription factor BTF3	A	K1PDL3_CRAGI	Ribosomal protein L19
m6A	K1QMH5_CRAGI	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	A	K1RDG4_CRAGI	DNA helicase
m6A	K1R1R9_CRAGI	Pre-mRNA-processing factor 6	A	K1RV41_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
m6A	K1PM66_CRAGI	60S ribosomal protein L12	A	K1QMH5_CRAGI	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
m6A	K1Q3W9_CRAGI	FAS-associated factor 2-B	A	K1R4Z3_CRAGI	Malate dehydrogenase, mitochondrial
m6A	K1P9D0_CRAGI	Stress-70 protein, mitochondrial	A	K1R3T3_CRAGI	Transcription factor BTF3
m6A	K1R4F7_CRAGI	Ras-related protein Rab-6B	A	K1QAB1_CRAGI	AP-2 complex subunit alpha
m6A	K1QGP7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QSU3_CRAGI	Protein I(2)37Cc
m6A	K1REY2_CRAGI	Dysferlin	A	K1PEY4_CRAGI	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
m6A	K1QSB2_CRAGI	26S protease regulatory subunit 6B	A	K1PU46_CRAGI	Lethal(2) giant larvae-like protein 1
m6A	K1RAU8_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	A	K1Q0N6_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
m6A	K1QAB1_CRAGI	AP-2 complex subunit alpha	A	K1QGP1_CRAGI	Replication factor C subunit 2
m6A	K1RFU8_CRAGI	High mobility group protein DSP1	A	K1QDV6_CRAGI	Protein argonaute-2
m6A	K1QAA8_CRAGI	CAAX prenyl protease 1-like protein	A	K1S6H7_CRAGI	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
m6A	K1PXS8_CRAGI	Calreticulin	A	K1PF10_CRAGI	PAN2-PAN3 deadenylation complex catalytic subunit PAN2
m6A	K1RV41_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	A	K1Q1L4_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q5Z6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	A	K1PWC3_CRAGI	Tetratricopeptide repeat protein 35
m6A	K1QYQ9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QKL8_CRAGI	V-type proton ATPase subunit a
m6A	K1RCL2_CRAGI	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13-B	A	K1QT61_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (Fragment)
m6A	K1PI50_CRAGI	40S ribosomal protein S26	A	K1Q7G8_CRAGI	Fatty acid synthase
m6A	K1QGP1_CRAGI	Replication factor C subunit 2	A	K1QX44_CRAGI	Ras-related protein Rab-11B
m6A	K1P541_CRAGI	Alpha-soluble NSF attachment protein	A	K1P7K8_CRAGI	Vesicle-fusing ATPase 1
m6A	K1Q667_CRAGI	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	A	K1QHK9_CRAGI	Dynein heavy chain, cytoplasmic
m6A	K1QBM3_CRAGI	Ras-related protein Rab-2	A	K1Q7Q2_CRAGI	CCAAT/enhancer-binding protein zeta
m6A	K1R7L4_CRAGI	Neural cell adhesion molecule 1	A	K1Q880_CRAGI	Transportin-1
m6A	K1PH13_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	A	K1Q253_CRAGI	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT
m6A	K1QAI2_CRAGI	Ufm1-specific protease 2	A	K1QGA7_CRAGI	Kynurenine formamidase
m6A	K1RJW8_CRAGI	Protein DEK	A	K1QAL3_CRAGI	RNA-binding protein 28
m6A	K1QKG8_CRAGI	Upstream activation factor subunit spp27	A	K1PXS8_CRAGI	Calreticulin
m6A	K1R150_CRAGI	Ras-related protein Rab-1A	A	K1QTP6_CRAGI	Cation-transporting ATPase
m6A	K1PI40_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PR25_CRAGI	Regulator of differentiation 1
m6A	K1PZT2_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	A	K1PA61_CRAGI	Actin-like protein 6A
m6A	K1PJB0_CRAGI	Heat shock protein 70 B2	A	K1QAA8_CRAGI	CAAX prenyl protease 1-like protein
m6A	K1PR25_CRAGI	Regulator of differentiation 1	A	K1PY30_CRAGI	Septin-2
m6A	K1QMV5_CRAGI	Annexin	A	K1R100_CRAGI	Metaxin-2
m6A	K1Q0N6_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	A	K1PTL4_CRAGI	Odr-4-like protein
m6A	K1QY58_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	A	K1QA50_CRAGI	V-type proton ATPase subunit H
m6A	K1RIJ1_CRAGI	Synaptobrevin (Fragment)	A	K1PVH5_CRAGI	Centromere/kinetochore protein zw10-like protein
m6A	K1PNC7_CRAGI	AFG3-like protein 2	A	K1PUQ5_CRAGI	Histone H2B
m6A	K1QQR1_CRAGI	Major vault protein	A	K1RFB1_CRAGI	Stomatin-like protein 2 (Fragment)
m6A	K1R5V4_CRAGI	GTP-binding nuclear protein	A	K1QAA2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QGA7_CRAGI	Kynurenine formamidase	A	K1PNC7_CRAGI	AFG3-like protein 2
m6A	K1PTV1_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 4	A	K1PJ57_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase
m6A	K1P3Q5_CRAGI	Programmed cell death 6-interacting protein	A	K1PLF9_CRAGI	Arginine kinase
m6A	K1R2G9_CRAGI	SEC13-like protein	A	K1RC37_CRAGI	Uncharacterized protein

m6A	K1PF96_CRAGI	Spliceosome RNA helicase BAT1	A	K1PKD4_CRAGI	40S ribosomal protein S30
m6A	K1R1F0_CRAGI	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	A	K1RDS1_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 2
m6A	K1Q5Z1_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1Q5Z1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q880_CRAGI	Transportin-1	A	K1PF96_CRAGI	Spliceosome RNA helicase BAT1
m6A	K1PDF8_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	A	K1QTW6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F
m6A	K1PMY9_CRAGI	Calmodulin	A	K1RAU8_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
m6A	K1PPW8_CRAGI	Coatomer subunit beta	A	K1RAI3_CRAGI	Annexin
m6A	K1QZQ8_CRAGI	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	A	K1PUX5_CRAGI	Casein kinase II subunit alpha
m6A	K1QE43_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PDF8_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
m6A	K1RDS1_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	A	K1QXH3_CRAGI	Translational activator GCN1
m6A	K1RAI3_CRAGI	Annexin	A	K1PQE3_CRAGI	RNA-binding protein Raly
m6A	K1PCR5_CRAGI	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2	A	K1QWE5_CRAGI	Ras-related protein Rab-18-B
m6A	K1QWP1_CRAGI	Nucleoporin seh1	A	K1R5G4_CRAGI	60S ribosomal protein L31
m6A	K1QAL1_CRAGI	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	A	K1RCT2_CRAGI	Translocon-associated protein subunit delta
m6A	K1Q2H5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RFU6_CRAGI	Proteasome activator complex subunit 3
m6A	K1REPO_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1ROW0_CRAGI	Ferritin
m6A	K1PKI9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1Q5Z6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2
m6A	K1RG79_CRAGI	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6	A	K1RKE5_CRAGI	IQ and AAA domain-containing protein 1
m6A	K1Q1L4_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1P8G6_CRAGI	Vesicular integral-membrane protein VIP36
m6A	K1QTP6_CRAGI	Cation-transporting ATPase	A	K1P3Q5_CRAGI	Programmed cell death 6-interacting protein
m6A	K1Q615_CRAGI	Peroxiredoxin-1	A	K1Q615_CRAGI	Peroxiredoxin-1
m6A	K1QZ7_CRAGI	Programmed cell death protein 6	A	K1RG04_CRAGI	ALK tyrosine kinase receptor
m6A	K1R0D7_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (Fragment)	A	K1QQK5_CRAGI	Metabotropic glutamate receptor 2
m6A	K1QTW3_CRAGI	Murinoglobulin-2	A	K1R3G0_CRAGI	Transformer-2-like protein beta
m6A	K1PDL3_CRAGI	Ribosomal protein L19	A	K1QCB0_CRAGI	40S ribosomal protein S5
m6A	K1QW21_CRAGI	39S ribosomal protein L40, mitochondrial	A	K1REQ4_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 6B
m6A	K1Q317_CRAGI	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	A	K1QHI2_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
m6A	K1QKG9_CRAGI	Cysteine desulfurase, mitochondrial	A	K1PSH2_CRAGI	28S ribosomal protein S12, mitochondrial
m6A	K1PS77_CRAGI	Prostaglandin G/H synthase 1	A	K1R9P5_CRAGI	Mitochondrial import receptor subunit TOM70
m6A	K1QJW6_CRAGI	Translocon-associated protein subunit gamma	A	K1PGK7_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QTV1_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QPF0_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QTW6_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	A	K1QT00_CRAGI	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
m6A	K1PNY5_CRAGI	Splicing factor, proline-and glutamine-rich	A	K1RG28_CRAGI	Kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2
m6A	K1R100_CRAGI	Metaxin-2	A	K1PMY9_CRAGI	Calmodulin
m6A	K1R8L1_CRAGI	Exportin-2	A	K1R1Q8_CRAGI	Ras-related protein Rab-5C
m6A	K1QZ64_CRAGI	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	A	K1RPP1_CRAGI	Synaptophysin
m6A	K1QWZ8_CRAGI	Catenin beta	A	K1RFU8_CRAGI	High mobility group protein DSP1
m6A	K1QAT9_CRAGI	ATP-dependent RNA helicase DDX1	A	K1PJ85_CRAGI	26S protease regulatory subunit 6A
m6A	K1P8Y9_CRAGI	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	A	K1R2G9_CRAGI	SEC13-like protein
m6A	K1PIC5_CRAGI	Transmembrane protein 85	A	K1QJW6_CRAGI	Translocon-associated protein subunit gamma
m6A	K1QMV7_CRAGI	V-type proton ATPase subunit D	A	K1R5B9_CRAGI	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial
m6A	K1RC37_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R8C6_CRAGI	40S ribosomal protein S12
m6A	K1PEY4_CRAGI	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	A	K1QSR2_CRAGI	Apoptosis inhibitor 5
m6A	K1RG04_CRAGI	ALK tyrosine kinase receptor	A	K1Q5E0_CRAGI	Dual specificity protein kinase CLK2
m6A	K1QG72_CRAGI	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor	A	K1QBM3_CRAGI	Ras-related protein Rab-2
m6A	K1RK83_CRAGI	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	A	K1Q8K9_CRAGI	KRR1 small subunit processome component-like protein
m6A	K1QMT1_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily B member 4	A	K1QNU0_CRAGI	Non-specific serine/threonine protein kinase
m6A	K1P8I1_CRAGI	Pleckstrin-like protein domain-containing family F member 2 (Fragment)	A	K1RDM2_CRAGI	60S ribosomal protein L18a
m6A	K1R3I6_CRAGI	Nucleolar complex protein 2-like protein (Fragment)	A	K1RD12_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QDB9_CRAGI	Transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2 (Fragment)	A	K1QGP7_CRAGI	Uncharacterized protein



m6A	K1QMJ8_CRAGI	Transcription initiation factor IIA subunit 1	A	K1PBL2_CRAGI	Eukaryotic initiation factor 4A-III
m6A	K1R5G4_CRAGI	60S ribosomal protein L31	A	K1QAT9_CRAGI	ATP-dependent RNA helicase DDX1
m6A	K1R1W9_CRAGI	Nicalin-1	A	K1QWJ4_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 5
m6A	K1QDA7_CRAGI	Uracil phosphoribosyltransferase	A	K1Q412_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QI02_CRAGI	Vesicle-trafficking protein SEC22b	A	K1R8R6_CRAGI	Fructose-bisphosphate aldolase
m6A	K1QFZ8_CRAGI	Ceramide kinase-like protein	A	K1RWP3_CRAGI	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial
m6A	K1Q151_CRAGI	60S ribosomal protein L32	A	K1PGN0_CRAGI	Fatty-acid amide hydrolase 2
m6A	K1QNS4_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily C member 9	A	K1PUV4_CRAGI	40S ribosomal protein S24
m6A	K1REQ4_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 6B	A	K1PJY2_CRAGI	Inositol polyphosphate 1-phosphatase
m6A	K1R4B8_CRAGI	Plexin domain-containing protein 2	A	K1QWZ8_CRAGI	Catenin beta
m6A	K1QC10_CRAGI	GTP-binding protein 1	A	K1R1F0_CRAGI	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
m6A	K1PJY2_CRAGI	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	A	K1PN47_CRAGI	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial
m6A	K1R983_CRAGI	Protein transport protein SEC23	A	K1QYQ9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q5Y3_CRAGI	Annexin	A	K1PNZ8_CRAGI	Ribosomal protein L37
m6A	K1Q1N1_CRAGI	Alpha-mannosidase	A	K1PVD7_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial
m6A	K1QNU0_CRAGI	Non-specific serine/threonine protein kinase	A	K1QEJ0_CRAGI	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2
m6A	K1R1Q8_CRAGI	Ras-related protein Rab-5C	A	K1PYL5_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RH95_CRAGI	Myosin-IIIB	A	K1QQQ5_CRAGI	Replication factor C subunit 5
m6A	K1QWE5_CRAGI	Ras-related protein Rab-18-B	A	K1RFA3_CRAGI	Lamin Dm0
m6A	K1QCB0_CRAGI	40S ribosomal protein S5	A	K1RRH1_CRAGI	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein Mi-2-like protein
m6A	K1Q0I8_CRAGI	Putative splicing factor, arginine/serine-rich 7	A	K1Q2Y1_CRAGI	40S ribosomal protein S15
m6A	K1QXF5_CRAGI	Calcyphosin-like protein	A	K1RIZ9_CRAGI	Band 4.1-like protein 5
m6A	K1R8C6_CRAGI	40S ribosomal protein S12	A	K1QV10_CRAGI	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial
m6A	K1QFA9_CRAGI	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	A	K1PS77_CRAGI	Prostaglandin G/H synthase 1
m6A	K1QYF5_CRAGI	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	A	K1QZK9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QA50_CRAGI	V-type proton ATPase subunit H	A	K1R9V5_CRAGI	Tetraspanin
m6A	K1PY39_CRAGI	Protocadherin Fat 4	A	K1PPV1_CRAGI	Atlastin-2
m6A	K1Q330_CRAGI	Dihydrolipoyl dehydrogenase	A	K1R0Z4_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q350_CRAGI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A	K1R1R9_CRAGI	Pre-mRNA-processing factor 6
m6A	K1Q6U7_CRAGI	78 kDa glucose-regulated protein	A	K1QKU6_CRAGI	mRNA export factor
m6A	K1RBI9_CRAGI	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	A	K1PCR5_CRAGI	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2
m6A	K1P0H0_CRAGI	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	A	K1R7L4_CRAGI	Neural cell adhesion molecule 1
m6A	K1QSR2_CRAGI	Apoptosis inhibitor 5	A	K1QAL1_CRAGI	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7
m6A	K1RDV7_CRAGI	Cell division control protein 2-like protein (Fragment)	A	K1QB65_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
m6A	K1PD30_CRAGI	Putative histone-binding protein Caf1	A	K1QVP6_CRAGI	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1
m6A	K1P7K8_CRAGI	Vesicle-fusing ATPase 1	A	K1QNT4_CRAGI	Anoctamin
m6A	K1PVZ3_CRAGI	Cold shock domain-containing protein E1	A	K1QMT1_CRAGI	DnaJ-like protein subfamily B member 4
m6A	K1RKZ5_CRAGI	DNA damage-binding protein 1	A	K1RCF4_CRAGI	Translocon-associated protein subunit alpha
m6A	K1R0Z4_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QJL6_CRAGI	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3
m6A	K1Q947_CRAGI	Dynein light chain	A	K1QPY8_CRAGI	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
m6A	K1PU46_CRAGI	Lethal(2) giant larvae-like protein 1	A	K1R5V4_CRAGI	GTP-binding nuclear protein
m6A	K1Q8K9_CRAGI	KRR1 small subunit processome component-like protein	A	K1RNU5_CRAGI	Pre-mRNA-splicing factor RBM22
m6A	K1PQZ3_CRAGI	Armadillo repeat-containing protein 4	A	K1QK68_CRAGI	Myosin-2 essential light chain
m6A	K1QL00_CRAGI	Microsomal glutathione S-transferase 1	A	K1QED7_CRAGI	Replication protein A subunit
m6A	K1RDM2_CRAGI	60S ribosomal protein L18a	A	K1QP51_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase
m6A	K1Q3V9_CRAGI	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	A	K1PD36_CRAGI	Ubiquitin
m6A	K1QN55_CRAGI	60S acidic ribosomal protein P1	A	K1R4B8_CRAGI	Plexin domain-containing protein 2
m6A	K1R3G0_CRAGI	Transformer-2-like protein beta	A	K1RHP3_CRAGI	Proliferation-associated protein 2G4
m6A	K1PWM3_CRAGI	MICOS complex subunit MIC13	A	K1QE43_CRAGI	Uncharacterized protein

m6A	K1QKL8_CRAGI	V-type proton ATPase subunit a	A	K1R3I6_CRAGI	Nucleolar complex protein 2-like protein (Fragment)
m6A	K1S6T6_CRAGI	UPF0480 protein C15orf24-like protein	A	K1QMJ8_CRAGI	Transcription initiation factor IIA subunit 1
m6A	K1R0W0_CRAGI	Ferritin	A	K1QXF5_CRAGI	Calcyphosin-like protein
m6A	K1PGK7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R5I2_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QY7I_CRAGI	Histone H2B	A	K1QM06_CRAGI	Prohibitin
m6A	K1QNT7_CRAGI	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	A	K1R275_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX52
m6A	K1RJ96_CRAGI	Sphere organelles protein SPH-1	A	K1QSB2_CRAGI	26S protease regulatory subunit 6B
m6A	K1RZE2_CRAGI	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	A	K1QBW6_CRAGI	Tudor domain-containing protein 1
m6A	K1PPV1_CRAGI	Atlastin-2	A	K1PZT2_CRAGI	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial
m6A	K1P9F1_CRAGI	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain	A	K1QIZ7_CRAGI	Programmed cell death protein 6
m6A	K1QVU0_CRAGI	Synaptojanin-2-binding protein	A	K1QDA7_CRAGI	Uracil phosphoribosyltransferase
m6A	K1QX44_CRAGI	Ras-related protein Rab-11B	A	K1R40I_CRAGI	Spectrin alpha chain
m6A	K1QKU6_CRAGI	mRNA export factor	A	K1P54I_CRAGI	Alpha-soluble NSF attachment protein
m6A	K1QDV6_CRAGI	Protein argonaute-2	A	K1PND7_CRAGI	Fatty acid synthase
m6A	K1R5B9_CRAGI	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial	A	K1R8L1_CRAGI	Exportin-2
m6A	K1RCT2_CRAGI	Translocon-associated protein subunit delta	A	K1QEF9_CRAGI	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K
m6A	K1PKD4_CRAGI	40S ribosomal protein S30	A	K1Q2W7_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PP50_CRAGI	Golgi integral membrane protein 4	A	K1RYM7_CRAGI	LAG1 longevity assurance-like protein 6
m6A	K1PG60_CRAGI	60S ribosomal protein L17	A	K1PY09_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QWJ4_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 5	A	K1QI05_CRAGI	Ferrochelatase
m6A	K1RB9I_CRAGI	Neutral alpha-glucosidase AB	A	K1PD30_CRAGI	Putative histone-binding protein Caf1
m6A	K1RD12_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QDB9_CRAGI	Transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2 (Fragment)
m6A	K1PQE3_CRAGI	RNA-binding protein Raly	A	K1QTW3_CRAGI	Murinoglobulin-2
m6A	K1Q2Y1_CRAGI	40S ribosomal protein S15	A	K1PVG9_CRAGI	Malectin
m6A	K1PQF1_CRAGI	Neural cell adhesion molecule L1	A	K1Q3V9_CRAGI	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein
m6A	K1QKJ0_CRAGI	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	A	K1QVS0_CRAGI	Ras-like GTP-binding protein Rho1
m6A	K1PUQ5_CRAGI	Histone H2B	A	K1PX68_CRAGI	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
m6A	K1Q2W7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RPF7_CRAGI	60S ribosomal protein L5
m6A	K1Q4I2_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QZ64_CRAGI	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96
m6A	K1RNH1_CRAGI	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	A	K1QSV1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QNT4_CRAGI	Anoctamin	A	K1Q2L4_CRAGI	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9
m6A	K1P8B7_CRAGI	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Fragment)	A	K1RMM6_CRAGI	Centromere protein J
m6A	K1QID7_CRAGI	Putative rRNA-processing protein EBP2	A	K1QKK2_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial
m6A	K1PY30_CRAGI	Septin-2	A	K1PNV6_CRAGI	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1
m6A	K1QIR1_CRAGI	Exostosin-3	A	K1PNQ1_CRAGI	Ankyrin repeat domain-containing protein 5
m6A	K1RHP3_CRAGI	Proliferation-associated protein 2G4	A	K1QKQ8_CRAGI	THO complex subunit 4-A
m6A	K1PZI3_CRAGI	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	A	K1QAG9_CRAGI	Ferritin
m6A	K1QT97_CRAGI	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	A	K1QHW8_CRAGI	Ferritin
m6A	K1QQQ5_CRAGI	Replication factor C subunit 5	A	K1RFV5_CRAGI	ATP-dependent RNA helicase DDX1
m6A	K1PA6I_CRAGI	Actin-like protein 6A	A	K1RNH1_CRAGI	60S ribosomal protein L18 (Fragment)
m6A	K1PNL0_CRAGI	Microtubule-associated protein futsch	A	K1PPQ1_CRAGI	14-3-3 protein gamma
m6A	K1QI28_CRAGI	V-type proton ATPase subunit B	A	K1QQV0_CRAGI	Histone H1.2
m6A	K1PYL5_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QIR1_CRAGI	Exostosin-3
m6A	K1PJ65_CRAGI	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7	A	K1QYF5_CRAGI	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial
m6A	K1QMD8_CRAGI	Proteasome subunit alpha type	A	K1RZE2_CRAGI	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
m6A	K1Q2L4_CRAGI	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	A	K1QL00_CRAGI	Microsomal glutathione S-transferase 1
m6A	K1Q8C1_CRAGI	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	A	K1QTV1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PS7I_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1RZM3_CRAGI	Cartilage acidic protein 1
m6A	K1Q900_CRAGI	Galectin	A	K1Q0I8_CRAGI	Putative splicing factor, arginine/serine-rich 7

m6A	K1RKR8_CRAGI	Pumilio-like protein 2	A	K1RP91_CRAGI	Putative RNA exonuclease NEF-sp
m6A	K1RKE5_CRAGI	IQ and AAA domain-containing protein 1	A	K1PG60_CRAGI	60S ribosomal protein L17
m6A	K1QRL4_CRAGI	Importin-5	A	K1QTP4_CRAGI	5'-3' exoribonuclease
m6A	K1PGN0_CRAGI	Fatty-acid amide hydrolase 2	A	K1RG79_CRAGI	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6
m6A	K1RD83_CRAGI	Serine hydroxymethyltransferase	A	K1Q947_CRAGI	Dynein light chain
m6A	K1RFA3_CRAGI	Lamin Dm0	A	K1RJ91_CRAGI	Ubiquitin-associated protein 2
m6A	K1QAG7_CRAGI	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	A	K1Q2Z5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX46
m6A	K1PJP7_CRAGI	Surfeit locus protein 4	A	K1PYA0_CRAGI	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
m6A	K1PG07_CRAGI	Lupus La-like protein	A	K1QAV0_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein G(Q) subunit alpha
m6A	K1QVS0_CRAGI	Ras-like GTP-binding protein Rho1	A	K1RKR8_CRAGI	Pumilio-like protein 2
m6A	K1PWC3_CRAGI	Tetratricopeptide repeat protein 35	A	K1QZI3_CRAGI	Myosin-Ie
m6A	K1QZK9_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1R5R4_CRAGI	Dynein heavy chain 10, axonemal
m6A	K1QAG9_CRAGI	Ferritin	A	K1QKG8_CRAGI	Upstream activation factor subunit spp27
m6A	K1QHW8_CRAGI	Ferritin	A	K1P8I1_CRAGI	Pleckstrin-like protein domain-containing family F member 2 (Fragment)
m6A	K1PZF2_CRAGI	Exportin-7	A	K1Q1N1_CRAGI	Alpha-mannosidase
m6A	K1RCF4_CRAGI	Translocon-associated protein subunit alpha	A	K1PXB6_CRAGI	Cadherin-23
m6A	K1QVI0_CRAGI	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	A	K1QXA9_CRAGI	Sortilin-related receptor
m6A	K1PX47_CRAGI	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	A	K1PVG0_CRAGI	Long-chain fatty acid transport protein 4
m6A	K1P8G6_CRAGI	Vesicular integral-membrane protein VIP36	A	K1PBG6_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PNZ8_CRAGI	Ribosomal protein L37	A	K1PP50_CRAGI	Golgi integral membrane protein 4
m6A	K1Q373_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	A	K1QCQ5_CRAGI	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial
m6A	K1R0U6_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PK87_CRAGI	Putative E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
m6A	K1QAV0_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein G(Q) subunit alpha	A	K1Q373_CRAGI	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
m6A	K1R8Y1_CRAGI	Obg-like ATPase 1	A	K1Q151_CRAGI	60S ribosomal protein L32
m6A	K1QBY6_CRAGI	Transmembrane protein Tmp21	A	K1QZ95_CRAGI	Nuclear pore complex protein
m6A	K1QZ58_CRAGI	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	A	K1PPH0_CRAGI	Gamma-tubulin complex component
m6A	K1RAE9_CRAGI	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	A	K1R0R7_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX36
m6A	K1RCW5_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	A	K1R247_CRAGI	Condensin complex subunit 1
m6A	K1PZ89_CRAGI	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	A	K1QIB2_CRAGI	Mitogen-activated protein kinase
m6A	K1PBG6_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QG61_CRAGI	Acetolactate synthase-like protein
m6A	K1QPS1_CRAGI	Poly [ADP-ribose] polymerase	A	K1RBC9_CRAGI	Transketolase-like protein 2
m6A	K1R1C5_CRAGI	Signal recognition particle receptor subunit beta	A	K1RCW5_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
m6A	K1PVG0_CRAGI	Long-chain fatty acid transport protein 4	A	K1PQZ3_CRAGI	Armadillo repeat-containing protein 4
m6A	K1QXA1_CRAGI	Retinol dehydrogenase 12	A	K1PYJ8_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R481_CRAGI	Epimerase family protein SDR39U1	A	K1QQP1_CRAGI	Programmed cell death protein 4
m6A	K1QVP6_CRAGI	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	A	K1PQY0_CRAGI	Protein quiver
m6A	K1PWB7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PLC6_CRAGI	Nucleolar protein 14
m6A	K1PNQ1_CRAGI	Ankyrin repeat domain-containing protein 5	A	K1QV25_CRAGI	Transcription elongation factor B polypeptide 2
m6A	K1Q8C5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX47	A	K1QZ50_CRAGI	RNA-dependent RNA polymerase
m6A	K1PR38_CRAGI	TAR DNA-binding protein 43	A	K1QXH7_CRAGI	DNA replication licensing factor mcm4-B
m6A	K1P7Q6_CRAGI	40S ribosomal protein S19	A	K1PDE4_CRAGI	Protein arginine N-methyltransferase
m6A	K1RFD2_CRAGI	Adenylate kinase	A	K1QT36_CRAGI	Golgi resident protein GCP60
m6A	K1PQJ9_CRAGI	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	A	K1PZ89_CRAGI	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
m6A	K1Q4U7_CRAGI	AP-3 complex subunit delta-1	A	K1Q7A7_CRAGI	Putative tyrosinase-like protein tyr-3
m6A	K1QM06_CRAGI	Prohibitin	A	K1R481_CRAGI	Epimerase family protein SDR39U1
m6A	K1QUW5_CRAGI	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	A	K1RJ35_CRAGI	All-trans-retinol 13,14-reductase
m6A	K1PD36_CRAGI	Ubiquitin	A	Q70MT4_CRAGI	40S ribosomal protein S10
m6A	K1PBL2_CRAGI	Eukaryotic initiation factor 4A-III	A	K1REV3_CRAGI	DNA polymerase delta subunit 2
m6A	K1R3V8_CRAGI	COP9 signalosome complex subunit 4	A	K1P9F1_CRAGI	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain
m6A	K1PII4_CRAGI	YTH domain-containing protein 1	A	K1PJ65_CRAGI	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7
m6A	K1PZL0_CRAGI	B-box type zinc finger protein ncl-1	A	K1Q2T0_CRAGI	ADP-dependent glucokinase



m6A	K1REW8_CRAGI	Ribosomal protein L15	A	K1PZI3_CRAGI	SWI/SNF complex subunit SMARCC2
m6A	K1R9V5_CRAGI	Tetraspanin	A	K1Q8C5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX47
m6A	K1QPX1_CRAGI	ATPase family AAA domain-containing protein 3	A	K1QZ58_CRAGI	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit
m6A	K1QHI2_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	A	K1RR98_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2
m6A	K1QZ95_CRAGI	Nuclear pore complex protein	A	K1QMT2_CRAGI	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11
m6A	K1R401_CRAGI	Spectrin alpha chain	A	K1PWM3_CRAGI	MICOS complex subunit MIC13
m6A	K1PSA1_CRAGI	Transmembrane 9 superfamily member	A	K1QMM4_CRAGI	Leucine zipper transcription factor-like protein 1
m6A	K1Q486_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1QMV7_CRAGI	V-type proton ATPase subunit D
m6A	K1PYA0_CRAGI	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	A	K1QKI1_CRAGI	Tudor domain-containing protein 1
m6A	K1QLC6_CRAGI	JmjC domain-containing protein 8	A	K1POH0_CRAGI	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
m6A	K1RDG4_CRAGI	DNA helicase	A	K1PVQ8_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K
m6A	K1PQY0_CRAGI	Protein quiver	A	K1Q5P0_CRAGI	60S ribosomal protein L17
m6A	K1QTD5_CRAGI	Low-density lipoprotein receptor-related protein 12	A	K1QJ36_CRAGI	Muscle, skeletal receptor tyrosine protein kinase
m6A	K1PSP7_CRAGI	Uncharacterized protein	A	K1PHS4_CRAGI	Ribosome-binding protein 1
m6A	K1QAL3_CRAGI	RNA-binding protein 28	A	K1QQB4_CRAGI	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
m6A	K1QND2_CRAGI	Septin-2	A	K1QYM4_CRAGI	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial
m6A	K1RMM6_CRAGI	Centromere protein J	A	K1P2G0_CRAGI	Strawberry notch-like protein 1
m6A	K1R1K6_CRAGI	Heat shock protein beta-1	A	K1QCT0_CRAGI	Sideroflexin
m6A	K1R3Z4_CRAGI	5'-3' exoribonuclease 1	A	K1QFG2_CRAGI	Telomere-associated protein RIF1
m6A	K1RB56_CRAGI	Ferritin	A	K1Q5J7_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RIZ9_CRAGI	Band 4.1-like protein 5	A	K1QKA9_CRAGI	Piwi-like protein 2
m6A	K1RFB1_CRAGI	Stomatin-like protein 2 (Fragment)	A	K1P7Q6_CRAGI	40S ribosomal protein S19
m6A	K1RNI9_CRAGI	Leucine-rich repeat-containing protein 59	A	K1QYV5_CRAGI	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1-B
m6A	K1Q7U7_CRAGI	Basigin	A	K1QG84_CRAGI	THO complex subunit 2
m6A	K1RXN0_CRAGI	Small nuclear ribonucleoprotein E	A	K1R7G0_CRAGI	Chromobox-like protein 5
m6A	K1P5F7_CRAGI	Metastasis-associated protein MTA1	A	K1QHX4_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PVG9_CRAGI	Malectin	A	K1QBY6_CRAGI	Transmembrane protein Tmp21
m6A	K1R247_CRAGI	Condensin complex subunit 1	A	K1PKK7_CRAGI	AP-2 complex subunit mu-1
m6A	K1PSN0_CRAGI	Pre-mRNA-processing factor 40-like protein A	A	K1P9V5_CRAGI	General transcription factor IIF subunit 1
m6A	K1PZV3_CRAGI	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein (Fragment)	A	K1Q9V2_CRAGI	Antigen KI-67
m6A	K1RWP3_CRAGI	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	A	K1PNU2_CRAGI	Histone-arginine methyltransferase CARM1
m6A	K1Q7E4_CRAGI	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	A	K1Q109_CRAGI	Neurexin-4
m6A	K1RK33_CRAGI	Exportin-1	A	K1P9Q2_CRAGI	Signal peptidase complex subunit 3
m6A	K1RPP1_CRAGI	Synaptophysin	A	K1QCN0_CRAGI	Signal recognition particle 9 kDa protein
m6A	K1Q5P0_CRAGI	60S ribosomal protein L17	A	K1Q7E4_CRAGI	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
m6A	K1PND7_CRAGI	Fatty acid synthase	A	K1Q5G6_CRAGI	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
m6A	K1R0R7_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX36	A	K1RUW0_CRAGI	E3 SUMO-protein ligase RanBP2
m6A	K1QJL6_CRAGI	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	A	K1RB91_CRAGI	Neutral alpha-glucosidase AB
m6A	K1QKZ6_CRAGI	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	A	K1QGF1_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 2
m6A	Q70MT4_CRAGI	40S ribosomal protein S10	A	K1Q525_CRAGI	Mechanosensory protein 2 (Fragment)
m6A	K1RP91_CRAGI	Putative RNA exonuclease NEF-sp	A	K1RDB3_CRAGI	F-box/WD repeat-containing protein 1A
m6A	K1PKK7_CRAGI	AP-2 complex subunit mu-1	A	K1QJ28_CRAGI	V-type proton ATPase subunit B
m6A	K1PLR8_CRAGI	Chromosome transmission fidelity protein 18-like protein (Fragment)	A	K1R4J0_CRAGI	MAGUK p55 subfamily member 2
m6A	K1PH10_CRAGI	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	A	K1Q9T7_CRAGI	Afadin-and alpha-actinin-binding protein
m6A	K1P2G0_CRAGI	Strawberry notch-like protein 1	A	K1RNH6_CRAGI	Toll-like receptor 3
m6A	K1PNU2_CRAGI	Histone-arginine methyltransferase CARM1	A	K1PZC0_CRAGI	Structural maintenance of chromosomes protein
m6A	K1QZJ6_CRAGI	Uncharacterized protein (Fragment)	A	K1PT69_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1PXB6_CRAGI	Cadherin-23	A	K1RE67_CRAGI	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase
m6A	K1QCK4_CRAGI	CLIP-associating protein 1	A	K1QCX5_CRAGI	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2

m6A	K1PPH0_CRAGI	Gamma-tubulin complex component
m6A	K1Q105_CRAGI	Ferrochelatase
m6A	K1QF52_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q2Z5_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX46
m6A	K1PXI0_CRAGI	Angiotensin-converting enzyme 4
m6A	K1RPF7_CRAGI	60S ribosomal protein L5
m6A	K1QV25_CRAGI	Transcription elongation factor B polypeptide 2
m6A	K1PUJ1_CRAGI	Radixin
m6A	K1QHT0_CRAGI	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial
m6A	K1QMK5_CRAGI	Kinesin-associated protein 3
m6A	K1QQ16_CRAGI	AP complex subunit beta
m6A	K1QZ49_CRAGI	Adipocyte plasma membrane-associated protein
m6A	K1QIB2_CRAGI	Mitogen-activated protein kinase
m6A	K1QXH7_CRAGI	DNA replication licensing factor mcm4-B
m6A	K1QQV0_CRAGI	Histone H1.2
m6A	K1QG61_CRAGI	Acetolactate synthase-like protein
m6A	K1R5R4_CRAGI	Dynein heavy chain 10, axonemal
m6A	K1R4J0_CRAGI	MAGUK p55 subfamily member 2
m6A	K1RR98_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2
m6A	K1Q5E0_CRAGI	Dual specificity protein kinase CLK2
m6A	K1R275_CRAGI	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX52
m6A	K1RFV5_CRAGI	ATP-dependent RNA helicase DDX1
m6A	K1QNZ7_CRAGI	Ubiquilin-1
m6A	K1QZ50_CRAGI	RNA-dependent RNA polymerase
m6A	K1QHX4_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q455_CRAGI	Netrin-3
m6A	K1QQL6_CRAGI	Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
m6A	K1RZM3_CRAGI	Cartilage acidic protein 1
m6A	K1R065_CRAGI	Golgi membrane protein 1
m6A	K1RD19_CRAGI	RNA-binding protein 4
m6A	K1R969_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1RE19_CRAGI	V-type proton ATPase subunit S1
m6A	K1QGW5_CRAGI	WD repeat and SOF domain-containing protein 1
m6A	K1QKI1_CRAGI	Tudor domain-containing protein 1
m6A	K1PSH2_CRAGI	28S ribosomal protein S12, mitochondrial
m6A	K1QMT2_CRAGI	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11
m6A	K1QDIO_CRAGI	Transmembrane protein 49
m6A	K1Q8T3_CRAGI	Importin subunit alpha
m6A	K1Q525_CRAGI	Mechanosensory protein 2 (Fragment)
m6A	K1Q5G6_CRAGI	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
m6A	K1QHF0_CRAGI	40S ribosomal protein S27
m6A	K1Q7X3_CRAGI	Pre-mRNA-splicing factor SYF1
m6A	K1RRH1_CRAGI	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein Mi-2-like protein
m6A	K1Q435_CRAGI	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
m6A	K1RNS1_CRAGI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
m6A	K1QGF9_CRAGI	Rootletin
m6A	K1QJ36_CRAGI	Muscle, skeletal receptor tyrosine protein kinase
m6A	K1RNU5_CRAGI	Pre-mRNA-splicing factor RBM22
m6A	K1R916_CRAGI	Structural maintenance of chromosomes protein
m6A	K1RUC9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QR54_CRAGI	Zinc finger RNA-binding protein
m6A	K1P9Q2_CRAGI	Signal peptidase complex subunit 3

A	K1QBT8_CRAGI	Uncharacterized protein
A	K1RFF1_CRAGI	Uncharacterized protein
A	K1RS40_CRAGI	Uncharacterized protein
A	K1R8V1_CRAGI	Puratrophin-1

m6A	K1RTR1_CRAGI	ATP-citrate synthase
m6A	K1Q050_CRAGI	Centrin-3
m6A	K1QPA5_CRAGI	Uncharacterized protein C16orf61-like protein
m6A	K1PSY2_CRAGI	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
m6A	K1R7G0_CRAGI	Chromobox-like protein 5
m6A	K1QFG2_CRAGI	Telomere-associated protein RIF1
m6A	K1QYV5_CRAGI	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1-B
m6A	K1R1I2_CRAGI	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
m6A	K1R255_CRAGI	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
m6A	K1RB07_CRAGI	60S ribosomal protein L27a
m6A	K1RYF2_CRAGI	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 3, mitochondrial
m6A	K1RJ53_CRAGI	Tetratricopeptide repeat protein 12
m6A	K1QW73_CRAGI	Glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A
m6A	K1RBC9_CRAGI	Transketolase-like protein 2
m6A	K1QJ46_CRAGI	Putative methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
m6A	K1Q9V2_CRAGI	Antigen KI-67
m6A	K1PWQ2_CRAGI	60 kDa neurofilament protein
m6A	K1QGF1_CRAGI	Splicing factor 3B subunit 2
m6A	K1QTE0_CRAGI	Epidermal retinal dehydrogenase 2
m6A	K1PPQ1_CRAGI	14-3-3 protein gamma
m6A	K1Q7A7_CRAGI	Putative tyrosinase-like protein tyr-3
m6A	K1QHA2_CRAGI	Spectrin beta chain, brain 4
m6A	K1Q6U0_CRAGI	Coatmer subunit zeta-1
m6A	K1QU16_CRAGI	Protein polybromo-1
m6A	K1P7W5_CRAGI	Histone H1-delta
m6A	K1QBL6_CRAGI	Tudor domain-containing protein 1
m6A	K1QVS1_CRAGI	ER membrane protein complex subunit 3
m6A	K1Q1L9_CRAGI	Interferon-induced protein 44-like protein
m6A	K1Q109_CRAGI	Neurexin-4
m6A	K1PJN7_CRAGI	PC3-like endoprotease variant A
m6A	K1RAH1_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1R472_CRAGI	Synaptobrevin-like protein YKT6
m6A	K1QMY9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1QBT8_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1Q1R2_CRAGI	Caprin-2
m6A	K1R8V1_CRAGI	Puratrophin-1
m6A	K1PUF0_CRAGI	G-protein coupled receptor moody
m6A	K1Q4R2_CRAGI	Zinc finger protein 26
m6A	K1QXP9_CRAGI	Uncharacterized protein
m6A	K1P6M6_CRAGI	Cerebellin-1

**Data S3:** Complete list of GO terms of clustered genes of m6A interacting proteins (p-value<0,05)

<b>Cluster</b>	<b>term_ID</b>	<b>description</b>	<b>log10 p-value</b>	<b>Class</b>
cluster1	GO:0006172	ADP biosynthetic process	-2,848	Biological process
cluster1	GO:0006886	intracellular protein transport	-6,1176	Biological process
cluster1	GO:0015031	protein transport	-1,6944	Biological process
cluster1	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	-1,8071	Biological process
cluster1	GO:0030833	regulation of actin filament polymerization	-2,5256	Biological process
cluster1	GO:0006563	L-serine metabolic process	-2,3716	Biological process
cluster1	GO:0006544	glycine metabolic process	-2,0706	Biological process
cluster1	GO:0016192	vesicle-mediated transport	-3,119	Biological process
cluster1	GO:0006429	leucyl-tRNA aminoacylation	-2,1763	Biological process
cluster1	GO:0006413	translational initiation	-1,3708	Biological process
cluster1	GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	-1,9328	Biological process
cluster1	GO:0048280	vesicle fusion with Golgi apparatus	-2,3699	Biological process
cluster1	GO:0006888	ER to Golgi vesicle-mediated transport	-1,4737	Biological process
cluster1	GO:0030117	membrane coat	-3,0546	Cellular component
cluster1	GO:0030127	COPII vesicle coat	-1,6994	Cellular component
cluster1	GO:0030131	clathrin adaptor complex	-1,5595	Cellular component
cluster1	GO:0005737	cytoplasm	-2,3551	Cellular component
cluster1	GO:0031105	septin complex	-2,0349	Cellular component
cluster1	GO:0005850	eukaryotic translation initiation factor 2 complex	-2,6924	Cellular component
cluster1	GO:0005856	cytoskeleton	-1,6967	Cellular component
cluster1	GO:0005750	mitochondrial respiratory chain complex III	-1,9328	Cellular component
cluster1	GO:0000139	Golgi membrane	-1,4267	Cellular component
cluster1	GO:0003743	translation initiation factor activity	-2,6564	Molecular function
cluster1	GO:0004372	glycine hydroxymethyltransferase activity	-2,3716	Molecular function
cluster1	GO:0005488	binding	-1,66	Molecular function
cluster1	GO:0008565	protein transporter activity	-2,7964	Molecular function
cluster1	GO:0004823	leucine-tRNA ligase activity	-2,1763	Molecular function
cluster1	GO:0008242	omega peptidase activity	-2,0158	Molecular function
cluster1	GO:0008536	Ran GTPase binding	-1,4396	Molecular function
cluster1	GO:0005525	GTP binding	-1,9855	Molecular function
cluster1	GO:0016813	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amidines	-1,9675	Molecular function
cluster1	GO:0002161	aminoacyl-tRNA editing activity	-1,4387	Molecular function
cluster1	GO:0016776	phosphotransferase activity, phosphate group as acceptor	-2,0567	Molecular function
cluster1	GO:0005543	phospholipid binding	-1,3689	Molecular function
cluster1	GO:0004017	adenylate kinase activity	-2,2504	Molecular function
cluster1	GO:0019205	nucleobase-containing compound kinase activity	-1,9387	Molecular function
cluster1	GO:0019904	protein domain specific binding	-1,4245	Molecular function
cluster1	GO:0004843	thiol-dependent ubiquitin-specific protease activity	-1,6596	Molecular function
cluster1	GO:0003779	actin binding	-1,33	Molecular function
cluster 2	GO:0006376	mRNA splice site selection	-2,2802	Biological process
cluster 2	GO:0016192	vesicle-mediated transport	-1,9467	Biological process
cluster 2	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	-1,895	Biological process
cluster 2	GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	-1,4434	Biological process
cluster 2	GO:0006281	DNA repair	-1,946	Biological process
cluster 2	GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	-1,9132	Biological process
cluster 2	GO:0006606	protein import into nucleus	-1,6687	Biological process
cluster 2	GO:0006367	transcription initiation from RNA polymerase II promoter	-1,8729	Biological process
cluster 2	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	-1,8902	Biological process
cluster 2	GO:0051276	chromosome organization	-1,9322	Biological process
cluster 2	GO:0005685	U1 snRNP	-2,0889	Cellular component
cluster 2	GO:0005694	chromosome	-1,6569	Cellular component
cluster 2	GO:0019773	proteasome core complex, alpha-subunit complex	-1,7608	Cellular component
cluster 2	GO:0005839	proteasome core complex	-1,4434	Cellular component

cluster 2	GO:0005643	nuclear pore	-1,5471	Cellular component
cluster 2	GO:0003938	IMP dehydrogenase activity	-2,5964	Molecular function
cluster 2	GO:0005488	binding	-5,6024	Molecular function
cluster 2	GO:0008536	Ran GTPase binding	-3,3815	Molecular function
cluster 2	GO:0008565	protein transporter activity	-1,3099	Molecular function
cluster 2	GO:0017056	structural constituent of nuclear pore	-2,5981	Molecular function
cluster 2	GO:0016844	strictosidine synthase activity	-2,4472	Molecular function
cluster 2	GO:0042578	phosphoric ester hydrolase activity	-2,0068	Molecular function
cluster 2	GO:0008641	small protein activating enzyme activity	-1,8257	Molecular function
cluster 2	GO:0003729	mRNA binding	-1,9507	Molecular function
cluster 2	GO:0000166	nucleotide binding	-1,9175	Molecular function
cluster 2	GO:0030554	adenyl nucleotide binding	-1,4276	Molecular function
cluster 2	GO:0004175	endopeptidase activity	-1,4434	Molecular function
cluster 2	GO:0004298	threonine-type endopeptidase activity	-1,4434	Molecular function
cluster 3	GO:0006184	(obsolete) GTP catabolic process	-1,3497	Biological process
cluster 3	GO:0007156	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	-1,6645	Biological process
cluster 3	GO:0008152	metabolic process	-1,9382	Biological process
cluster 3	GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	-4,8627	Biological process
cluster 3	GO:0006096	glycolytic process	-1,4156	Biological process
cluster 3	GO:0051258	protein polymerization	-2,6757	Biological process
cluster 3	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	-2,0966	Biological process
cluster 3	GO:0006388	tRNA splicing, via endonucleolytic cleavage and ligation	-1,523	Biological process
cluster 3	GO:0006879	cellular iron ion homeostasis	-1,4857	Biological process
cluster 3	GO:0007017	microtubule-based process	-2,4915	Biological process
cluster 3	GO:0006412	translation	-2,0331	Biological process
cluster 3	GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	-2,0662	Biological process
cluster 3	GO:0000276	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	-4,1068	Cellular component
cluster 3	GO:0005750	mitochondrial respiratory chain complex III	-2,0662	Cellular component
cluster 3	GO:0045261	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	-2,0025	Cellular component
cluster 3	GO:0005874	microtubule	-2,2282	Cellular component
cluster 3	GO:0005882	intermediate filament	-1,9067	Cellular component
cluster 3	GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	-2,1492	Cellular component
cluster 3	GO:0005852	eukaryotic translation initiation factor 3 complex	-1,6821	Cellular component
cluster 3	GO:0005737	cytoplasm	-1,9776	Cellular component
cluster 3	GO:0005840	ribosome	-2,0503	Cellular component
cluster 3	GO:0043234	protein complex	-2,6757	Cellular component
cluster 3	GO:0004739	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity	-2,8179	Molecular function
cluster 3	GO:0016624	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide as acceptor	-2,0554	Molecular function
cluster 3	GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	-2,3865	Molecular function
cluster 3	GO:0005525	GTP binding	-1,9304	Molecular function
cluster 3	GO:0015078	hydrogen ion transmembrane transporter activity	-3,0193	Molecular function
cluster 3	GO:0046961	proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	-1,6263	Molecular function
cluster 3	GO:0046933	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	-1,7326	Molecular function
cluster 3	GO:0004775	succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity	-2,3995	Molecular function
cluster 3	GO:0046912	transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	-2,3982	Molecular function
cluster 3	GO:0016874	ligase activity	-1,4798	Molecular function
cluster 3	GO:0048037	cofactor binding	-1,6628	Molecular function
cluster 3	GO:0008199	ferric iron binding	-1,4607	Molecular function
cluster 3	GO:0005544	calcium-dependent phospholipid binding	-1,6049	Molecular function
cluster 3	GO:0003878	ATP citrate synthase activity	-2,3995	Molecular function
cluster 3	GO:0003735	structural constituent of ribosome	-1,9881	Molecular function

**Table S1:** Transitions used for each compound. A: first transition, B: second transition

<b>Nucleoside</b>	<b>Retention time (min)</b>	<b>MRM precursor (m/z)</b>	<b>MRM product (m/z)</b>		<b>Collision Energy (V)</b>	
			<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>A</b>	3.07	268.0	135.9	119.0	-30	-12
<b>m<sup>6</sup>A</b>	2.12	282.0	150.1	123.1	-17	-46

**Table S2:** Correspondence between development stages in our study, and the GigaTON database.

<b>Development stages : This Study</b>	<b>Development stages : GigaTON [52]</b>
<b>Oocytes</b>	E (Eggs)
<b>2/8 Cells</b>	TC (Two Cell embryos)
	FC (Four Cell embryos)
	EM (Early Morula)
<b>Morula</b>	M (Morula)
<b>Blastula</b>	B (Blastula)
	RM (Rotary Movement)
<b>Gastrula</b>	FS (Free Swimming)
	EG (Early Gastrula)
	G (Gastrula)
	T (Trochophore) 1
<b>Trochophore</b>	T2
	T3
	T4
	T5
	ED (Early D larvae) 1
<b>D larvae</b>	ED2
	D (D larvae)1
	D2
	D3
	D4
	D5
<b>Spat</b>	S (Spat)
<b>Juvenile</b>	J (Juvenile)



## 4. Bilan du chapitre I

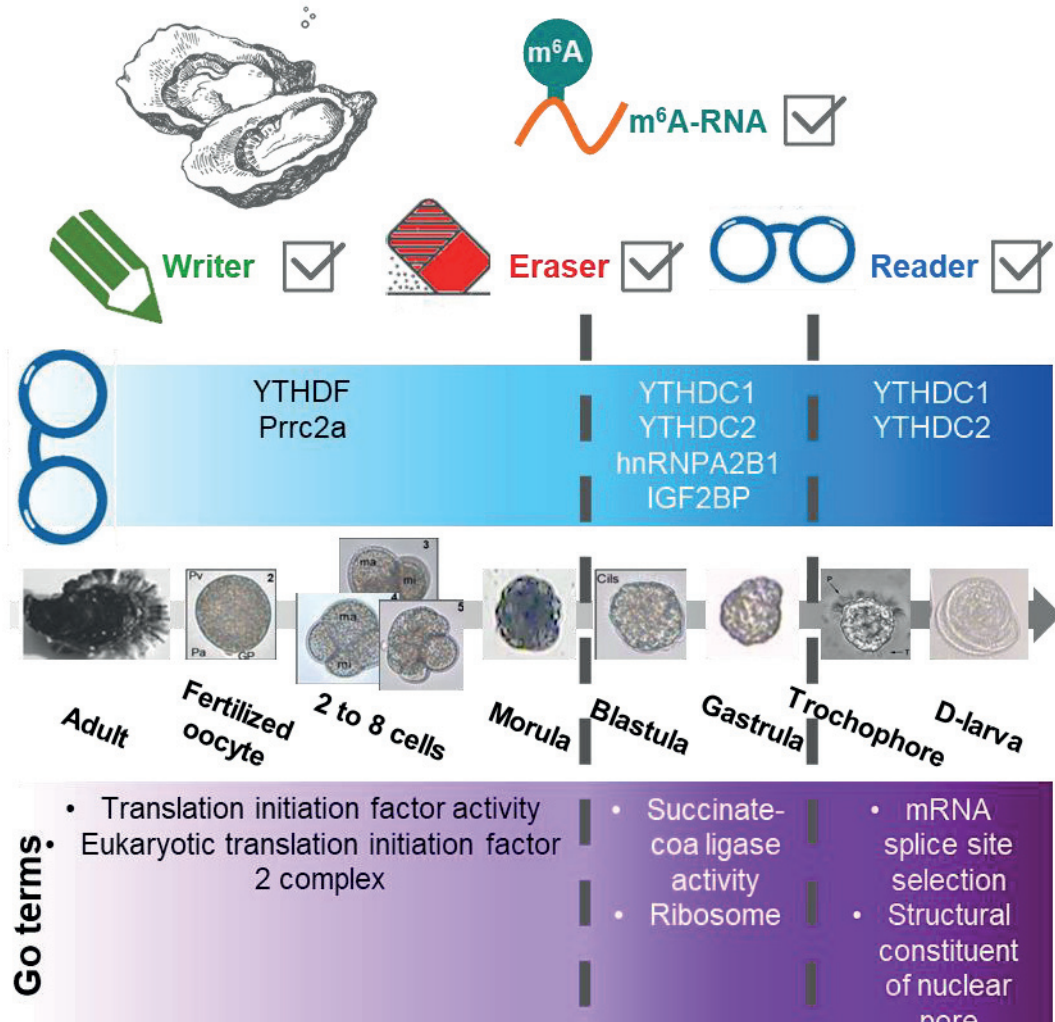


Figure 21 : Schéma bilan du chapitre I

L'étude de la conservation de la m<sup>6</sup>A et de sa machinerie met en évidence la conservation de cette marque épitranscriptomique et une dynamique spécifique sur les ARN polyadénylés différente de celle observée sur les ARN totaux, au cours du développement de *C. gigas*. Les trois classes de protéines qui composent la machinerie (*writers*, *erasers* et *readers*) sont potentiellement conservées et régulées lors du développement embryo-larvaire de l'huître creuse. De plus, nous avons confirmé la liaison de protéines à un m<sup>6</sup>A-oligonucléotide. Ces potentiels *readers* sont impliqués dans l'initiation de la traduction lors de la segmentation, l'apport d'énergie et l'intégration de signaux lors de la gastrulation, et l'épissage et l'export nucléaire après la gastrulation. L'ensemble de ces résultats évoque un rôle de la m<sup>6</sup>A dans le développement embryo-larvaire de *C. gigas* et plus particulièrement dans la MZT, la gastrulation et la différenciation cellulaire.



**Chapitre II :**  
**Caractérisation des profils  
développementaux de la  
 $N^6$ -methyladenosine**



## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

### 1. Préambule

Le développement des Bilatériens passe par une succession d'étapes et la formation de transcriptomes spécifiques qui sont contrôlés par une machinerie moléculaire complexe. Cette machinerie comprend des acteurs de régulation pré-transcriptionnelle, qui influencent notamment la formation de l'hétérochromatine, et transcriptionnelle en régulant la liaison du complexe de transcription à un gène cible. À cela s'ajoute une voie de régulation post-transcriptionnelle basée sur le devenir des ARN. Récemment, il a été mis en évidence la présence d'une voie post-transcriptionnelle *via* les modifications de l'ARN. La N<sup>6</sup>-méthyladénosine est un des composants de cette machinerie qui contrôle notamment la MZT et la différenciation cellulaire, des étapes clés du développement (Zhao *et al.*, 2017, Heck et Wilusz, 2019).

Bien que, dans le chapitre précédent nous ayons démontré la conservation d'une voie épitranscriptomique chez *C. gigas*, le rôle de la m<sup>6</sup>A reste inconnu. Grâce à la technique du MeRIP-seq nous avons générés les méthylomes de 10 stades de développement allant de l'ovocyte jusqu'au naissain. L'analyse de ces méthylomes a permis de mettre en évidence une méthylation sur différents types d'ARN codants et non-codants dont le niveau mais aussi la localisation sont dynamiques au cours du développement de l'huître creuse. Cette dynamique divise le développement en quatre étapes qui sont la segmentation, la gastrulation, la différenciation tissulaire et la métamorphose pendant lesquelles la m<sup>6</sup>A semble jouer un rôle crucial. En effet, l'analyse des fonctions associées aux ARNm différenciellement méthylés montre une potentielle régulation de la division cellulaire, la transduction de signaux, la morphogenèse et la différenciation cellulaire par la m<sup>6</sup>A. L'ensemble de ces résultats montre pour la première fois, à notre connaissance, un rôle de la m<sup>6</sup>A conservé dans le développement d'un Lophotrochozoaire et apporte de nouvelles données sur le contrôle et l'évolution du développement des Bilatériens.

**Profiling of N<sup>6</sup>-methyladenosine dynamics indicates regulation of oyster development by m<sup>6</sup>A-RNA epitranscriptomes.**

Lorane Le Franc<sup>1</sup>, Bruno Petton<sup>2</sup>, Pascal Favrel<sup>1</sup>, Guillaume Rivière<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 Caen, France.

Laboratoire Biologie des organismes et Ecosystèmes aquatiques (BOREA), Muséum d'Histoire naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, Université des Antilles, CNRS UMR 8067, IRD, Esplanade de la paix, 14032 Caen, France.

<sup>2</sup>Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre Bretagne, 29280, Plouzané, France

**Abstract**

The N<sup>6</sup>-methylation of RNA adenosines (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) has recently emerged as an important layer of the gene expression regulatory network with critical implications in vertebrate and insect development. However, despite an m<sup>6</sup>A-RNA pathway is present in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, the developmental significance of epitranscriptomes in lophotrochozoan organisms remains unknown.

Using MeRIP-seq, we generated transcriptome-wide m<sup>6</sup>A-RNA methylomes of 10 embryo-larval to post-metamorphosis stages covering the whole development of the pacific oyster from oocytes to juvenile animals. We found that oyster RNA classes display specific m<sup>6</sup>A signatures, with mRNAs and lncRNAs exhibiting distinct profiles and being highly methylated compared to DNA transposon transcripts. Epitranscriptomes are dynamic and correspond to chronological steps of oyster development (cleavage, gastrulation, tissues differentiation and metamorphosis). They are marked with an overall drop of mRNA and lncRNA methylation at the morula stage followed by a global increase up to pre-metamorphosis. Messenger RNA m<sup>6</sup>A levels are correlated to transcript content and shifts in methyladenine profiles correspond to expression kinetics. Differentially methylated transcripts cluster according to embryo-larval stages and bear the corresponding developmental functions including the regulation of cell division, signal transduction, morphogenesis and cell differentiation processes. The m<sup>6</sup>A of TE transcripts is also regulated and peaks during the gastrulation.

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

Altogether our results indicate that m<sup>6</sup>A epitranscriptomes are an important regulator of oyster development, potentially involved in the cleavage, maternal-to-zygotic transition and cell differentiation. This first epitranscriptome profiling across the development of a lophotrochozoan model brings new insights into the epigenetic control of developmental processes and their evolution.

**Keywords:** Epitranscriptomes, m<sup>6</sup>A, RNA, development, oyster.



## 2. Introduction

The success of development of metazoan organisms is conditioned by precise temporo-spatial regulation of gene expression. The N<sup>6</sup>-methylation of RNA adenosines (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) has recently emerged as a critical layer of the gene expression regulatory network. Indeed, in vertebrates m<sup>6</sup>A-RNA methylation is a required for the proper regulation of developmental processes such as cell differentiation (Ping *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2017, 2020b), X chromosome inactivation (Patil *et al.*, 2016, Coker *et al.*, 2020), maternal-to-zygotic transition (MZT) (Zhao *et al.*, 2017, Sui *et al.*, 2020), neurogenesis (Yoon *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2018b, Edens *et al.*, 2019), gametogenesis (Ivanova *et al.*, 2017, Lasman *et al.*, 2020a, Zeng *et al.*, 2020) and the invalidation of enzymes which deposit m<sup>6</sup>A on RNA is lethal during the early development (Wang *et al.*, 2014c, Geula *et al.*, 2015).

The m<sup>6</sup>A-RNA methylation is regulated by an enzymatic machinery composed of writers and erasers. Writers include the methyltransferase core complex METTL3, METTL14 and WTAP and its associated proteins (Yang *et al.*, 2018b), which catalyze the deposition of methyl marks at the consensus sequence DRACH (D=A/G/T, R=A/G, H=A/C/T) (Meyer *et al.*, 2012, Batista *et al.*, 2014, Ke *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Xiao *et al.*, 2019). Erasers as ALKBH5 (Zheng *et al.*, 2013, Mauer *et al.*, 2017) and the controversial FTO (Jia *et al.*, 2011, Mauer *et al.*, 2017) remove the methylation. The combined action of m<sup>6</sup>A writers and erasers make m<sup>6</sup>A profiles highly dynamic during the development of investigated species (Zhao *et al.*, 2017, Knuckles *et al.*, 2018, Sui *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2021). The biological effects of RNA methylation are mediated by reader proteins able to bind m<sup>6</sup>A. For example, the YTH protein family of readers is involved in RNA stability, translation (Wang *et al.*, 2014a, 2015, Shi *et al.*, 2017, Hsu *et al.*, 2017), splicing (Xiao *et al.*, 2016) and nuclear export (Roundtree *et al.*, 2017). Other readers are involved in RNA maturation like hnRNPA2B1 (Alarcón *et al.*, 2015), in m<sup>6</sup>A-RNA stability as IGF2BP (Huang *et al.*, 2018) and Prrc2a (Wu *et al.*, 2018b) and eIF3a which guides cap-independent translation of m<sup>6</sup>A-RNAs (Meyer *et al.*, 2015). This machinery allows guiding the methylation on specific RNA targets to modulate their cellular fate. As a result, m<sup>6</sup>A is a chemical modification that influences gene expression without modifying the associated transcript nucleic acid sequence and is therefore referred to as 'epitranscriptomic' (Saletore *et al.*, 2012).

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

Many RNA species are subjected to m<sup>6</sup>A methylation, which is the most abundant internal modification in eukaryotic messenger RNAs (mRNAs). Up to date, elucidation of m<sup>6</sup>A distribution in RNA mostly relies on m<sup>6</sup>A-RNA immunoprecipitation combined with next generation sequencing. MeRIP-seq (or m<sup>6</sup>A-seq) (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012) and miCLIP (Linder *et al.*, 2015, Ke *et al.*, 2015) are the two major techniques. While miCLIP includes a crosslinking step before m<sup>6</sup>A-RNA immunoprecipitation that allows a better resolution, both methodologies revealed that N<sup>6</sup>-methyladenosines in mRNAs were mostly found in the 3' untranslated transcribed region (UTR) at the vicinity of the stop codon (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012, Linder *et al.*, 2015, Ke *et al.*, 2015). However, m<sup>6</sup>A is also present at lower levels in 5'-UTRs (Meyer *et al.*, 2015, Coots *et al.*, 2017), long internal exons (Dominissini *et al.*, 2012, Batista *et al.*, 2014) and introns (Louloupi *et al.*, 2018, Xiao *et al.*, 2019).

While the N<sup>6</sup>-methyladenosine pattern is well described on mRNA targets, this epitranscriptomic mark is also found in non-coding RNAs (ncRNAs). The m<sup>6</sup>A-methylation modulates the microRNAs (miRNAs) maturation (Alarcón *et al.*, 2015), the translation (Yang *et al.*, 2017b) and stability (Park *et al.*, 2019) of circular RNAs (circRNAs), and the mRNA stability (Zhou *et al.*, 2017). The N<sup>6</sup>-methyladenosine content controls the conformation of small nuclear RNAs (snRNAs) such as splicing factors U6 snRNA (Warda *et al.*, 2017) and of small nucleolar RNAs (snoRNAs) (Huang *et al.*, 2017). In vertebrates more than 300 lncRNAs were demonstrated as m<sup>6</sup>A-methylated (Meyer *et al.*, 2012), a modification that alters the RNA structure towards an increased accessibility thereby protein interaction (Liu *et al.*, 2017). In lncRNAs, m<sup>6</sup>A also affects their subcellular localization (Wu *et al.*, 2019c) and stability (Ni *et al.*, 2019). In addition, the m<sup>6</sup>A-modification of lncRNAs can have functional outcomes, as indicated by the requirement of m<sup>6</sup>A-methylation of the XIST lncRNA for the transcriptional silencing of the inactivated X chromosome (Patil *et al.*, 2016). The m<sup>6</sup>A in RNA encoded by transposable element genes (repeat RNAs) (Wan *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2020c) increases their stability and promotes chromatin compaction (Liu *et al.*, 2020c).

Aside Vertebrates, the N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of RNA was described in a wide diversity of organisms, such as insects (Lence *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, 2020, Jiang *et al.*, 2019), yeast (Schwartz *et al.*, 2013) and plants (Chmielowska-Bąk *et al.*, 2019). However, despite the developmental significance of m<sup>6</sup>A is conserved across evolution, several differences exist between animal groups. Indeed, in the fruit

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

fly, m<sup>6</sup>A is mostly present in the 5'UTR of mRNAs throughout head and embryo development (Kan *et al.*, 2017, 2020, Soldano *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020b) whereas methylation enrichment at 5'UTRs promotes cap-independent translation for transcript selection during stress response in Vertebrates (Zhou *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Coots *et al.*, 2017). In *Bombyx mori*, mRNA is mostly m<sup>6</sup>A-methylated in coding sequences (CDS) and not UTRs, and is associated to the diapause (Li *et al.*, 2019) and a higher m<sup>6</sup>A content and gene expression regulation is found upstream the diapause (Jiang *et al.*, 2019). Finally, in *C.elegans*, only few actors of the m<sup>6</sup>A machinery are present and methylation is mostly found in rRNAs (Sendinc *et al.*, 2020). This situation opens crucial questions about the evolution of m<sup>6</sup>A-related molecular pathways, target genes and developmental significance that require investigations in divergent models. However, despite being of utmost importance for our understanding of the evolution of the molecular control of developmental processes, there is a critical lack of knowledge in lophotrochozoan organisms where epitranscriptomes were not investigated to date to our knowledge.

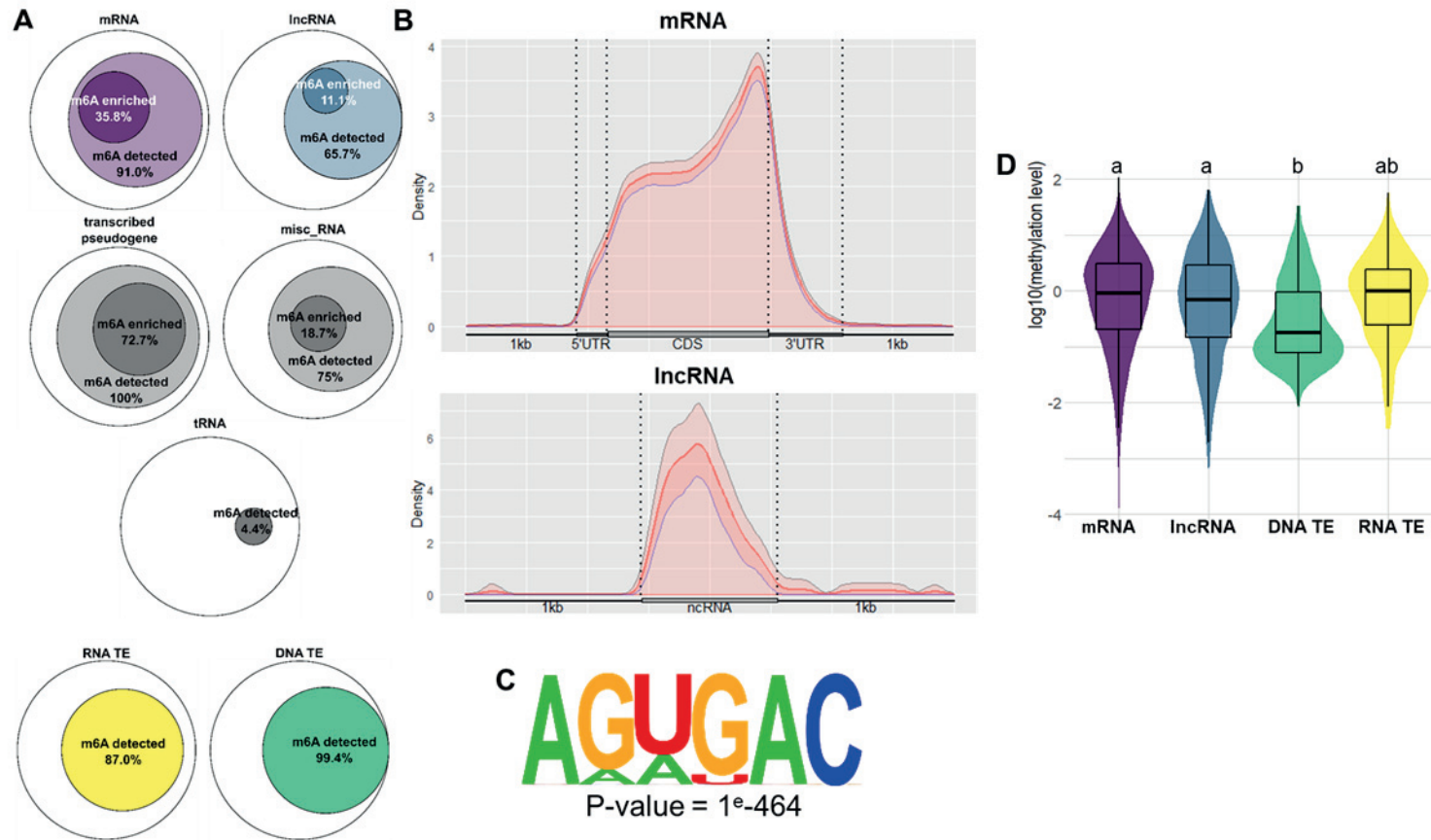
The Pacific oyster *Crassostrea gigas* (i.e. *Magallana gigas*) is a bivalve mollusc whose great ecological and economical significance allowed its emergence as a model species within lophotrochozoan organisms. As such, an important amount of genetic, transcriptomic and epigenetic data has been generated in this model. Besides, the embryo-larval development of *C.gigas* is under the strong epigenetic influence of DNA methylation (Riviere *et al.*, 2013, 2017, Saint-carlier et Riviere, 2015, Rondon *et al.*, 2017, Sussarellu *et al.*, 2018) and histone marks (Fellous *et al.*, 2014b, 2014a, 2019). Moreover, it has recently been demonstrated that m<sup>6</sup>A and its complete associated machinery are present in the oyster. This conservation exhibits features that strongly suggest of an epitranscriptomic regulation of early development up to the organogenesis completion (Le Franc *et al.*, 2020). Oysters develop as pelagic larvae in sea water before they settle and metamorphose into fixed adult specimen. Therefore oyster early life stages are directly subjected to the variations of external environmental conditions such as temperature changes, UV exposure or endocrine disruptor contamination, that are described to influence m<sup>6</sup>A-RNA methylation (Zhou *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Xiang *et al.*, 2017, Lu *et al.*, 2019, Cayir *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2020a). These features are highly suggestive of a functional significance of m<sup>6</sup>A-RNA methylation in oyster development., which remains unknown to date.

To answer these questions, we characterized the transcriptome-wide dynamics of m<sup>6</sup>A-methylomes across the entire development of the pacific oyster from the oocytes to the completion of the organogenesis. We used MeRIP-seq to investigate the dynamics of m<sup>6</sup>A levels, localization, target RNA subsets and functional implications in a distant model to provide a better understanding of the evolution of developmental mechanisms and their epigenetic regulation.

### 3. Results

#### Oyster RNA classes display specific developmental m<sup>6</sup>A signatures

In developing oysters, m<sup>6</sup>A methylation affects a vast majority of RNA classes, and is detected in 91.0% of mRNAs, 65,7% of lncRNAs, 87.0% of RNA TEs and 99.4% of DNA TEs. In contrast, oyster tRNA are mostly unmethylated (rRNA were not investigated here). In addition, 35.8% of mRNAs and 11.1% of lncRNAs display a significant m<sup>6</sup>A enrichment regarding the level of the input background (**Figure 22A**). The methylation pattern depends on the RNA species considered. While m<sup>6</sup>A in mRNA is found from the 5'UTR to the 3'UTR, but more abundant around the stop codon, it is more randomly spread along lncRNAs (**Figure 22B**). m<sup>6</sup>A-methylation affects adenosines located within the 'AGUGA\*C' sequence (where \* marks the modified adenosine) which contains the conserved consensus motif 'DRA\*CH' (**Figure 22C**) (Meyer *et al.*, 2012, Batista *et al.*, 2014, Ke *et al.*, 2015, Meyer *et al.*, 2015, Xiao *et al.*, 2019). The mean methylation level differs between RNA classes and whereas mRNAs, lncRNAs and RNA TE RNAs display high methylation levels, DNA TE RNAs are significantly less methylated than mRNAs and lncRNAs (**Figure 22D**). The MeRIP-seq procedure was validated by investigation of the status of five transcripts exhibiting contrasted m<sup>6</sup>A vs. mRNA profiles in other species (*c-Myc*, *KLF*, *METTL3*, *hnRNPA2B1* and *Oct4*) by targeted MeRIP-qPCR. All the examined candidates displayed similar patterns between the two techniques. For example, *c-Myc* and *METTL3* showed important and minimum methylation levels respectively (**Figure S1**).



**Figure 22 : N<sup>6</sup>-methyladenosine signatures of oyster RNA classes.**

**A:** m<sup>6</sup>A distribution among RNA classes (mRNA, messenger RNA; lncRNA, long non-coding RNA; DNA TE, DNA transposable element RNA; RNA TE, RNA transposable element RNA; misc. RNA, miscellaneous RNA; tRNA, transfer RNA). Diagram diameter was normalized between RNA classes. **B.** m<sup>6</sup>A localization along mRNAs and ncRNAs. UTR, untranslated region; CDS, coding sequence; kb, kilobase. **C.** Consensus sequence of the m<sup>6</sup>A motif in the oyster identified by HOMER. **D.** Violin plot of the mean methylation level of the methylated transcripts of mRNA, lncRNA, DNA and RNA (n=) TE classes during oyster development. Letters discriminate significantly different methylation levels (ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, p<0,05). E: Egg, FE: Fertilized egg, 2/8C: Two to eight cells, M: Morula, B: Blastula, G: Gastrula, T: Trochophore, D: D-larva, P: Pediveliger, S: Spat. mRNA (messenger RNA), lncRNA (long non coding RNA), DNA TE (DNA transposable element), RNA TE (RNA transposable element), misc. RNA (miscellaneous RNA), tRNA (transfer RNA).



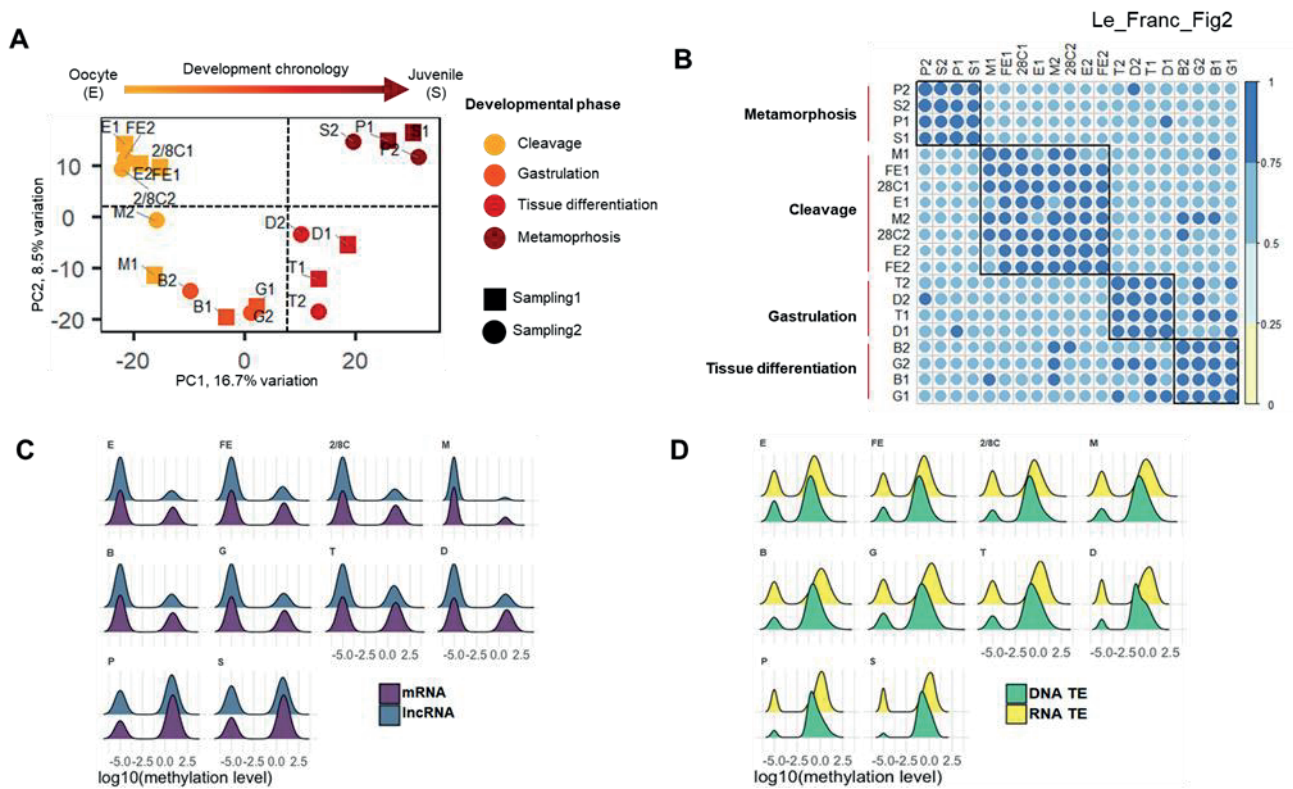
### **Oyster m<sup>6</sup>A epitranscriptomes are dynamic and correspond to defined steps of development chronology.**

The Principal Component Analysis (PCA) of MeRIP-seq data indicates that the samples group together according to the embryo-larval stages irrespective of the sampling experiment (**Figure 23A**). The PC1 and PC2 explain 16.7% and 8.5% of the variability, respectively, and the samples are overall ordered chronologically along the X-axis (PC1). The PCA plot can be divided into four areas defining four developmental phases: cleavage (from oocytes to 2-8 cell-stage), gastrulation (blastula and gastrula stages), tissue differentiation (trochophore and D-larvae stages) and metamorphosis (pediveliger and spat stages). The morula stage is clearly individualized along the PC2, suggesting peculiar m<sup>6</sup>A-methylation and development features. This segregation is further confirmed by the pairwise correlation matrix, which also indicated a surprising proximity of cleavage and metamorphosis epitranscriptomic profiles (**Figure 23B**). The chronological segregation of developmental stages according to m<sup>6</sup>A methylation indicates that m<sup>6</sup>A-RNA epitranscriptomes are an important component of the developmental process. The m<sup>6</sup>A epitranscriptomes are dynamic during oyster development and also RNA class-specific. There is an important drop in the number of methylated transcripts at the morula stage followed by a general shift towards increased m<sup>6</sup>A-methylated mRNAs and lncRNAs onwards, which is especially marked at the late development stages (i.e. pediveliger and spat stages) (**Figure 23C**). The same tendency is also observed, although less importantly, for TE RNAs which unmethylated population becomes reduced in the late developmental phases (**Figure 23D**). These results show that oyster development is associated to m<sup>6</sup>A epitranscriptome dynamics.

### **mRNA m<sup>6</sup>A profiles are regulated and associated to expression level and dynamics throughout oyster development**

The mRNA m<sup>6</sup>A profile is highly dynamic during oyster development. Indeed, among the significantly methylated mRNAs (n= 8404), 17.8% of m<sup>6</sup>A-mRNA (n=1494) display a significant variation in their m<sup>6</sup>A level (**Figure 24A**), and their methylation level is significantly correlated to their expression level (**Figure 24B**). The differentially methylated m<sup>6</sup>A-mRNAs define 4 clusters according to their methylation (and expression) profiles, according to the developmental steps defined previously.

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la $N^6$ -méthyladénosine



**Figure 23 : Epitranscriptome dynamics during oyster development.**

**A.** Principal component analysis of MeRIP-seq results. PCA plot of the first two principal components of the MeRIP-seq results for each developmental sample of the two distinct experiments. **B.** Similarity (pairwise Pearson's correlation matrix) of  $m^6A$ -methylation between samples based on IP/Input signal (see methods). **C.** Dynamics of the  $m^6A$ -methylation level of the mRNA (purple) and lncRNA (blue) transcripts. All the transcripts found  $m^6A$ -enriched over background using MetPeak are represented. Areas under the curve are normalized for each RNA class. Undetectable methylation was arbitrarily affected a -5 value for representation purpose. **D.** Dynamics of the  $m^6A$ -methylation level of the DNA TE (green) and RNA TE (yellow) transcripts. All the transcripts whose methylation was detected in at least one stage are represented on the density plots. Areas under the curve are normalized for each RNA class. Undetectable methylation was arbitrarily affected a -5 value for representation purpose. E: Egg, FE: Fertilized egg, 2/8C: Two to eight cells, M: Morula, B: Blastula, G: Gastrula, T: Trochophore, D: D larvae, P: Pediveliger, S: Spat.

E: Egg (oocyte), FE: Fertilized egg, 2/8C: Two to eight cell-stage, M: Morula, B: Blastula, G: Gastrula, T: Trochophore, D: D-larva, P: Pediveliger, S: Spat. mRNA (messenger RNA), lncRNA (long non coding RNA), DNA TE (DNA transposable element), RNA TE (RNA transposable element).



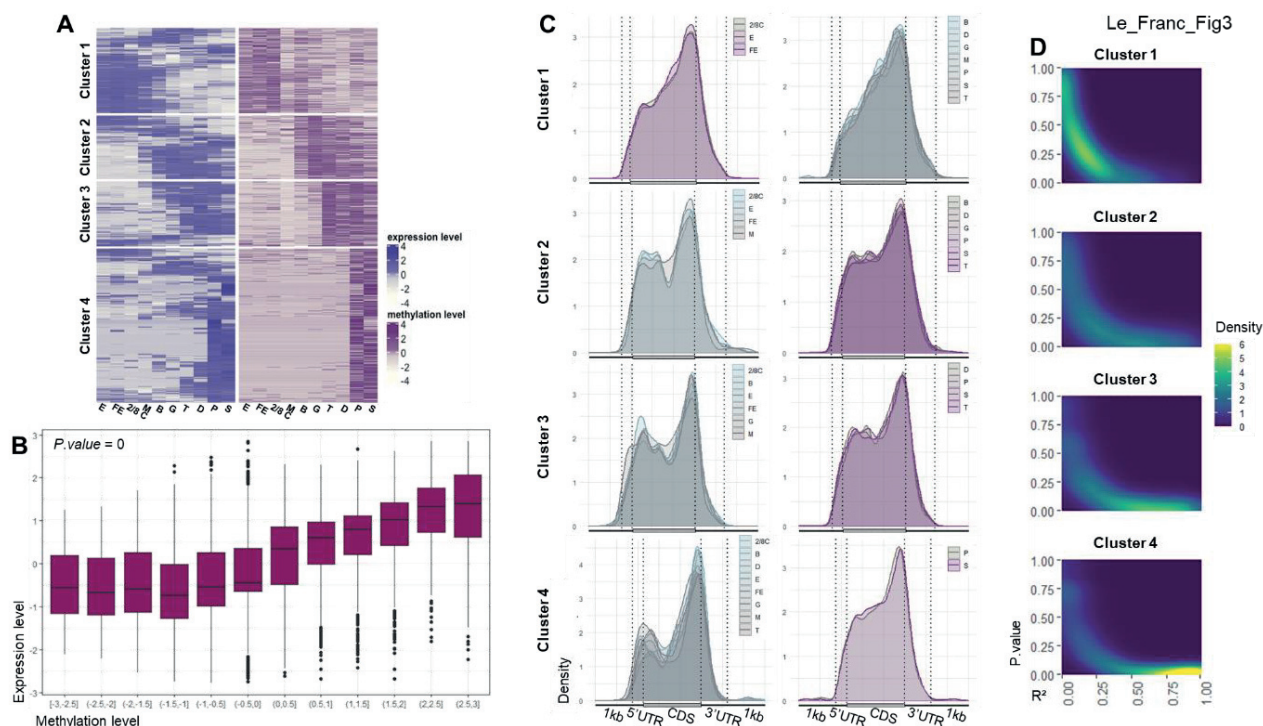
The cluster 1 includes mRNAs with a strong methylation and transcript content in the early stages (up to the morula stage) which decreases afterwards. By contrast, the mRNAs within the three other clusters display poor methylation during early stages which strongly increases from the gastrulation (cluster 2), the trochophore stage (cluster 3) and the pediveliger stage (cluster4), and remain strongly methylated afterwards. Overall, there is a marked decrease of m<sup>6</sup>A methylation at the morula stage.

Besides the level of methylation, the localization of m<sup>6</sup>A within mRNAs can also depend on the cluster considered. Indeed, cluster 1 mRNAs, that are mostly maternal mRNAs, are methylated mostly around their stop codon and this localization remains unchanged. By contrast, mRNAs within the three other clusters, that are mostly expressed from the zygotic genome, display a marked biphasic profile with a relative increase in their 5'-m<sup>6</sup>A content at the vicinity of the CDS start and start codon when little expressed (**Figure 24C**). However, this pattern shifts towards a less biphasic, dominant around the stop codon in the later development stages when their methylation and expression levels increase. Furthermore, these m<sup>6</sup>A-mRNAs have their methylation and expression dynamics strongly correlated, whereas early expressed and methylated mRNAs without 5'-CDS methylation do not (**Figure 24D**). This indicates that mRNA expression dynamics are correlated to m<sup>6</sup>A profile dynamics after, but not before, the zygotic genome activation. Together these results bring to light a regulation of gene expression by both the level and localization of m<sup>6</sup>A methylation across oyster developmental stages.

### **mRNAs differentially m<sup>6</sup>A-methylated during oyster development bear the corresponding developmental functions.**

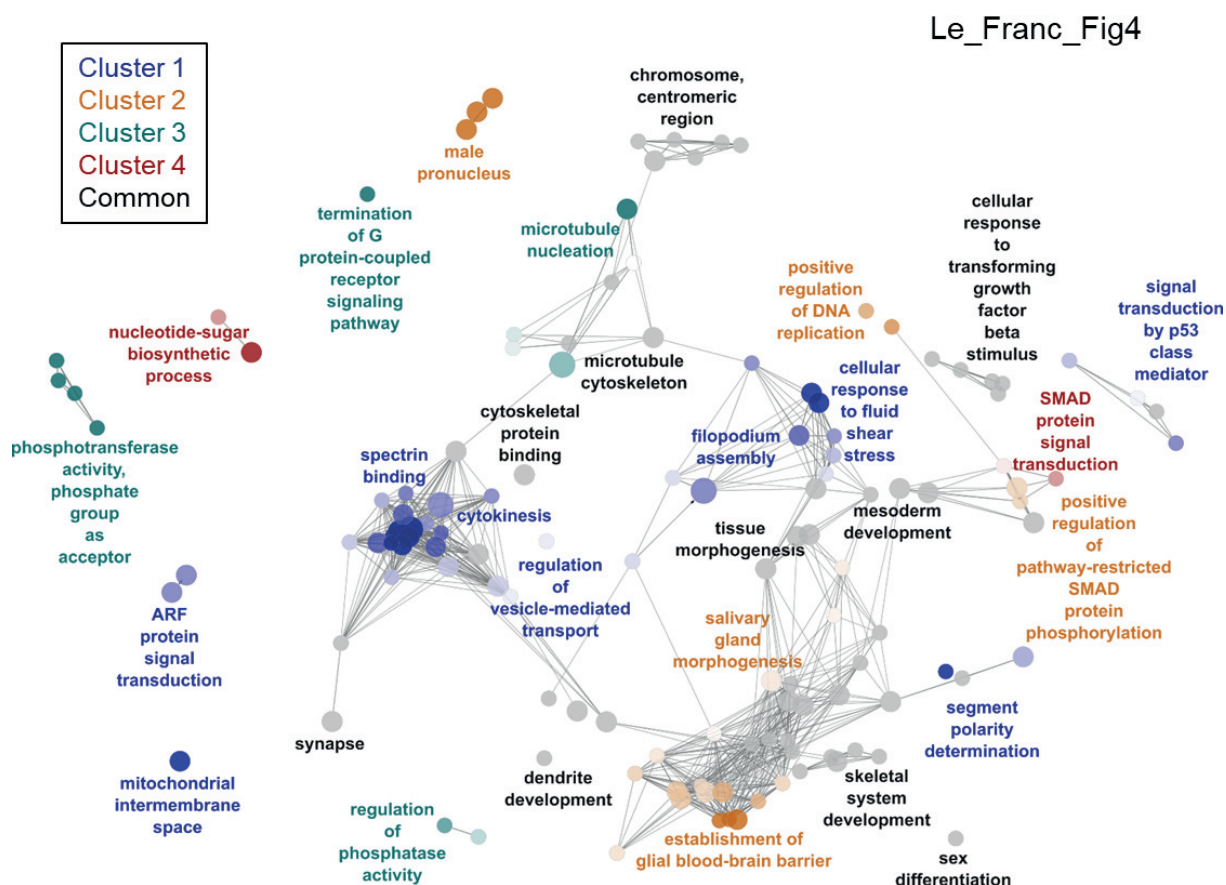
The gene ontology (GO) analysis of differentially methylated m<sup>6</sup>A-mRNAs shows term enrichment overall related to developmental processes like morphogenesis and mesoderm development, with more specific functions corresponding to each methylation cluster (**Figure 25**). The cluster 1 (cleavage) is enriched in terms related to the cell division whereas later clusters (gastrulation, tissue differentiation and metamorphosis) bear terms more reflecting signal transduction associated to cell differentiation such as the SMAD pathway. These results show a functional implication of the m<sup>6</sup>A in the regulation of oyster developmental processes.

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la m<sup>6</sup>A-méthyladénosine



**Figure 24 : Dynamics of mRNA expression and m<sup>6</sup>A methylation during oyster development.**

**A.** Heat map of normalized expression (blue) and m<sup>6</sup>A content (purple) of significantly methylated mRNA genes during oyster development. Transcript variants were pooled for each gene. Values are log-centered reduced (n=1494). The development stages are indicated below. **B.** Correlation between expression (Y axis) and methylation (X axis) levels. The methylation level was divided into twelve quantiles. **C.** Methylation profiles of mRNAs displaying high (pink) or low (grey) expression within each cluster. The development stages constitutive of high and low expression groups within each cluster are indicated. **D.** Correlation plot of expression vs. methylation dynamics throughout development. The linear correlation of the methylation vs. expression variation was assessed for each gene across oyster development per cluster and the results are given as surface plots (R-square, X-axis; *p*-value, Y axis, density of genes, Z axis). E: Egg (oocyte), FE: Fertilized egg, 2/8C: Two to eight cell-stage, M: Morula, B: Blastula, G: Gastrula, T: Trochophore, D: D-larva, P: Pediveliger, S: Spat.

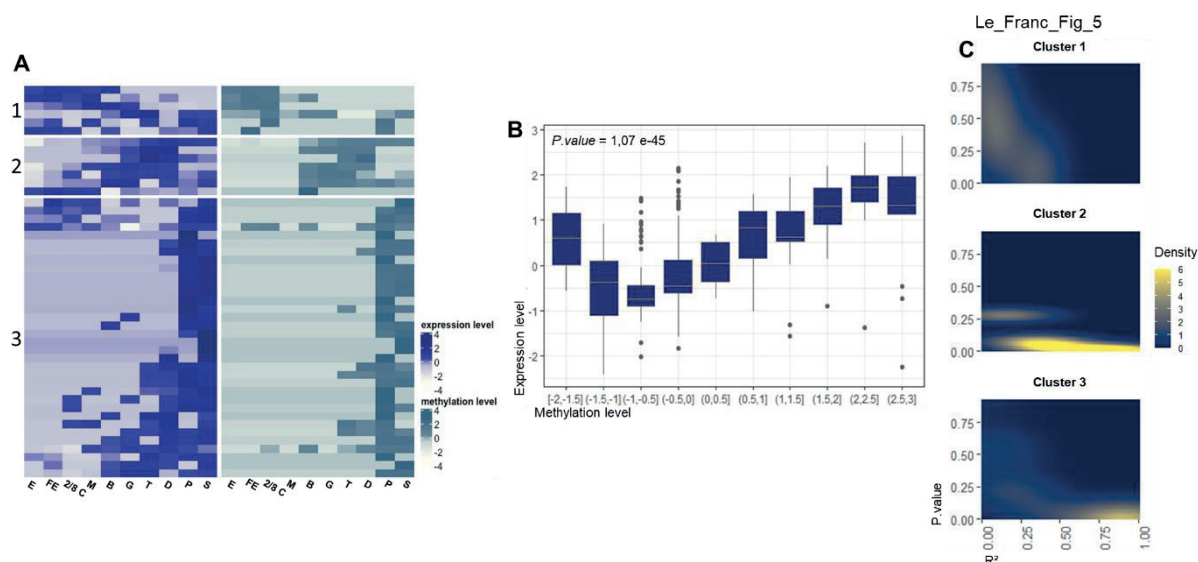


**Figure 25 : Functional annotation of differentially methylated mRNAs during oyster development**

Enriched Gene Ontology terms (hypergeometric test, FDR<0.05) associated to differential m<sup>6</sup>A mRNA methylation across oyster development. Enriched terms corresponding to specific clusters are coloured, common terms between clusters are black. Colour intensity is relative to cluster specificity, with colour limit set to 51% of genes inside the respective cluster. Circle diameter corresponds to the pvalue of the enrichment.

### Non-coding RNA expression is also associated to m<sup>6</sup>A-methylation profiles.

In a similar fashion to mRNAs, lncRNA can be grouped into clusters according to the developmental chronology of their m<sup>6</sup>A methylation dynamics, with the highest methylation levels during the early stages for a cleavage cluster (cluster 1), during the gastrulation and tissue type differentiation (cluster 2), and at the pediveliger and spat stages for a metamorphosis cluster (cluster 3), respectively. Like for mRNAs, a marked decrease of m<sup>6</sup>A levels at the morula stage is also observed for lncRNAs (**Figure 26A**). The methylation and expression levels are positively correlated overall (**Figure 26B**), although the methylation and expression dynamics are correlated only for the ‘late’ clusters 2 and 3, but not for the ‘early’ cluster 1 (**Figure 26C**).

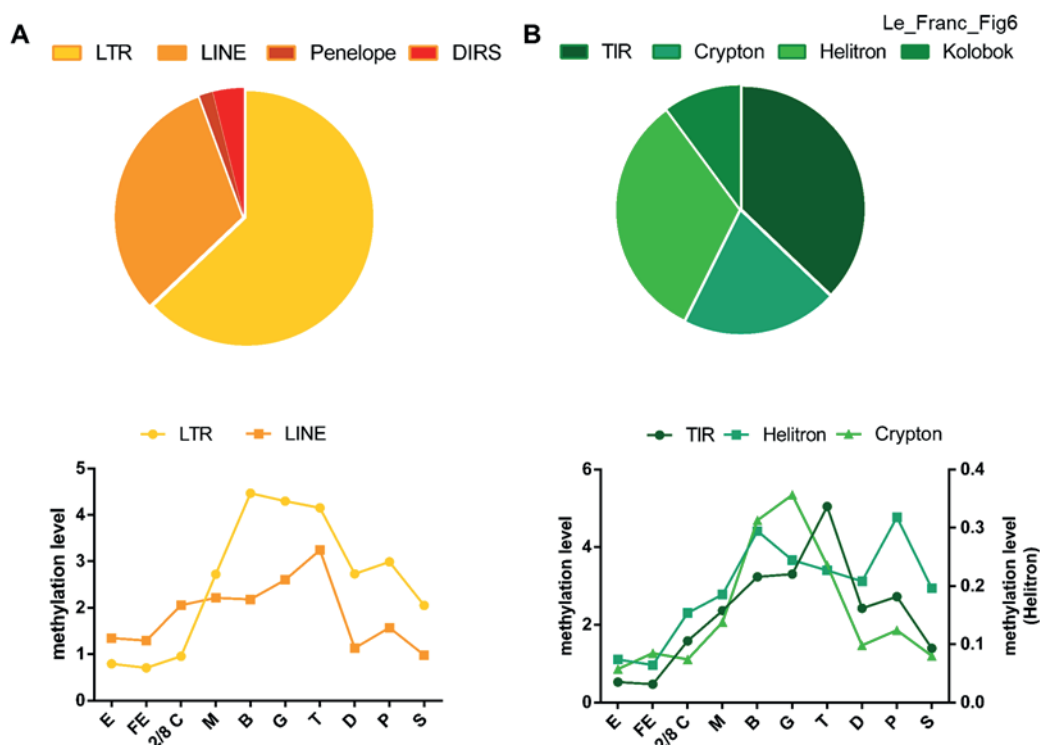


**Figure 26 : Dynamics of lncRNA expression and  $m^6A$  methylation during oyster development.**

**A.** Heat map of normalized expression (blue) and  $m^6A$  content (light blue) of significantly methylated lncRNA genes during oyster development. Transcript variants were pooled for each gene. Values are log-centered reduced. **B.** Correlation between expression (Y axis) and methylation (X axis) levels. The methylation level was divided into ten quantiles. **C.** Correlation plot of expression vs. methylation dynamics throughout development. The linear correlation of the methylation vs. expression variation was assessed for each gene across oyster development per cluster and the results are given as surface plots (R-square, X-axis;  $p$ -value, Y axis, density of genes, Z axis). E: Egg (oocyte), FE: Fertilized egg, 2/8C: Two to eight cell-stage, M: Morula, B: Blastula, G: Gastrula, T: Trochophore, D: D-larva, P: Pediveliger, S: Spat.

### Transposon RNA $m^6A$ -methylation is regulated across oyster development

The methylation of RNA TEs is mostly represented by the methylation of LTR and LINE groups with 62.9% and 31.5% respectively. These two major classes of RNA TEs display a peak of  $m^6A$ -methylation level at the blastula and trochophore stages for LTR and LINE respectively (**Figure 27A**). TIR (37.1%), Helitron (32.5%) and Crypton (20.2%) are the three main DNA TEs types which transcripts are the most methylated. Their  $m^6A$  levels are the highest around the gastrulation, and Helitron TEs display an additional peak in pediveliger larvae (**Figure 27B**). These results show that the  $m^6A$ -methylation of transposon transcripts display class-specific dynamics during oyster development that are different from mRNAs and lncRNAs.



**Figure 27 : m<sup>6</sup>A dynamics of transposable element RNA classes during oyster development.**

**A.** Relative representation of RNA TE transcripts (top) and methylation level variation during oyster development. **B.** Relative representation of DNA TE transcripts (top) and methylation level variation during oyster development. The methylation variation of only TEs representing more than 20% of their class are represented for clarity. Values are the mean of the two independent experiments.

## 4. Discussion

This work presents the profiling of m<sup>6</sup>A epitranscriptomes during the development of the oyster *Crassostrea gigas* from the egg to the completion of organogenesis. We bring evidence that m<sup>6</sup>A-methylation of RNA is dynamic throughout the oyster early life and specific to the RNA population considered. The methylation kinetics of mRNAs define clusters corresponding to the chronology of development, is correlated to gene expression level and dynamics, and the genes which transcripts display m<sup>6</sup>A-methylation regulation bear developmental functions. LncRNAs display similar profiles while transposable element transcripts have a specific signature with a peak in m<sup>6</sup>A levels during gastrulation. Our present work provides evidence for a conserved developmental significance of m<sup>6</sup>A-epitranscriptomes at various levels in the oyster.



## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

We show that the distinct RNA classes in the oyster present specific m<sup>6</sup>A signatures and vary in terms of methylation level and location. Indeed, while mRNAs are m<sup>6</sup>A-modified from the CDS start but mostly around the stop codon, lncRNAs do not present a biased methylation enrichment at their 3' end. This result, suspected from our previous measurements of global m<sup>6</sup>A content in polyA vs. total RNAs (Le Franc *et al.*, 2020), is more consistent with what is observed in human embryonic cell types (Xiao *et al.*, 2019) than in insects where methylated adenosines are mostly lying in the 5'UTR and CDS (Kan *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2021). This finding is rather surprising when considering that insects are ecdysozoans which are considered the 'sister clade' of lophotrochozoans within protostomes. Nevertheless, this assumption is increasingly moderated by the closer resemblance of molecular features between mollusks and annelids to vertebrates, ie. deuterostomes, rather than to ecdysozoan features (Prud'homme *et al.*, 2002, Sánchez Alvarado *et al.*, 2002, Nederbragt *et al.*, 2002, Saint-carlier et Riviere, 2015). Overall, RNA methyladenosines in the oyster are found within the motif 'DRA\*C' which contains the GAC consensus sequence which is widely conserved across the evolution (Bodi *et al.*, 2010, Meyer *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2014, Lence *et al.*, 2016, Zhao *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2021). The repetitive nature of TE sequences only allows less precise analysis of their m<sup>6</sup>A features compared to other RNA classes. However, we could demonstrate that oyster TE transcripts are m<sup>6</sup>A methylated and that their methylation level depends on the TE type considered, with DNA TE transcripts being significantly less methylated than RNA TEs, in line with observations in *Arabidopsis* where transposons display lower methylation levels than other RNA types (Wan *et al.*, 2015).

We generated 20 transcriptome-wide m<sup>6</sup>A-RNA methylomes of 10 embryonal larval to post-metamorphosis stages covering the whole development of the pacific oyster from oocytes to juvenile animals. Our results indicate that epitranscriptomes are dynamic and associated to defined successive developmental steps, namely cleavage (oocyte to morula stages), gastrulation (blastula and gastrula stages), tissue differentiation (trochophore and D-larvae stages) and metamorphosis (pediveliger and spat stages). The similarity of m<sup>6</sup>A profiles in eggs before and after fertilization assesses poor contribution of sperm to embryonic m<sup>6</sup>A methylomes, consistent with the sperm scarce RNA content, especially regarding the oocyte stock. Epitranscriptomes clearly shift during the developmental chronology, with a marked decrease of m<sup>6</sup>A levels in mRNA and lncRNA transcripts at the end of cleavage

followed by a gradual increase, with maximum a methylation reached at the pre-metamorphosis stage that remains high in juveniles after development completion. The morula stage constitutes a pivot point where the methylation of mRNA and lncRNA, but not of TE RNA, is strongly depleted. Interestingly, based on transcriptomic (Riviere *et al.*, 2015) and DNA 5mC-methylation data (Riviere *et al.*, 2017), this stage is considered the main window of maternal-to-zygotic transition (MZT) in the oyster, where most maternal RNA resources are consumed and where early transcriptional event may occur, as in the leech *Helobdella* (Bissen et Weisblat, 1991). Intriguingly, pairwise correlation between samples indicates a greater similarity between cleavage and metamorphosis m<sup>6</sup>A-RNA methylomes rather than a strict chronological sequence. This parallels our findings about DNA 5mC methylome developmental dynamics (Riviere *et al.*, 2017) and suggests interplay between epigenetic layers in the regulation of developmental processes in the oyster, possibly through competition for methyl donor availability (Shima *et al.*, 2017) or histone-related pathways (Wang *et al.*, 2018, Huang *et al.*, 2019a). This is, to our knowledge, the first such observation in a lophotrochozoan organism. Interestingly, it is reminiscent of the crosstalk between the 5mC DNA methylation status of the Pou5f1 pioneer stem cell factor promoter and the m<sup>6</sup>A methylation of its transcript (Xiao *et al.*, 2019), raising the question of the molecular functions of m<sup>6</sup>A epitranscriptomes during oyster development.

To gain more insights into this question, we investigated the targets subjected to significant differential methylation (DM) across developmental stages, the relationship between their m<sup>6</sup>A and transcript content levels and dynamics, as well as their functional annotation. There is an overall positive correlation between the m<sup>6</sup>A content and transcript abundance of DM mRNAs across oyster development, surprisingly contrasting with the situation in the honeybee where transcripts with high m<sup>6</sup>A modification tend to preferentially exhibit downregulated transcription levels (Wang *et al.*, 2021). Overall, oyster DM mRNAs have functions related to developmental processes, further confirming the general importance of the epitranscriptomic regulation during oyster development. More precisely, DM mRNA transcripts group into 4 clusters that match the development steps described above (cluster 1, cleavage; cluster 2, gastrulation; cluster 3, tissue differentiation; cluster 4, metamorphosis). Their Gene Ontology annotation assess their functional significance in the cognate developmental processes. However, these clusters do not display



similar methylation profiles neither similar correlations between m<sup>6</sup>A and expression level dynamics.

The cluster 1 encompasses messenger transcripts highly methylated and abundant during the cleavage. They are present from the oocyte stage, and therefore correspond to the maternal transcripts accumulated during oogenesis. While their expression and methylation levels are dramatically reduced at the onset of MZT (morula stage), their m<sup>6</sup>A and transcript abundance dynamics are not correlated. The m<sup>6</sup>A profile of cluster 1 DM mRNAs remains the same throughout development with predominant methylation close to the stop codon. Such m<sup>6</sup>A profiles are described in other species to promote mRNA degradation *via* interaction with readers such as YTHDF proteins (Zhao *et al.*, 2017, Lee *et al.*, 2020), and we showed that an oyster YTHDF orthologue is present at high levels during cleavage and putatively binds m<sup>6</sup>A-RNA in the DRACH context (Le Franc *et al.*, 2020). Cluster 1 DM mRNA transcripts bear functions in the cytoskeleton processes of cytokinesis. Therefore, our results indicate that MZT in the oyster is triggered by YTHDF-mediated decay of maternal mRNAs which translation is important for cell proliferation during cleavage. We hypothesize that the depletion of the cytokinesis machinery mRNA templates of maternal origin below a certain threshold, and/or the putative associated slowdown of cell divisions, may constitute a triggering signal promoting zygotic genome activation. It remains to be deciphered whether and how such signals could be interpreted in terms of cell fate decisions in the oyster.

The clusters 2, 3 and 4 respectively correspond to the gastrulation, the setting up of differentiated tissues and the metamorphosis. In contrast to cluster 1, their methylated adenosine pattern is dynamic and shifts from a bimodal distribution, with m<sup>6</sup>A peaks located at the 5'-end of CDS in addition to the 3'-end peaks around the stop codon, to a mostly unimodal m<sup>6</sup>A content around the CDS stop codon resembling that of cluster 1. Such 5'-enriched m<sup>6</sup>A profiles are observed in plants (Wan *et al.*, 2015, Shen *et al.*, 2016), *Xenopus* (Sai *et al.*, 2020), chicken (Fan *et al.*, 2019), mice (Chang *et al.*, 2017) and fruit flies (Soldano *et al.*, 2020), but in various extents regarding the positioning of methylation in the CDS or 5'UTR. These 3'-enriched m<sup>6</sup>A patterns are associated to the recruitment of readers such as YTHDC1 (Xu *et al.*, 2014a, Xiao *et al.*, 2016, Kasowitz *et al.*, 2018), IGF2BP (Huang *et al.*, 2018), or Prrc2a (Wu *et al.*, 2018b), and mediates translation initiation during gastrulation, as well as splicing and RNA trafficking during cell type differentiation. In developing oysters, the bimodal m<sup>6</sup>A

distribution is associated with a low transcript abundance. The shift of this distribution towards a more 3'-dominant methylation is correlated to an increased expression level of the DM mRNA transcripts of clusters 2, 3 and 4 during oyster gastrulation, tissue differentiation and metamorphosis, respectively. Furthermore, the DM mRNAs in these clusters have cognate developmental functions related to mesoderm specification, morphogenesis, as well as signal transduction involved in cell differentiation such as the SMAD pathway. In addition, we formerly demonstrated that readers including YTHDC1 and 2, IGF2BP, and *Prrc2a* are functional in the oyster and expressed in stage-specific sets after the MZT (Le Franc *et al.*, 2020), and that the writer METTL3 expression is dramatically increased after the MZT and sustained later on. Together, this indicates that m<sup>6</sup>A-RNA modification regulates gene expression during oyster cell type differentiation upon the zygotic genome activation, possibly by promoting translation *via* transcript selection and increased mRNA stability. As suggested by GO annotation, m<sup>6</sup>A-RNA modification likely participates in mesoderm formation during oyster gastrulation *via* the METTL3-dependent regulation of epithelial to mesenchymal transition, as described in human cancer cells (Chen *et al.*, 2017a, Lin *et al.*, 2019). Our findings are also consistent with the METTL3/YTHDF2-dependent triggering of osteoblast differentiation by SMAD inhibitor down-regulation in mammalian cells (Zhang *et al.*, 2020e, Li *et al.*, 2020a). Regarding the functional implication of the TGF $\beta$  signaling in oyster development (Herpin *et al.*, 2005b, 2007, Le Quéré *et al.*, 2009), these results may also suggest feedback loops between TGF $\beta$  signaling and m<sup>6</sup>A regulation in the control of (pluri)potency during differentiation (Bertero *et al.*, 2018).

LncRNAs display similar developmental dynamics to mRNAs, although their methylation profile is different and methylated adenosines are not being preferentially located at the transcript 3'-end. Methylation levels in lncRNAs are also correlated to expression level and dynamics, except for DM lncRNAs present before the MZT. How lncRNA epitranscriptomes might participate in oyster development regulation is less clear because oyster lncRNAs are poorly conserved and annotated, and their limited number compared to mRNAs in addition to the limited resolution of MeRIP-seq does not allow a reliable determination of m<sup>6</sup>A peak localization shifts. However, the vertebrate epitranscriptomic processes are overall conserved in the oyster, and so are the writer complex cofactor RBM15/15B and the hnRNP2AB1 nuclear (Le Franc *et al.*, 2020). Therefore, we speculate that oyster lncRNA epitranscriptomes could regulate chromatin state and transcription in an m<sup>6</sup>A-dependent manner somewhat reminiscent

of the *Xist*-mediated silencing (Patil *et al.*, 2016, Coker *et al.*, 2020), *MALAT1*-mediated stimulation (Liu *et al.*, 2013, Brown *et al.*, 2016, Ruszkowska *et al.*, 2018, Coker *et al.*, 2019) and/or carRNA (chromosome-associated regulatory RNAs) switches in mammals (Liu *et al.*, 2020c). However, *Xist* is not conserved in the oyster and more work is required to test this hypothesis. Transposon transcripts display class-specific dynamics during oyster development that are different from mRNAs and lncRNAs. Both RNA and DNA TEs which are little if any m<sup>6</sup>A modified during cleavage display overall maximum methylation during gastrulation and cell differentiation. Although the role of m<sup>6</sup>A in transposon transcripts and the underlying mechanisms remain largely unknown. These dynamics may suggest an m<sup>6</sup>A-dependent TE transcript degradation in the oyster, complementary to other pathways of transposon silencing required for cell differentiation, which widely imply RNA-associated mechanisms throughout the evolution (van der Heijden et Bortvin, 2009, Gerdes *et al.*, 2016, Shibata *et al.*, 2016, Inoue *et al.*, 2017b, Jankovics *et al.*, 2018).

Altogether, our results indicate that m<sup>6</sup>A-RNA epitranscriptome dynamics regulate oyster development by at least two different mechanisms. First, the decrease in maternal mRNA transcripts associated to cell division triggers the maternal-to-zygotic transition. Then, after the MZT, successive *de novo* m<sup>6</sup>A epitranscriptomes regulate the sequential expression of genes required for gastrulation, cell differentiation and metamorphosis. Although functional studies would be required to determine the relative importance of such regulation within the epigenetic network and the precise underlying mechanisms. This work brings the first evidence of an epitranscriptomic regulation of development in a lophotrochozoan species and allows better understanding of the epigenetic processes of development and their evolution.

## 5. Materials & Methods

### Animals:

Broodstock oysters, embryos, larvae and spat were obtained at the IFREMER marine facilities (Argenton, France) as previously described (Petton *et al.*, 2015, Riviere *et al.*, 2017). Briefly, gametes of mature broodstock oysters were obtained by stripping the gonads and filtering the recovered material on a 60 µm mesh to remove large debris. Oocytes were collected as the remaining fraction on a 20 µm mesh and spermatozoa as the passing fraction on a 20 µm mesh. Oocytes were pre-incubated

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

in 5 L of UV-treated and 1 µm filtered sterile sea water (SSW) at 21 °C until germinal vesicle breakdown. Fertilization was triggered by the addition of ca.10 spermatozooids per oocyte. After the expulsion of the second polar body was assessed by light microscopy, embryos were transferred in 150 L tanks of oxygenated SSW at 21 °C. The embryonic stages were determined by light microscopy observation. The embryonic stages collected were oocytes (E, immediately before sperm addition), fertilized oocytes (F E, immediately before transfer to 150 L tanks), two to eight cell embryos (2/8 C, ca. 1.5 hours post fertilization (hpf)), morula (M, ca. 4 hpf), blastula (B, ca. 6 hpf), gastrula (G, ca. 10 hpf), trochophore (T, ca 16 hpf) and D larvae (D, ca. 24 hpf). For pediveliger and spat stages, the D-larvae which not sampled were collected and reared in flow-through rearing system at 25 °C in SSW. At the end of the pelagic stage, competent larvae were collected on a 225 µm to allow the larval settlement. At 20 day post fertilization (dpf) the pediveliger stage was sampled as the remaining fraction on a 400 µm mesh. The post-larvae were maintained in downwelling system then at 25 dpf the spat stage is sampled as the remaining fraction on a 400 µm mesh.

For each embryonic stage, 3 million embryos were collected as the remaining fraction on a 20 µm mesh and centrifuged at 123 g for 5 min at room temperature. Supernatant was discarded and samples of 1 million embryos were then snap-frozen in liquid nitrogen directly or after resuspension in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (1 mL/10<sup>6</sup> embryos). For pediveliger and spat samples, 100 mg of each stage were resuspended in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) (1 mL/100 mg of oyster) and snap-frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80 °C.

Two distinct experiments were realized (February and March 2019) using the gametes of 126 to 140 broodstock animals, respectively.

### RNA extraction:

RNA of each development stages was extracted using phenol-chloroform followed by affinity chromatography as previously described (Riviere *et al.*, 2011). Briefly, embryos were ground in Tri-Reagent and RNA was purified using affinity chromatography (Nucleospin RNA Clean up kit, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Potential contaminating DNA was removed by digestion with rDNase (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions for 15 min at 37 °C then RNA was

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

purified using Beckman Coulter's solid-phase reversible immobilization (SPRI) paramagnetic beads (AgencourtAMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, paramagnetic beads and RNAs were mixed slowly and incubated 5 min at room temperature followed by 2 min on a magnetic rack. Cleared supernatant was removed, and beads were washed three times with 70 % ethanol. After 4 min of drying at room temperature, RNAs were mixed slowly with RNase free water and incubated for 1 min at room temperature on the magnetic rack. Eluted total RNA was stored at -80 °C.

### RNA fragmentation:

The fragmentation was conducted on RNAs of each developmental stages and on RNAs pools of the two development experiments. The pools were composed of 1 µg of RNA of each developmental stages for the two distinct experiments.

The RNA fragmentation was performed as previously described (Zeng *et al.*, 2018). Briefly, for each RNA samples (development stages and pools), 5 µg of total RNA was adjusted to 18 µl in RNase free water. The RNA was fragmented by the addition of 2 µl of fragmentation buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, DEPC water) and incubation for 2 min at 70 °C. After the incubation 2 µl of EDTA 0.5 M was immediately added and RNAs were incubated on ice for 2 min to stop the reaction. Then, RNAs were purified using Beckman Coulter's SPRI paramagnetic beads (AgencourtAMPure XP, Beckman Coulter) as previously described and the fragment size was verified with the Agilent RNA 6000 pico kit on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instruction. The total RNA was chemically fragmented at approximately 100 nucleotides and corresponds to the input fraction (Input).

### MeRIP:

The MeRIP-seq of total RNA was performed on 5 µl of fragmented RNA as previously described by Zeng and collaborators (Zeng *et al.*, 2018). For each sample, 30 µl of protein A and 30 µl of protein G magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were incubated on magnetic rack and washed twice with IP buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, IGEPAL 0.1 %, DEPC water) and resuspended

## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

in 500 µl of IP buffer. The magnetic beads were incubated overnight at 4 °C under gentle shaking with 5 µg of antibody anti-m<sup>6</sup>A (ABE572, Millipore, Burlington, MA, USA). Then magnetic beads were washed twice with IP buffer and resuspended in RNA mixture composed of 100 µl of 5X IP buffer, 44 µl of fragmented RNAs and 5 µl of RNasin Plus Ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) and the mixture was completed to 500 µl with IP buffer. The 500 µl with magnetic beads coupled to antibody and fragmented RNAs were incubated for 2 h at 4 °C with gentle shaking. After incubation, RNA was incubated on magnetic rack and washed twice in IP buffer, twice in low salt buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 % IGEPAL, DEPC water) and twice in high salt buffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 % IGEPAL, DEPC water) for 10 min at 4 °C under gentle shaking for each washing. After extensive washing with IP buffer, RNAs coupled to antibody were resuspended in 200 µl of RA1 buffer supplied in Nucleospin RNA Clean up kit (Macherey-Nagel) and incubated 2 min at RT then 1 min on magnetic rack. The supernatant containing immunoprecipitated RNA was collected and mixed with 400 µl of 100 % ethanol. Then the collected RNA was purified using affinity chromatography column supplied in Nucleospin RNA Clean up kit and centrifuged at 13000 g for 1 min 4 °C. The column was washed with 500 µl of RA3 buffer of Nucleospin RNA Clean up kit then 80 % ethanol with a centrifugation of 13000 g 1 min 4 °C after each washing. Finally, the column was centrifuged at full speed for 5 min at 4 °C and the immunoprecipitated RNA was eluted twice with 14 µl of RNase free water. These immunoprecipitated RNAs correspond to the immunoprecipitated fraction (IP).

### MeRIP-RT-qPCR:

To validate the immunoprecipitation of m<sup>6</sup>A methylated RNA a RT-qPCR was performed on RNA pools. The pools were composed of 1 µg of RNA of each developmental stages for the two distinct experiment. To obtain the Input and IP fraction, 5 µg of the two RNA pools followed the RNA fragmentation and MeRIP procedures described above.

The equivalent amount of 1,75 ng of Input and IP RNAs were used to start the RT-qPCR previously described (Riviere *et al.*, 2011). Briefly, RNAs were reverse-transcribed using 200 U of M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA) and 100 ng random hexamers. Resulting cDNAs were diluted to 100 µl in RNase free water and 5



## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

µl of these diluted cDNAs were assayed for target gene expression in Input and IP using the Input expression as reference. SYBR-green quantitative PCR was performed on a CFX96 apparatus (Bio-Rad, France). Gotaq qPCR master mix (Promega) was used in 40 cycles (95 °C/15 s, 60 °C/15 s) reactions with the following primers: Cg-EF1α (forward: 5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3', reverse: 5'-ACGACGATCGCATTCTCTT-3') as reference transcript of gene expression in *C.gigas* (Dheilly *et al.*, 2011), genes described as methylated in vertebrate: Cg-C-MYC (forward: 5'-CGGTCTCTCCCAAATTCTCCC -3', reverse: 5'-TGCTACTTCCACTTGCCCTG -3') (Batista *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2018), Cg-KLF (forward: 5'-GAAATCTCCGATGTTGCTGG-3', reverse: 5'-CTTTCCACGGTATTTGCGAG-3') (Batista *et al.*, 2014), Cg-METTL3 (forward: 5'-TGGAACCAAAGAAGAGTGTGTCAGA-3', reverse: 5'-AGAAATGAACAGTCTCCAAGGGA -3') (Coots *et al.*, 2017) and Cg-hnRNPA2B1 (forward: 5'-CCAGGGAGGCTACAATGAAGG -3', reverse: 5'-ACACCACCACCAAAGCTGTT -3') (Kwon *et al.*, 2019) and gene described as not methylated in vertebrate: Cg-OCT4 (forward: 5'-GTGAAAGGTGCGCTAGAAAA-3', reverse: 5'-GGACCACTTCTTTCTCCAGT-3') (Batista *et al.*, 2014). The methylation level was calculated as a normalization of the IP on the Input by the formulae:  $2^{-(\Delta(\text{Ct IP}-\text{Ct Input}))}$ .

### Library preparation:

The amount of 3.5 µl of IP and the equivalent amount of 50 ng of Input RNAs were used for the library construction according to the manufacturer's protocol without fragmentation option of the SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v.2 (634418, Pico Input Mammalian, Takara/Clontech, Japan). The protocol was rigorously followed with a final cDNA amplification of 16 cycles. Paired-end 150-bp sequencing of Input and IP cDNAs of each sample were conducted on Illumina HiSeq 4000 platform at the Genome Quebec innovation Center (McGill University, Montréal, Canada).

### MeRIP-seq Data analyses:

Read quality was evaluated using FastQC (v.0.11.7) and MultiQC (v.1.7) and adaptor sequences and low-quality reads were removed using Trimmomatic (v.0.38)



## Chapitre II : Caractérisation des profils développementaux de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine

in Input and IP sequencing data. The remaining reads were aligned to oyster genome v.9 (GCF\_000297895.1) and uniquely mapped reads per gene were counted using STAR (v.2.7.3a; -quantMode GeneCounts) (Dobin *et al.*, 2013). To identified mRNAs, ncRNAs the gene annotation was used and TEs were identified using the RepeatMasker annotation output provided with assembly data.

The expression level in all Input samples was expression in TPM (Transcripts per Million) (Li *et al.*, 2010).

The identification of m<sup>6</sup>A-enriched peaks were performed on uniquely mapped reads of mRNA using Samtools (v.1.9) and MeTPeak R package (Cui *et al.*, 2016a) (FDR < 5%) on all developmental stages of IP and Input samples serving as control. The methylation levels of these m<sup>6</sup>A-enriched methylated RNAs correspond to the fold-change of IP/Input provide by MeTPeak. The methylation level of TEs was assessed as the ratio of IP/Input with reads per gene expressed in TPM. Only transcripts present in the two distinct developments were considered expressed or methylated in Input and IP data, respectively.

The motif was researched in the 1000 best m<sup>6</sup>A peaks selected on a FDR <5% and the 1000 best first fold change using Homer (v.4.10.4). The motif length was restricted to 5, 6 nucleotides. All peaks mapped on mRNAs and ncRNAs were used as the target sequences and the background sequences were constituted of 5% of the Input pool of February development selected using Samtools (v.1.9).

### Gene ontology analysis:

The RNA sequences identified as differentially methylated across oyster development were identified using BlastN (Altschul *et al.*, 1997, Camacho *et al.*, 2009, Cock *et al.*, 2015) against the GigaTON database (Riviere *et al.*, 2015) with default settings. Gene ontology (GO) analyses were carried out with the GO annotations obtained from GigaTON database gene universe (Riviere *et al.*, 2015). GO-term enrichment tests were performed using ClueGO plugin (v.2.5.7) (Bindea *et al.*, 2009) on Cytoscape (v.3.8.0). The hypergeometric test with a FDR <5 % was used to considered GO terms significantly enriched.

### Statistical analyses and graph production:

The variation of the methylation level was analyzed using ANOVA test with a p-value <5 % were considered as a significant methylation variation across oyster development.

All bioinformatics analyses (unless stated otherwise) were performed using R (v.3.6.3) and RStudio (v.1.0.153) softwares. The R packages *eulerr* (Larsson, 2019), *Complexheatmap* (Gu *et al.*, 2016), *ggplot2* (Gómez-Rubio, 2017), *Guitar* (Cui *et al.*, 2016b), *PCATools* (Blighe et Lewis, 2019), *corrplot* (Wei et Simko, 2017) and Prism v.6 (Graphpad) software were used for production of specific figures.

## 6. Supporting information

**Data S1**: Complete list of significant GO terms in each of clustered genes for m<sup>6</sup>A-mRNAs (FDR<0,05)

**Figure S1**: Validation of m<sup>6</sup>A immunoprecipitation transcripts

**Data S1: Complete list of significant GO terms in each cluster for m6A-mRNAs (FDR < 0,05)**

Cluster	GOID	GO Term	Ontology Source	FDR	% Associated Genes	Nr. Genes
None Specific Cluster	GO:0007548	sex differentiation	BP	0,02	11,78	41,00
None Specific Cluster	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	MF	0,00	14,29	35,00
None Specific Cluster	GO:0016358	dendrite development	BP	0,04	14,42	15,00
None Specific Cluster	GO:0060627	regulation of vesicle-mediated transport	BP	0,02	18,33	11,00
None Specific Cluster	GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	BP	0,05	18,60	8,00
None Specific Cluster	GO:0008630	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	BP	0,03	26,09	6,00
None Specific Cluster	GO:0098858	actin-based cell projection	CC	0,01	22,92	11,00
None Specific Cluster	GO:0007391	dorsal closure	BP	0,01	37,50	6,00
None Specific Cluster	GO:0120031	plasma membrane bounded cell projection assembly	BP	0,01	16,98	18,00
None Specific Cluster	GO:0051489	regulation of filopodium assembly	BP	0,01	30,43	7,00
None Specific Cluster	GO:0071363	cellular response to growth factor stimulus	BP	0,03	11,38	43,00
None Specific Cluster	GO:0071560	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	BP	0,01	12,89	33,00
None Specific Cluster	GO:0007178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	BP	0,04	11,66	33,00
None Specific Cluster	GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	BP	0,02	12,40	31,00
None Specific Cluster	GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,02	11,29	49,00
None Specific Cluster	GO:0000775	chromosome, centromeric region	CC	0,00	15,23	37,00
None Specific Cluster	GO:0000792	heterochromatin	CC	0,01	13,92	27,00
None Specific Cluster	GO:0000793	condensed chromosome	CC	0,03	12,24	30,00
None Specific Cluster	GO:0005819	spindle	CC	0,03	14,18	19,00
None Specific Cluster	GO:0045815	positive regulation of gene expression, epigenetic	BP	0,05	12,72	22,00
None Specific Cluster	GO:0005721	pericentric heterochromatin	CC	0,01	14,12	25,00
None Specific Cluster	GO:0034401	chromatin organization involved in regulation of transcription	BP	0,05	12,50	23,00
None Specific Cluster	GO:0001501	skeletal system development	BP	0,01	14,29	26,00
None Specific Cluster	GO:0051216	cartilage development	BP	0,01	16,96	19,00
None Specific Cluster	GO:0072657	protein localization to membrane	BP	0,03	15,46	15,00
None Specific Cluster	GO:0002062	chondrocyte differentiation	BP	0,01	18,48	17,00
None Specific Cluster	GO:0032330	regulation of chondrocyte differentiation	BP	0,00	20,73	17,00

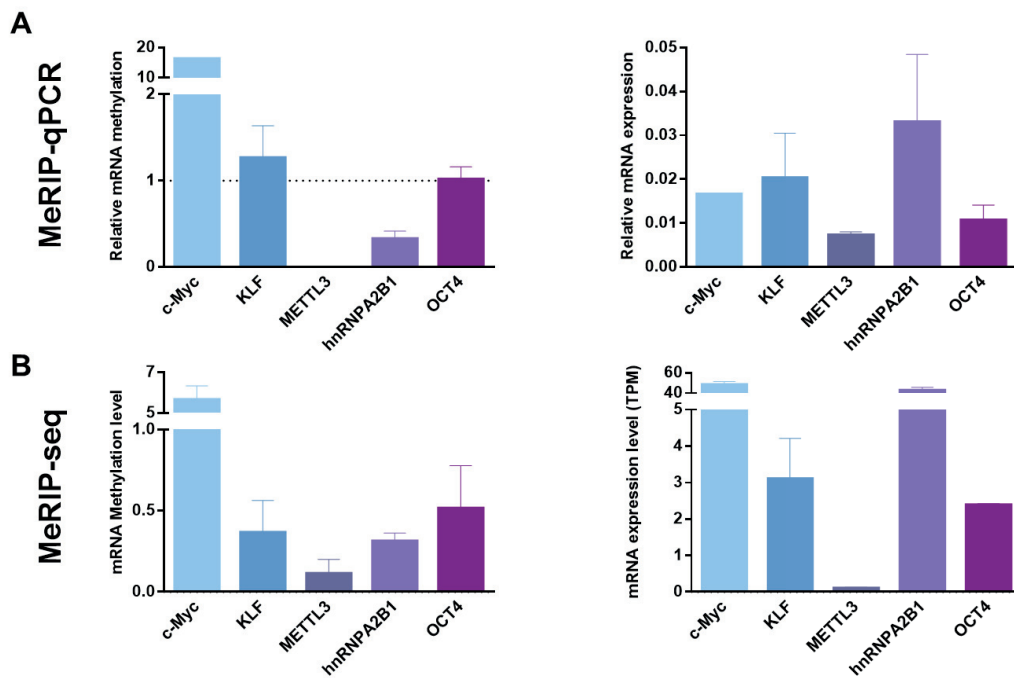
None Specific Cluster	GO:0006605	protein targeting	BP	0,00	16,20	23,00
None Specific Cluster	GO:0006612	protein targeting to membrane	BP	0,00	23,53	12,00
None Specific Cluster	GO:0006607	NLS-bearing protein import into nucleus	BP	0,01	19,74	15,00
None Specific Cluster	GO:0007389	pattern specification process	BP	0,02	13,07	26,00
None Specific Cluster	GO:0048736	appendage development	BP	0,03	15,56	14,00
None Specific Cluster	GO:0007498	mesoderm development	BP	0,00	28,89	13,00
None Specific Cluster	GO:0048332	mesoderm morphogenesis	BP	0,00	33,33	8,00
None Specific Cluster	GO:0045669	positive regulation of osteoblast differentiation	BP	0,00	46,15	6,00
None Specific Cluster	GO:0090100	positive regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	BP	0,03	23,33	7,00
None Specific Cluster	GO:0032507	maintenance of protein location in cell	BP	0,00	20,90	14,00
None Specific Cluster	GO:0000775	chromosome, centromeric region	CC	0,00	15,23	37,00
None Specific Cluster	GO:0005819	spindle	CC	0,03	14,18	19,00
None Specific Cluster	GO:0015630	microtubule cytoskeleton	CC	0,01	12,28	48,00
None Specific Cluster	GO:0099513	polymeric cytoskeletal fiber	CC	0,02	13,21	28,00
None Specific Cluster	GO:0005874	microtubule	CC	0,01	14,20	25,00
None Specific Cluster	GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
None Specific Cluster	GO:0045202	synapse	CC	0,00	14,59	34,00
None Specific Cluster	GO:0005911	cell-cell junction	CC	0,00	14,94	39,00
None Specific Cluster	GO:0032507	maintenance of protein location in cell	BP	0,00	20,90	14,00
None Specific Cluster	GO:0044304	main axon	CC	0,00	21,21	14,00
None Specific Cluster	GO:0045211	postsynaptic membrane	CC	0,01	17,65	18,00
None Specific Cluster	GO:0072657	protein localization to membrane	BP	0,03	15,46	15,00
None Specific Cluster	GO:0006605	protein targeting	BP	0,00	16,20	23,00
None Specific Cluster	GO:0006612	protein targeting to membrane	BP	0,00	23,53	12,00
None Specific Cluster	GO:0007389	pattern specification process	BP	0,02	13,07	26,00
None Specific Cluster	GO:0009791	post-embryonic development	BP	0,00	21,92	16,00
None Specific Cluster	GO:0007552	metamorphosis	BP	0,00	26,83	11,00
None Specific Cluster	GO:0048729	tissue morphogenesis	BP	0,00	14,89	42,00
None Specific Cluster	GO:0048736	appendage development	BP	0,03	15,56	14,00
None Specific Cluster	GO:0002165	instar larval or pupal development	BP	0,00	28,57	12,00

None Specific Cluster	GO:0007498	mesoderm development	BP	0,00	28,89	13,00
None Specific Cluster	GO:0001655	urogenital system development	BP	0,03	13,73	21,00
None Specific Cluster	GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	BP	0,00	15,56	40,00
None Specific Cluster	GO:0060541	respiratory system development	BP	0,00	18,10	19,00
None Specific Cluster	GO:0007444	imaginal disc development	BP	0,01	22,73	10,00
None Specific Cluster	GO:0016331	morphogenesis of embryonic epithelium	BP	0,02	18,64	11,00
None Specific Cluster	GO:0043296	apical junction complex	CC	0,01	24,32	9,00
None Specific Cluster	GO:0048732	gland development	BP	0,01	13,76	26,00
None Specific Cluster	GO:0060562	epithelial tube morphogenesis	BP	0,00	17,39	24,00
None Specific Cluster	GO:0007424	open tracheal system development	BP	0,02	21,62	8,00
None Specific Cluster	GO:0022612	gland morphogenesis	BP	0,01	17,12	19,00
None Specific Cluster	GO:0030324	lung development	BP	0,03	17,86	10,00
None Specific Cluster	GO:0007043	cell-cell junction assembly	BP	0,03	15,91	14,00
None Specific Cluster	GO:0007391	dorsal closure	BP	0,01	37,50	6,00
None Specific Cluster	GO:0007560	imaginal disc morphogenesis	BP	0,01	24,24	8,00
None Specific Cluster	GO:0120031	plasma membrane bounded cell projection assembly	BP	0,01	16,98	18,00
None Specific Cluster	GO:0007435	salivary gland morphogenesis	BP	0,00	34,62	9,00
None Specific Cluster	GO:0061333	renal tubule morphogenesis	BP	0,00	34,48	10,00
None Specific Cluster	GO:0072073	kidney epithelium development	BP	0,03	19,15	9,00
None Specific Cluster	GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
None Specific Cluster	GO:0051489	regulation of filopodium assembly	BP	0,01	30,43	7,00
None Specific Cluster	GO:0007476	imaginal disc-derived wing morphogenesis	BP	0,02	25,00	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0005758	mitochondrial intermembrane space	CC	0,00	50,00	5,00
Specific for Cluster #1	GO:0007367	segment polarity determination	BP	0,03	50,00	3,00
Specific for Cluster #1	GO:0032011	ARF protein signal transduction	BP	0,00	47,06	8,00
Specific for Cluster #1	GO:0032012	regulation of ARF protein signal transduction	BP	0,00	47,06	8,00
Specific for Cluster #1	GO:0072331	signal transduction by p53 class mediator	BP	0,01	25,81	8,00
Specific for Cluster #1	GO:0031571	mitotic G1 DNA damage checkpoint	BP	0,05	30,77	4,00
Specific for Cluster #1	GO:0046847	filopodium assembly	BP	0,00	34,21	13,00
Specific for Cluster #1	GO:0030507	spectrin binding	MF	0,00	58,33	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0072659	protein localization to plasma membrane	BP	0,00	27,78	10,00

Specific for Cluster #1	GO:0008154	actin polymerization or depolymerization	BP	0,02	17,91	12,00
Specific for Cluster #1	GO:0000910	cytokinesis	BP	0,01	19,67	12,00
Specific for Cluster #1	GO:0030315	T-tubule	CC	0,00	43,75	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0030507	spectrin binding	MF	0,00	58,33	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0001508	action potential	BP	0,05	15,94	11,00
Specific for Cluster #1	GO:0033268	node of Ranvier	CC	0,03	17,86	10,00
Specific for Cluster #1	GO:0042383	sarcolemma	CC	0,01	21,74	10,00
Specific for Cluster #1	GO:0045838	positive regulation of membrane potential	BP	0,00	42,86	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0000281	mitotic cytokinesis	BP	0,00	61,54	8,00
Specific for Cluster #1	GO:0006892	post-Golgi vesicle-mediated transport	BP	0,03	19,57	9,00
Specific for Cluster #1	GO:0071709	membrane assembly	BP	0,01	30,00	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0086001	cardiac muscle cell action potential	BP	0,00	43,75	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0014704	intercalated disc	CC	0,01	30,00	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0032414	positive regulation of ion transmembrane transporter activity	BP	0,02	25,93	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0072659	protein localization to plasma membrane	BP	0,00	27,78	10,00
Specific for Cluster #1	GO:0072660	maintenance of protein location in plasma membrane	BP	0,00	66,67	6,00
Specific for Cluster #1	GO:1900827	positive regulation of membrane depolarization during cardiac muscle cell action potential	BP	0,00	85,71	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0043001	Golgi to plasma membrane protein transport	BP	0,00	54,55	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0006813	potassium ion transport	BP	0,03	17,86	10,00
Specific for Cluster #1	GO:0071498	cellular response to fluid shear stress	BP	0,00	83,33	5,00
Specific for Cluster #1	GO:0003785	actin monomer binding	MF	0,00	71,43	5,00
Specific for Cluster #1	GO:0048286	lung alveolus development	BP	0,00	42,86	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0061005	cell differentiation involved in kidney development	BP	0,01	31,82	7,00
Specific for Cluster #1	GO:0008154	actin polymerization or depolymerization	BP	0,02	17,91	12,00
Specific for Cluster #1	GO:2001013	epithelial cell proliferation involved in renal tubule morphogenesis	BP	0,00	66,67	6,00
Specific for Cluster #1	GO:0046847	filopodium assembly	BP	0,00	34,21	13,00
Specific for Cluster #1	GO:0072080	nephron tubule development	BP	0,02	22,22	8,00
Specific for Cluster #2	GO:0045740	positive regulation of DNA replication	BP	0,03	33,33	4,00
Specific for Cluster #2	GO:0010369	chromocenter	CC	0,00	80,00	4,00
Specific for Cluster #2	GO:0001939	female pronucleus	CC	0,00	66,67	4,00



Specific for Cluster #2	GO:0001940	male pronucleus	CC	0,00	80,00	4,00
Specific for Cluster #2	GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,01	38,46	5,00
Specific for Cluster #2	GO:0010862	positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,00	62,50	5,00
Specific for Cluster #2	GO:0018210	peptidyl-threonine modification	BP	0,01	33,33	6,00
Specific for Cluster #2	GO:0007527	adult somatic muscle development	BP	0,00	100,00	3,00
Specific for Cluster #2	GO:0009954	proximal/distal pattern formation	BP	0,01	38,46	5,00
Specific for Cluster #2	GO:0070160	tight junction	CC	0,01	24,24	8,00
Specific for Cluster #2	GO:0008362	chitin-based embryonic cuticle biosynthetic process	BP	0,03	50,00	3,00
Specific for Cluster #2	GO:0005918	septate junction	CC	0,00	62,50	5,00
Specific for Cluster #2	GO:0035151	regulation of tube size, open tracheal system	BP	0,01	35,71	5,00
Specific for Cluster #2	GO:0005920	smooth septate junction	CC	0,01	75,00	3,00
Specific for Cluster #2	GO:0043297	apical junction assembly	BP	0,00	42,86	6,00
Specific for Cluster #2	GO:0120192	tight junction assembly	BP	0,00	42,86	6,00
Specific for Cluster #2	GO:0060857	establishment of glial blood-brain barrier	BP	0,00	80,00	4,00
Specific for Cluster #2	GO:0035317	imaginal disc-derived wing hair organization	BP	0,05	30,77	4,00
Specific for Cluster #3	GO:0038032	termination of G protein-coupled receptor signaling pathway	BP	0,04	42,86	3,00
Specific for Cluster #3	GO:0010921	regulation of phosphatase activity	BP	0,02	22,22	8,00
Specific for Cluster #3	GO:0010923	negative regulation of phosphatase activity	BP	0,02	27,27	6,00
Specific for Cluster #3	GO:0016776	phosphotransferase activity, phosphate group as acceptor	MF	0,02	33,33	5,00
Specific for Cluster #3	GO:0004550	nucleoside diphosphate kinase activity	BP	0,03	50,00	3,00
Specific for Cluster #3	GO:0006183	GTP biosynthetic process	BP	0,03	50,00	3,00
Specific for Cluster #3	GO:0006228	UTP biosynthetic process	BP	0,03	50,00	3,00
Specific for Cluster #3	GO:0031109	microtubule polymerization or depolymerization	BP	0,01	27,59	8,00
Specific for Cluster #3	GO:0034453	microtubule anchoring	BP	0,00	61,54	8,00
Specific for Cluster #3	GO:0007020	microtubule nucleation	BP	0,00	60,00	6,00
Specific for Cluster #3	GO:0034453	microtubule anchoring	BP	0,00	61,54	8,00
Specific for Cluster #4	GO:0004360	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing) activity	MF	0,00	100,00	3,00
Specific for Cluster #4	GO:0009226	nucleotide-sugar biosynthetic process	BP	0,01	44,44	4,00
Specific for Cluster #4	GO:0060395	SMAD protein signal transduction	BP	0,01	57,14	4,00

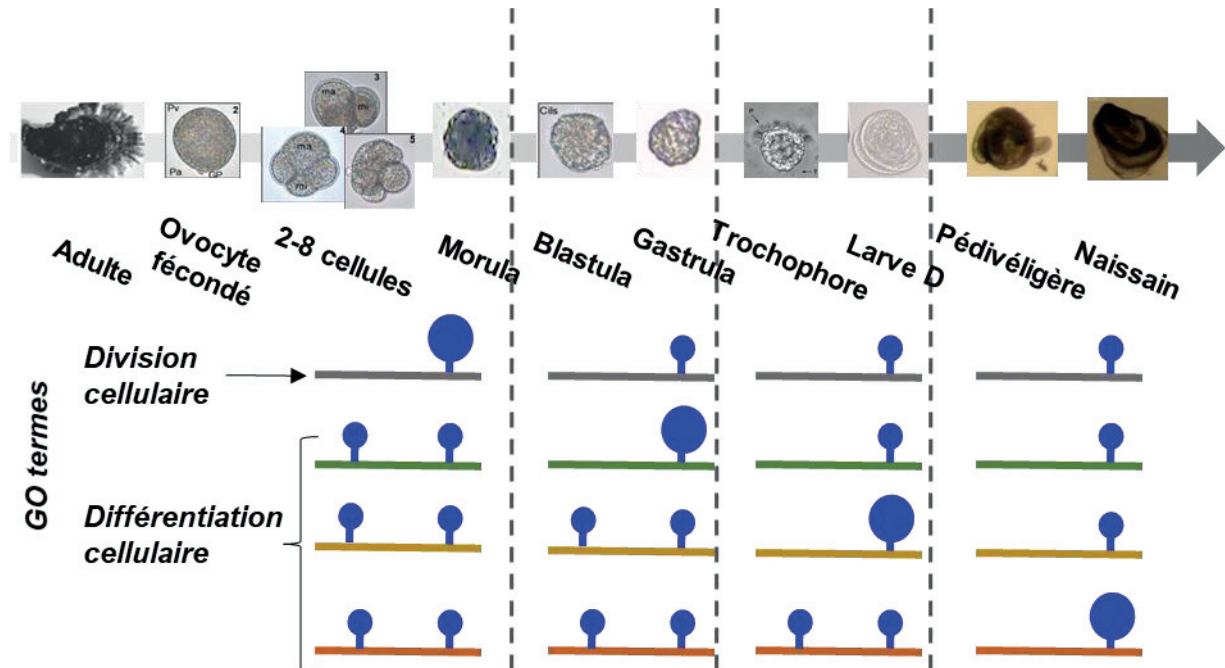


**Figure S1: Validation of m<sup>6</sup>A immunoprecipitation transcripts**

**A.** Relative methylation (left) and expression level (right) of targeted transcripts *c-Myc*, *KLF*, *METTL3*, *hnRNPA2B1* and *Oct4* quantified by MeRIP-qPCR (left) and qPCR (right) on a pool of oyster development. The dotted line represents the minimal value to considered an enrichment of m<sup>6</sup>A-RNA. **B.** Methylation (left) and expression level in TPM (right) of targeted transcripts *c-Myc*, *KLF*, *METTL3*, *hnRNPA2B1* and *Oct4* quantified by MeRIP-seq (left) and RNA-seq (right) on a pool of oyster development. Error bars represent the standard deviation.



## 7. Bilan du chapitre II



**Figure 28 : Schéma bilan du chapitre II**

L'étude des  $m^6A$ -méthylomes développementaux de *C. gigas* met en évidence la conservation d'une méthylation au niveau du motif « DRACH » avec un pic autour du codon stop. Le niveau et la localisation de la  $m^6A$  de certains ARNm est dynamique et divise le développement en quatre parties : la segmentation avec des  $m^6A$ -ARNm impliqués dans la division cellulaire dont seul le niveau de méthylation varie ; la gastrulation, la mise en place des tissus et la métamorphose où le niveau et la localisation de la  $m^6A$ , impliqués dans la régulation de la différenciation cellulaire, varient. De plus, la variation de la méthylation est corrélée au niveau d'expression des ARNm et lncARN et met en évidence une régulation du contenu en transcrits par la  $m^6A$ . En effet, cette méthylation est détectée sur différents types d'ARN (ARNm, lncARN, TE) dont la dynamique de méthylation est spécifique à chaque type.



## **Chapitre III :**

**La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?**





# Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

## 1. Introduction

### 1.1.L'effet maternel

Le développement d'un organisme passe par différentes étapes où les transcriptomes successifs permettent l'obtention des phénotypes des cellules différenciées. Cependant, la régulation de ces transcriptomes est sous le contrôle d'activités enzymatiques et donc de l'environnement. Ainsi, les transcriptomes embryonnaires précoces, constitués principalement lors de la gamétogenèse, vont refléter l'environnement parental. Cet effet du milieu de la génération précédente sur le développement du phénotype de la descendance est nommé effet parental et correspond à une source importante de variabilité phénotypique (Badyaev et Uller, 2009, Bonduriansky et Day, 2009). Lorsque cet effet parental n'est transmis que par la mère, on parle d'effet maternel. Cette influence de la mère sur le développement a été classée en quatre catégories par Marshall et Uller (2007).

La première catégorie est appelée effet d'anticipation ou « *anticipatory maternal effect* ». Elle correspond à un effet adaptatif du phénotype de la descendance à l'environnement maternel qui va favoriser la survie de la descendance dans les conditions environnementales futures. Par exemple, l'exposition de la drosophile femelle à un stress thermique engendre une meilleure tolérance de la descendance à une température élevée (Lockwood *et al.*, 2017). Cet effet est observé lorsque l'environnement maternel varie dans une direction qui permet de prédire l'environnement de la descendance. La sélection va donc favoriser des femelles produisant un certain phénotype adapté à ce futur environnement hétérogène. Cette plasticité phénotypique est favorisée lorsque les conditions environnementales changent entre les générations, qu'elles sont facilement prédictibles, que ce système de détection et de transmission est peu coûteux pour la mère et que la descendance en tire un avantage.

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

L'effet égoïste ou « *selfish maternal effect* » est le deuxième type d'effet maternel. Il s'observe lorsque la mère va privilégier sa survie aux dépens de la performance ou de la qualité de sa descendance. Chez le poisson-demoiselle, une forte densité de population induit un stress qui se manifeste notamment par une augmentation de l'agressivité envers ses congénères. Il se traduit par une réduction de la taille des larves qui affecte la survie de la descendance (McCormick, 2006). L'effet égoïste est en quelque sorte le contraire de l'effet d'anticipation. Il est observé d'autant plus fréquemment que les femelles sont susceptibles de rencontrer des conditions favorables lors des cycles de reproduction suivants et que la variabilité phénotypique, et donc le potentiel d'adaptation, de la descendance est faible.

La troisième catégorie d'effet maternel correspond au « *bet-hedging* » ou minimisation des risques. Il se manifeste lorsque l'évolution des conditions environnementales n'est pas prédictible. Une plus grande variété de phénotypes dans la descendance sera alors favorisée pour maximiser l'éventail de possibilités adaptatives et ainsi la survie d'au moins une partie de sa progéniture. Cette stratégie est observée chez le ver tubicole *Hydroïdes dianthus* dont le polymorphisme des larves planctoniques va permettre de coloniser des habitats différents (Toonen et Pawlik, 2001).

La quatrième catégorie correspond à un effet maternel qui n'entraîne de bénéfice ni pour la mère ni pour sa progéniture, c'est l'effet transmissif ou « *Transmissive maternal effect* ». Cet effet est observé chez les daphnies suite à une exposition aux microplastiques qui engendre une diminution du succès reproductif de l'espèce (Lee *et al.*, 2013). Il s'agit de la transmission, à la descendance, d'un trait de vie associé à l'environnement subi par la mère.

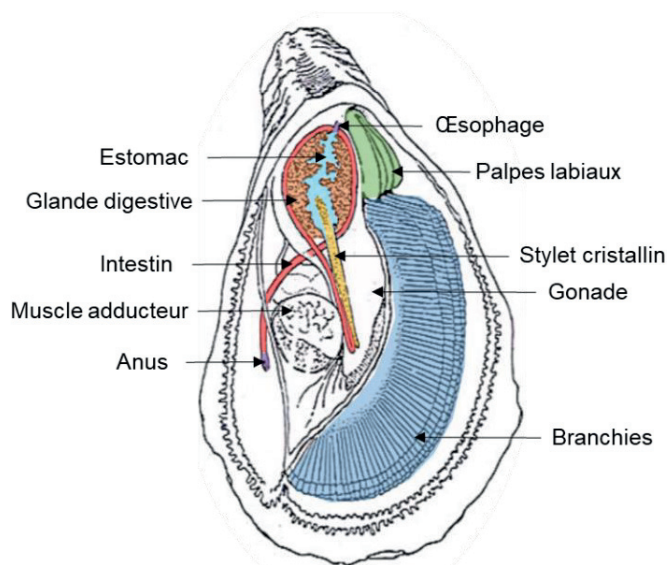
Bien que les effets maternels soient séparés en quatre classes, ils peuvent entrer en interaction. En effet, chez les poissons de roche du genre *Sebastes*, les effets maternels varient selon l'âge de la mère. Les mères jeunes, de petites tailles, produisent des larves de moins bonne qualité (effet égoïste) que les mères plus âgées. Ces femelles de grande taille peuvent donc allouer une plus grande énergie à la reproduction, se traduisant dans la descendance par des larves de meilleure qualité (effet d'anticipation). À cela s'ajoute une répartition de l'effort de reproduction des femelles au cours de la période de frai qui est dépendante de l'âge. Elle peut être perçue comme un effet de minimisation des risques en dispersant dans le temps les différents phénotypes de larves, qui vont donc être soumises à des conditions

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

environnementales différentes (Sogard *et al.*, 2008). L'environnement maternel est donc un élément clé du développement qui peut moduler le phénotype de l'embryon de manière positive ou négative.

#### 1.2.Effet maternel chez l'huître creuse : Cas des microplastiques et microalgues toxiques

L'huître creuse, *C. gigas*, est une espèce présente dans les écosystèmes littoraux et donc soumise à un environnement anthropisé très hétérogène en termes de conditions thermiques, de salinité et de sécheresse. Le cycle de vie de l'huître se déroule également en présence de microalgues toxiques et de microplastiques dont la gamme de taille correspond à celle des particules alimentaires ingérées par l'huître (Miossec *et al.*, 2009, Haberkorn *et al.*, 2010a, Cole et Galloway, 2015). En effet, les cils vibratiles de l'épithélium branchial créent un courant qui permet la filtration et la capture des particules alimentaires. Ces particules sont ensuite dirigées vers les palpes labiaux pour être triées en deux parties. Une partie est rejetée sous forme de pseudo-fèces et une autre partie est ingérée et broyée dans l'estomac par un stylet cristallin. Les nutriments seront ensuite dirigés et absorbés dans la glande digestive. Les restes de particules non-absorbées sont rejetées sous forme de fèces par l'anus. (Figure 29)



**Figure 29 : Schéma du système digestif de *C. gigas***

Schéma de l'anatomie interne de l'huître creuse dont les organes en couleur correspondent aux organes du système digestif. Modifié d'après Howard *et al.*, 2004

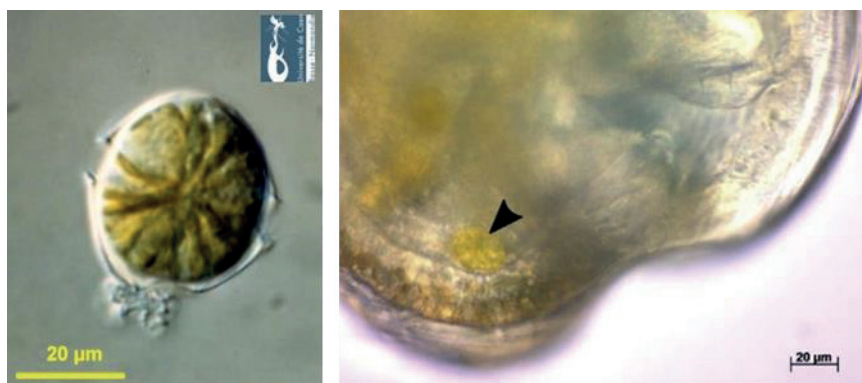
## Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

### 1.2.1. Microalgue toxique : *Alexandrium minutum*

L'anthropisation croissante du littoral due à l'urbanisation, l'agriculture et l'industrialisation entraîne l'eutrophisation du milieu marin *via* un apport important en azote et phosphore dans l'écosystème qui favorise la production de microalgues (Manivasagan et Kim, 2015). Ce contexte favorable au développement phytoplanctonique promeut des développements rapides de microalgues à de fortes concentrations. Ces efflorescences phytoplanctoniques peuvent être nuisibles en entraînant une hypoxie, une privation de lumière pour les organismes marins, ou encore en produisant des toxines qui ont un impact sur la chaîne alimentaire pouvant aller jusqu'à l'Homme (Sellner *et al.*, 2003, Manivasagan et Kim, 2015). Ces efflorescences nuisibles, aussi appelées « *Harmful algal blooms* » (HAB), sont fréquemment causées par des dinoflagellés (Smayda, 1997). Parmi eux, le genre *Alexandrium* est l'un des plus importants en termes de distribution et de sévérité des efflorescences toxiques, à l'origine de la production de saxitoxine et de ses dérivés (Anderson *et al.*, 2012). Ces PST (*Paralytic Shellfish Toxins*), à l'origine de paralysie neuromusculaire, inhibent la formation du potentiel d'action en se fixant aux canaux sodiques voltage-dépendant. Leur accumulation dans les Bivalves provoque chez l'Homme les symptômes d'une intoxication allant de picotements au niveau de la bouche et des extrémités jusqu'à la mort (Bricelj *et al.*, 2005, Manfrin *et al.*, 2012). L'apparition d'efflorescences d'espèces toxiques entraîne donc des pertes économiques avec l'arrêt de la pêche et de la vente de Bivalves susceptibles d'accumuler ces toxines (Murray *et al.*, 2009).

Au sein du genre *Alexandrium*, *Alexandrium minutum* (**figure 30**) est une espèce présentant une large aire de répartition avec une grande tolérance aux variations de température et de salinité (Lewis *et al.*, 2018). Des efflorescences annuelles sur les côtes françaises (Manche et Atlantique Nord-Est) sont observées avec une incidence de plus en plus importante (Guallar *et al.*, 2017). Ce dinoflagellé synthétise des PST et des composés extracellulaires bioactifs (BEC) nocifs pour de nombreuses espèces marines et particulièrement les organismes filtreurs (Haberkorn *et al.*, 2010a, Borcier *et al.*, 2017). En effet, l'exposition de Bivalves à cette microalgue entraîne un changement d'activité des valves, du taux de filtration et/ou une réaction inflammatoire pouvant conduire à une diminution de la croissance (Manfrin *et al.*, 2012, Coquereau *et al.*, 2016, Borcier *et al.*, 2017, Comeau *et al.*, 2019).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 30 : *Alexandrium minutum***

Observation d'*A. minutum* libre (gauche, banque de photo) et dans l'intestin de *C. gigas* au stade de larve œillée (droite, Castrec *et al.*, 2019) par microscopie optique. Dans l'intestin, *A. minutum* est localisé par une flèche.

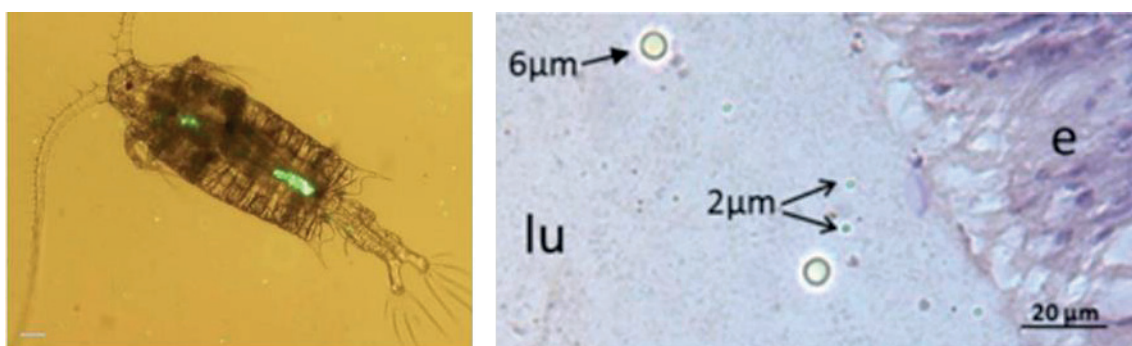
Chez *C. gigas*, *A. minutum* perturbe également le rythme biologique et induit une réaction inflammatoire au niveau de la glande digestive chez l'adulte (Haberkorn *et al.*, 2010a, 2010b, 2011, Tran *et al.*, 2010, 2015, Mat *et al.*, 2013, Payton *et al.*, 2017, Castrec *et al.*, 2018). Cette microalgue impacte aussi le développement larvaire en engendrant de nombreuses malformations, une réduction de la croissance et, pour les larves œillées capables d'ingérer la microalgue, une réduction de la prise alimentaire. De façon plus globale cette exposition affecte la survie des stades larvaires (Castrec *et al.*, 2020).

De plus, Castrec et collaborateurs (2019) mettent en évidence un effet parental lié à l'exposition d'*A. minutum*. En effet, cette exposition lors de la gamétogenèse engendre une augmentation de la consommation algale qui minimise potentiellement l'impact négatif d'*A. minutum* sur la gamétogenèse. Bien que le déroulement de la gamétogenèse ne soit pas affecté, l'exposition à *A. minutum* affecte la qualité des gamètes. En effet, la motilité des spermatozoïdes est affectée et une accumulation de PST est observée dans les gonades mâles et femelles. La descendance obtenue à partir de gamètes issus de géniteurs exposés présente une taille et une survie réduites. En revanche, ces larves sont moins sensibles à l'effet toxique d'*A. minutum*. Cet effet parental est potentiellement dû à l'accumulation des toxines dans les gonades, voire dans les gamètes (Rolton *et al.*, 2016), qui pourraient être transmises à la descendance, notamment *via* le cytoplasme ovocytaire.



### 1.2.2. Microplastiques

Les microplastiques (MP) sont des fragments de polymères synthétiques dont la taille est comprise entre 1µm et 5mm (Arthur *et al.*, 2009, Gigault *et al.*, 2018) (**figure 31**). Ces polluants émergents sont présents dans les océans du monde entier et sont classés en deux groupes : primaire et secondaire selon leur origine. Les MP primaires sont produits directement à ces dimensions pour de nombreuses applications industrielles et sont présents dans des produits cosmétiques et médicaux. Les MP dits secondaires sont formés à partir de la dégradation de déchets plastiques de plus grande taille par des processus chimiques, mécaniques ou biologiques (Duis et Coors, 2016, Auta *et al.*, 2017).



**Figure 31 : Microplastiques ingérés par un copépode et par l'huître creuse**  
Observation de MP de polystyrène (7,3 µm) ingérés par *Centropages typicus* (gauche, Cole *et al.*, 2013) et dans l'intestin de *C. gigas* (droite, Sussarellu *et al.*, 2016). 6µm : billes de 6µm, 2µm : billes de 2µm, lu : lumen, e : épithélium

Du fait de leur petite taille, les MP sont facilement ingérés par de très nombreuses espèces marines. Ils peuvent s'accumuler à différents niveaux trophiques et être transportés le long de la chaîne alimentaire (Auta *et al.*, 2017). Les Mollusques filtreurs comme *C. gigas* sont les consommateurs primaires qui ingèrent la plus grande quantité de MP, bien que ceux-ci ne semblent pas s'accumuler dans ces organismes (Miller *et al.*, 2020). Cependant, ils ont de nombreux impacts sur ces consommateurs en engendrant une réduction de la prise alimentaire, une dérégulation de l'immunité, une inflammation et une altération des tissus intestinaux et branchiaux, (Von Moos *et al.*, 2012, Besseling *et al.*, 2013, Paul-Pont *et al.*, 2016, Rist *et al.*, 2017, Green *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2019b). Un impact sur la gamétogenèse a été rapporté chez l'huître perlière et la daphnie où la réduction de l'effort de reproduction est une conséquence d'une altération de la balance énergétique due aux MP (Rist *et al.*, 2017, Gardon *et al.*, 2018).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

Chez l'huître creuse ces MP impactent aussi bien les larves que les adultes et l'exposition des larves engendre l'apparition de malformations allant jusqu'à des arrêts développementaux (Bringer *et al.*, 2020b, 2020a). Chez l'adulte, les MP engendrent des altérations tissulaires observées au niveau de la glande digestive et des branchies, des perturbations du métabolisme et des réponses inflammatoires pouvant mener à une augmentation de la mortalité lors d'une exposition chronique à de fortes concentrations de MP (Teng *et al.*, 2020, Thomas *et al.*, 2020). En plus de ces altérations physiologiques, Sussarellu et collaborateurs (2016) ont mis en évidence qu'une exposition de deux mois pendant la gamétogenèse impacte la reproduction de *C. gigas*. En effet, cette exposition induit un changement dans l'allocation énergétique vers la croissance au détriment de la reproduction, entraînant une réduction de la qualité des gamètes femelles. Cela se traduit par une diminution du nombre et de la taille des larves dont l'étape de fixation est retardée. Cette étude met en avant un effet maternel de l'exposition aux MP chez l'huître creuse. Un effet confirmé par l'analyse du transcriptome ovocytaire mettant en avant une altération de l'expression des ARNm maternels dans l'ovocyte, ce qui suggère leur potentielle fonction comme vecteur de cet effet environnemental (Sussarellu *et al.*, 2016).

#### 1.3. ARN maternels et N<sup>6</sup>-méthyladénosine

La transmission des effets maternels peut être réalisée par différents moyens lors de l'ovogenèse. En effet, le cytoplasme de l'ovocyte mature est constitué d'organites tels que les mitochondries, mais aussi de réserves vitellines, de protéines et d'ARN qui sont transmis à l'embryon. Ils forment les seules ressources pour les étapes précoces du développement (Byrne *et al.*, 1989, Picton *et al.*, 1998, Dumollard *et al.*, 2007).

Le génome zygotique est inactif au niveau transcriptionnel avant la MZT et ce sont les ARNm transmis *via* l'ovocyte qui représentent le premier transcriptome de l'embryon. Ces transcrits sont donc les seuls supports de la traduction permettant la synthèse de nouvelles protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la structuration de l'embryon, la morphogenèse mais aussi dans la dégradation des transcrits maternels conduisant à l'activation du génome zygotique (Horner et Wolfner, 2008, Tadros et Lipshitz, 2009, Clift et Schuh, 2013, Liu *et al.*, 2014b, Vastenhouw *et*



### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

*al.*, 2019). La régulation de ces ARNm, transmis par la mère, est donc un élément clé des premières phases du développement, associé aux phénotypes de l'embryon.

La régulation de ces ARNm fait notamment intervenir la N<sup>6</sup>-méthyladénosine. En effet, la m<sup>6</sup>A participe à la régulation de l'ovogenèse et plus particulièrement à la maturation des ovocytes lorsque la machinerie nécessaire à l'embryogenèse précoce est accumulée dans les gamètes femelles (Ivanova *et al.*, 2017, Lasman *et al.*, 2020a, Sui *et al.*, 2020). Ivanova et collaborateurs (2017) mettent en évidence le rôle du *reader* YTHDF2 dans la maturation ovocytaire chez la souris, où celui-ci régule le dosage des transcrits par la dégradation des ARNm. Ce dosage des ARNm maternels est essentiel au développement embryonnaire, puisque la déplétion d'YTHDF2 ou de la méthyltransférase METTL3 perturbe le transcriptome ovocytaire et conduit à un arrêt du développement au stade deux cellules (Ivanova *et al.*, 2017, Sui *et al.*, 2020). De plus, la m<sup>6</sup>A induit la dégradation des ARNm maternels *via* la famille des YTHDF, ce qui déclenche l'activation du génome zygotique (Zhao *et al.*, 2017, Kontur *et al.*, 2020). Ainsi, ces ARNm transmis par la mère sont cruciaux pour les premières étapes du développement et leur méthylation conditionne d'une part la sélection des transcrits pendant la vitellogenèse, et d'autre part leur devenir lors des premières divisions cellulaires.

L'accumulation d'ARN dans l'ovocyte est un processus influencé par de nombreux paramètres environnementaux maternels comme l'alimentation, la température ou la domestication. Ces conditions environnementales vont définir le microenvironnement cellulaire responsable du dosage et de la traduction des transcrits dans les gamètes femelles modulant ainsi le développement de l'embryon (Chen *et al.*, 2013, Lockwood *et al.*, 2017, Crofton *et al.*, 2018, De Almeida *et al.*, 2019). Par ailleurs, une alimentation riche en graisses chez la souris femelle induit une variation de la m<sup>6</sup>A chez la progéniture qui conduit à des changements dans le développement de leurs tissus adipeux (Li *et al.*, 2016a). La m<sup>6</sup>A apparaît alors comme un vecteur potentiel de transmission de traits de vie parentaux à la descendance et représenterait une composante de l'adaptation des organismes à l'environnement.

Dans les chapitres précédents de cette thèse, les analyses de la N<sup>6</sup>-méthyladénosine et de sa machinerie associée ont permis de mettre en évidence leur importance dans le développement de l'huître creuse. En effet, cette méthylation présente dès l'ovocyte et jusqu'au stade juvénile est potentiellement impliquée dans

## Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

la MZT, la gastrulation, la différenciation cellulaire et la métamorphose, des étapes critiques de son développement. La présence de la m<sup>6</sup>A dans les ovocytes met en avant une méthylation des ARN maternels de *C. gigas* pouvant potentiellement être modulée par l'environnement maternel. L'exposition de géniteurs aux MP ou à la microalgue toxique *A. minutum* engendre une diminution de la taille des larves (Sussarellu *et al.*, 2016, Castrec *et al.*, 2019). L'étude des méthylomes ovocytaires suite à l'exposition des géniteurs femelles aux MP ou à la microalgue toxique *A. minutum* permettra d'appréhender le rôle de la m<sup>6</sup>A comme vecteur d'effet maternel chez *C. gigas* (**Figure 32**).

L'étude décrite dans ce chapitre a été réalisée dans le cadre du projet HERITAGE (CNRS EC2CO ECODYN, coord. G. Rivière), dédié à l'analyse de la m<sup>6</sup>A en tant que vecteur d'héritabilité épitranscriptomique chez l'huître. Cette étude a bénéficié d'échantillons obtenus précédemment en amont du projet dans le cadre de conditionnements réalisés par Castrec et collaborateurs (2019) pour le conditionnement avec *A. minutum*, et Sussarellu et collaborateurs (2016) pour l'exposition aux MP.

## 2. Matériels et Méthodes

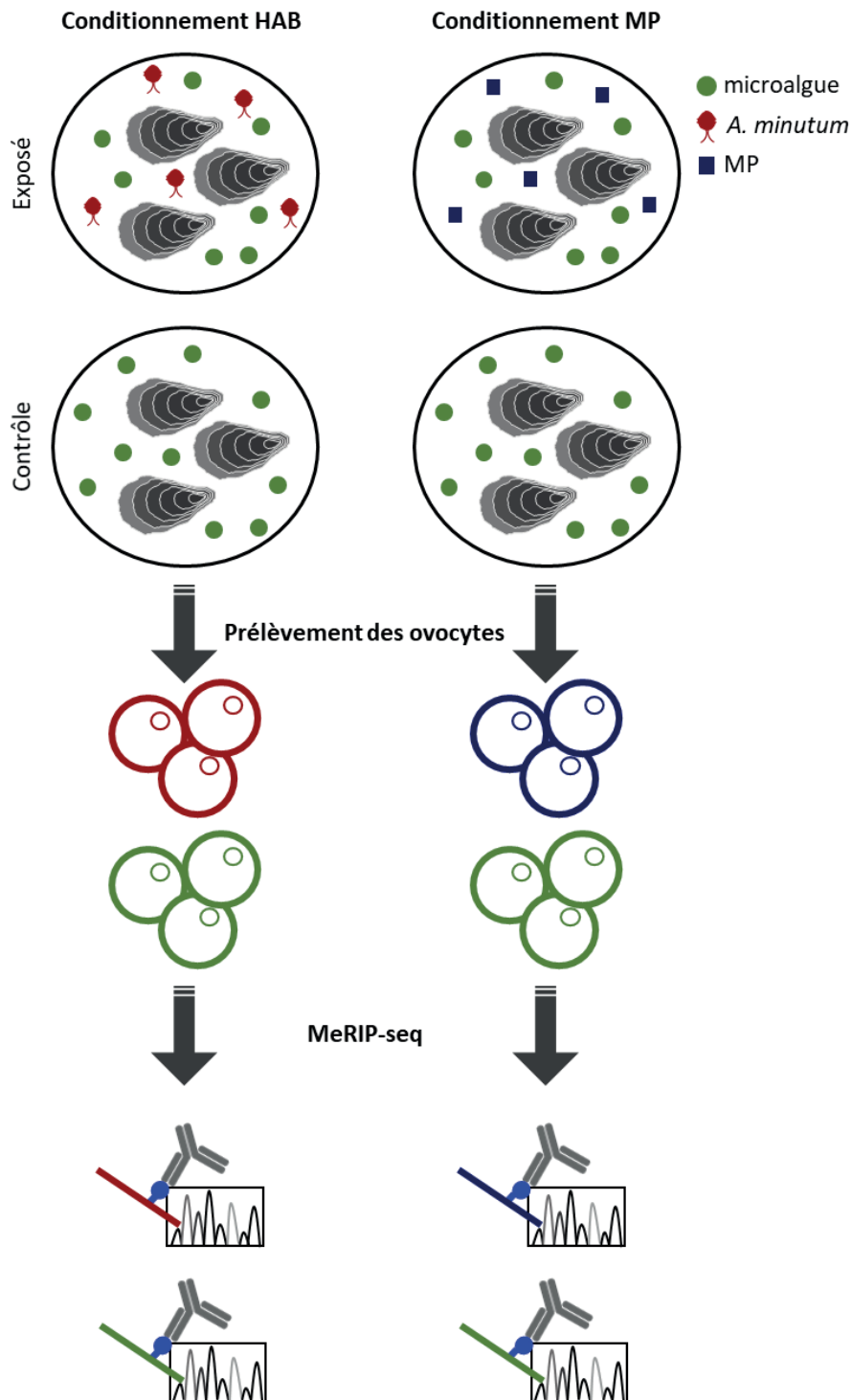
### 2.1. Exposition *Alexandrium minutum*

#### 2.1.1. Conditionnement

Les huîtres adultes sont produites et élevées dans un environnement contrôlé à la station marine Ifremer d'Argenton selon le protocole de Petton et collaborateurs (2015). Le stade de gamétogenèse des huîtres (12 mois) n'ayant jamais été en contact avec des microalgues toxiques, est vérifié par histologie et indique que ces huîtres sont à un stade précoce de gamétogenèse correspondant au stade 1, avant le conditionnement. Suite à une acclimatation, les huîtres sont réparties dans des bassins de 50 L (46 animaux par bassins) alimentés en eau de mer courante, filtrée à 1 µm et traitée aux UV (17 °C ± 0,1 °C, pH 8,3 ± 0,1, 35,1 ± 0,1 PSU). Elles sont nourries en continu pendant tout le conditionnement avec un mélange des microalgues *Tisochrysis lutea* (souche CCAP 927/14) et *Chaetoceros sp* (souche CCAP 1010-3) à volume égal (Petton *et al.*, 2015).

L'exposition à *A. minutum* (HAB) est réalisée dans trois bassins, en ajoutant à l'alimentation continue la microalgue produisant des PST et BEC (souche AM89BM).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 32 : Conditionnement des animaux**

**A.** Conditionnement HAB en présence d'*A. minutum* en condition exposée et de *H. triquetra* en condition contrôle. **B.** Conditionnement MP en présence de MP en condition exposée (billes de polystyrène de 2  $\mu$ m et 6  $\mu$ m) et sans en condition contrôle. À la suite du conditionnement de 12 et 18 mois pour les conditionnement HAB et MP, respectivement, les ARN ovocytaires extraits sont utilisés pour étudier les méthylomes.

## Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

À la suite de six semaines à une concentration de 10<sup>2</sup> cellules/mL, la concentration en *A. minutum* est progressivement augmentée sur quatre jours, pour atteindre 10<sup>3</sup> cellules/mL jusqu'à la fin du conditionnement. Cette augmentation de la concentration permet de mimer une efflorescence d'*A. minutum*, dont les concentrations et le temps d'exposition correspondent à son efflorescence sur les côtes françaises (Chapelle *et al.*, 2015). Les conditions contrôles sont réalisées dans trois bassins où la souche toxique est remplacée par *Heterocapsa triquetra* (souche AM89BM), un dinoflagellé non-toxique, qui est ajouté aux mêmes concentrations qu'*A. minutum*.

Ce conditionnement alimentaire permet d'obtenir des géniteurs matures contrôles (échantillons T) et exposés à *A. minutum* (échantillons HAB) à la fin des huit semaines de conditionnement.

### 2.1.2. Prélèvement des échantillons

Après les huit semaines de conditionnements 15 huîtres par traitement et par bassin sont prélevées pour récupérer les gamètes par lacération des gonades. Les ovocytes collectés sont regroupés par bassin et placés dans de l'eau de mer stérile puis filtrés sur un tamis de 100 µm. Un échantillonnage de 4 millions d'ovocytes par bassin est réalisé pour les extractions d'ARN.

### 2.1.3. Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits en utilisant du Tri-reagent (Sigma). Les phases aqueuses sont traitées 15 min à 37 °C à la rDNase (Macherey-Nagel) et purifiées par chromatographie d'affinité (Nucleospin RNA kit, Macherey-Nagel) selon les instructions des fournisseurs. La concentration et la qualité des ARN sont estimées par spectrophotométrie (ND-1000, Nanodrop Technologies). Les ARN extraits et purifiés sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

## 2.2. Exposition Microplastiques

### 2.2.1. Conditionnement

Des huîtres adultes, de 18 mois, provenant d'une écloserie sont transférées à la station marine d'Argenton où le stade de gamétogenèse précoce (stade 0 et 1) est vérifié par histologie. Suite à une acclimatation, les huîtres sont réparties dans trois bassins traités et trois bassins contrôles de 50 L (40 animaux par bassin) alimentés en

### **Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?**

eau de mer courante, filtrée à 1 µm et traitée aux UV (17 °C ± 0,5 °C, 34 PSU). Une alimentation continue leur est apportée par un mélange de deux microalgues, *Tisochrysis lutea* (souche CCAP 927/14) et *Chaetoceros gracilis* (souche UTEX LB2658) avec un ratio journalier équivalent à 8 % de la masse sèche algale/masse sèche de l'huître.

Les animaux sont exposés pendant huit semaines aux MP par ajout continu de micro-billes de polystyrène de 2 et 6 µm de diamètre à une concentration de 0,023 mg.L<sup>-1</sup> (Polyscience) à l'aide d'une pompe péristaltique. La concentration finale dans les bassins est de 0,01 mg.L<sup>-1</sup>, une concentration très faible par rapport aux concentrations observées dans d'autres expositions en milieu contrôlé ou *in situ* (Sussarellu *et al.*, 2016), mais une valeur proche de la concentration en styrène mesurée dans les eaux de la Manche (Kwon *et al.*, 2015).

Afin de prévenir l'agglomération des billes de MP, du Tween-20 est ajouté à une concentration finale de 0,0002 % dans les bassins contrôles (échantillons T) et traités aux MP (échantillons MP).

#### **2.2.2. Prélèvement des échantillons**

À la fin des huit semaines de conditionnement, six femelles par condition sont prélevées pour collecter les ovocytes par scarification de la gonade. Puis 20 000 ovocytes de chaque femelle sont récoltés dans de l'eau de mer et filtrés sur un tamis de 40 µm, puis transférés dans 1,5 mL de Extract-all (Eurobio) pour l'extraction d'ARN.

#### **2.2.3. Extractions ARN**

L'extraction des ARN totaux est réalisée en utilisant de l'Extract-all à raison de 1 mL pour 50 mg d'ovocytes. Puis les ARN sont traités à la DNase I (1 U.µg<sup>-1</sup>, Sigma) pour retirer toute éventuelle contamination d'ADN. La concentration et la qualité des ARN sont estimées par spectrophotométrie (ND-1000, Nanodrop Technologies). Les ARN extraits et purifiés sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

### **2.3. Fragmentation des ARN totaux**

La fragmentation des ARN est réalisée pour tous les échantillons obtenus à partir des deux conditionnements comme précédemment décrit (Zeng *et al.*, 2018). Brièvement, 5 µg d'ARN sont repris dans 18 µL d'eau RNase-free et 2 µL de tampon

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

de fragmentation (100 mM Tris-HCl pH 7,0, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, eau DEPC). La durée de l'incubation à 70 °C est déterminée empiriquement pour chaque échantillon afin d'obtenir une taille moyenne des fragments à 200 nucléotides (4 et 2,5 min selon les conditionnements *A. minutum* et MP respectivement). Suite à l'incubation, 2 µL d'EDTA à 0,5 M sont ajoutés et les ARN sont incubés 2 min sur de la glace, pour arrêter la réaction. Les ARN fragmentés sont purifiés à l'aide de billes paramagnétiques AgencourtAMPure XP (Beckman Coulter) et la taille des fragments est vérifiée avec le kit Agilent RNA 6000 pico sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent) selon les instructions des fournisseurs. Les ARN totaux issus de cette fragmentation chimique correspondent à la fraction totale ou « input ».

#### 2.4.MeRIP

L'immunoprécipitation des fragments méthylés est réalisée selon le protocole établi par Zeng et collaborateurs (2018) à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-m<sup>6</sup>A. Pour chaque échantillon, 30 µL de billes magnétiques couplées à la protéine A et à la protéine G (Thermo Fisher Scientific) sont retenues sur un support magnétique et rincées à deux reprises avec du tampon IP (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, IGEPAL 0,1 %, eau DEPC) puis reprises dans 500 µL de ce même tampon. Les billes magnétiques sont ensuite incubées avec 5 µg d'anticorps anti-m<sup>6</sup>A (ABE572, Millipore) à 4 °C pendant une nuit sous agitation douce.

Une quantité de 1,2 µg d'ARN totaux fragmentés (5 µL de la fraction totale) est diluée avec 100 µL de tampon IP 5X, 5 µL de RNasin Plus Ribonuclease inhibitor (Promega). Le mélange est complété à 500 µL avec du tampon IP. Ce mélange est ajouté aux billes magnétiques couplées à l'anticorps après qu'elles aient subi deux rinçages avec 100 µL de tampon IP. La solution ARN/billes est ensuite incubée 2 h à 4 °C sous agitation douce pour capturer les fragments méthylés. Les billes sont ensuite rincées deux fois avec le tampon IP, deux fois avec un tampon à faible concentration en sel (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % IGEPAL, eau DEPC) et deux fois avec un tampon à forte concentration en sel (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % IGEPAL, eau DEPC), pendant 10 min à 4°C sous agitation douce pour chaque rinçage. Après deux rinçages supplémentaires à température ambiante sur le support magnétique avec du tampon IP, les fragments d'ARN méthylés capturés sont élués par reprise des billes dans 200 µL du tampon RA1 (Nucleospin RNA Clean up kit, Macherey-Nagel) pendant 2 min à température ambiante. Les billes sont ensuite

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

retenues sur le support magnétique pendant 1 min puis les fragments d'ARN immunoprécipités contenus dans le surnageant sont purifiés par chromatographie d'affinité (Nucleospin RNA Clean up kit, Macherey-Nagel). L'élution finale est réalisée dans 14 µl d'eau RNase-free (deux passages successifs sur la colonne) et constitue la fraction immunoprécipitée ou « IP ».

#### 2.5. Préparation des banques de séquençage

Des quantités d'IP correspondant à 0,3 µg d'ARN total de départ (3 µL) et d'Input correspondant à 50ng d'ARN totaux sont utilisées pour construire les banques de séquençage avec le SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v.2 (634418, Pico Input Mammalian, Takara) selon les instructions du fournisseur (protocole sans fragmentation). Une amplification finale de 16 cycles est réalisée. Une banque IP et une banque Input par échantillon (exposition HAB. : n=3 contrôles et n=3 HAB ; exposition MP : n=6 contrôles et n=6 MP) sont réalisées. Les banques sont séquencées sur une plateforme Illumina Hiseq 4000 (2x200 pb à Genewiz, Europe).

#### 2.6. Analyse des données MeRIP-seq

La qualité des séquençages IP et Input de chaque échantillon est évaluée en utilisant FastQC (v.0.11.7) et MultiQC (v.1.7) et les adaptateurs et les séquences de mauvaise qualité sont éliminés avec Trimmomatic (v.0.38). Les séquences restantes sont alignées sur le génome de l'huître (GCF\_902806645.1) (Penalosa *et al.*, 2020) et les séquences alignées de manière non ambiguë (*uniquely mapped reads*) sont comptées avec STAR (v.2.7.3a; -quantMode GeneCounts) (Dobin *et al.*, 2013).

L'identification des pics significativement enrichis en m<sup>6</sup>A et différentiellement méthylés (FDR < 5 %), entre les conditions « traités » et « contrôles » pour chaque conditionnement, au sein des séquences alignées de manière non ambiguë est réalisée avec Samtools (v.1.9) et le package R *ExomePeak* (Meng *et al.*, 2014).

Le niveau d'expression des gènes est exprimé en TPM (transcrits par million) (Li *et al.*, 2010) pour chaque échantillon et l'identification des gènes différentiellement exprimés (FDR < 5%), entre les conditions « traités » et « contrôles » pour chaque



## Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

conditionnement, est réalisée avec DEseq2 (Love *et al.*, 2014). Sauf mention contraire, les programmes sont utilisés avec les paramètres par défaut.

### 2.7. Analyses de l'ontologie des gènes

Les séquences d'ARN significativement méthylées sont identifiées dans la base de données transcriptomiques GigaTON (Riviere *et al.*, 2015) en utilisant BlastN (Altschul *et al.*, 1997, Camacho *et al.*, 2009, Cock *et al.*, 2015) avec les réglages par défaut. L'analyse de l'ontologie des gènes (GO) est effectuée avec les annotations GO obtenues à partir de la base de données transcriptomiques GigaTON (Riviere *et al.*, 2015). L'enrichissement des termes de GO est réalisé avec le plugin ClueGO (v2.5.7) sur Cytoscape (v.3.8.0). La significativité de l'enrichissement des termes est calculée par un test hypergéométrique avec une FDR < 5%.

### 2.8. Analyses statistiques et production de graphiques

Les analyses bioinformatiques sont réalisées sur les logiciels R (v.3.6.3) et R studio (v.1.0.153). Les packages R *eulerr* (Larsson, 2019), *ComplexHeatmap* (Gu *et al.*, 2016), *ggplot2* (Gómez-Rubio, 2017), *Guitar* (Cui *et al.*, 2016b), *PCAtools* (Blighe et Lewis, 2019) sont utilisés pour la production des figures.

## 3. Résultats

### 3.1. Analyse primaire des données de MeRIP-seq

Suite aux analyses primaires, un à deux échantillons par groupe et par type d'exposition ont été écartés en raison d'une mauvaise qualité ou de paramètres trop hétérogènes. Les échantillons T3 et HAB3 ont été écartés de l'analyse HAB. car ils présentent un nombre de *reads* (fragments d'ADNc lus) en Input et IP et une qualité en IP moindre par rapport à l'ensemble des échantillons, respectivement (**Tableau 4**). Les échantillons T5, T6, MP5 et MP6 ont été écartés de l'analyse MP car ils présentent un faible nombre de *reads* en Input par rapport à l'ensemble des échantillons (**Tableau 5 et 6**).

Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

**Tableau 4 : Valeurs de qualité de l’alignement avec STAR des échantillons du conditionnement A. minutum.** Les résultats de l’alignement sont présentés pour chaque échantillon avec en rouge les valeurs relatives à une mauvaise qualité ou à une hétérogénéité des échantillons.

		HAB2	HAB3	HAB1	T1	T3	T2
<b>Input</b>	<b>Nombre de reads</b>	41 481 206	32 390 302	37 413 555	32 912 687	34 016 055	29 982 870
	<b>Taille des reads</b>	280	280	268	284	283	259
	<b>% de reads non ambigus</b>	71,04%	72,11%	70,82%	73,16%	71,36%	70,60%
	<b>% de reads ambigus</b>	26,47%	25,45%	26,32%	24,35%	26,12%	26,24%
	<b>% de reads trop courts</b>	2,37%	2,34%	2,64%	2,39%	2,40%	2,89%
<b>IP</b>	<b>Nombre de reads</b>	5 265 154	5 408 304	4 155 268	7 299 998	4 646 915	2 509 375
	<b>Taille des reads</b>	287	288	282	287	282	281
	<b>% de reads non ambigus</b>	73,46%	74,56%	60,67%	73,74%	65,37%	71,86%
	<b>% de reads ambigus</b>	12,31%	11,15%	14,46%	11,85%	15,76%	11,41%
	<b>% de reads trop courts</b>	14,02%	14,08%	24,61%	14,21%	18,67%	16,38%

Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

**Tableau 5 : Valeurs de qualité de l'alignement avec STAR des échantillons MP du conditionnement MP.** Les résultats de l'alignement sont présentés pour chaque échantillon avec en rouge les valeurs relatives à une mauvaise qualité ou à une hétérogénéité des échantillons.

		MP2	MP3	MP5	MP6	MP1	MP4
<b>Input</b>	<b>Nombre de reads</b>	19 256 383	23 333 812	55 660 552	30 250 847	6 025 368	7 630 816
	<b>Taille des reads</b>	291	287	242	291	283	275
	<b>% de reads non ambigus</b>	77,82%	76,78%	65,24%	78,60%	74,88%	75,57%
	<b>% de reads ambigus</b>	20,38%	21,03%	31,59%	19,87%	23,51%	22,40%
	<b>% de reads trop courts</b>	1,75%	2,12%	2,91%	1,49%	1,54%	1,94%
<b>IP</b>	<b>Nombre de reads</b>	13 815 924	21 085 032	14 476 752	11 764 215	12 433 383	21 085 032
	<b>Taille des reads</b>	290	287	289	289	290	287
	<b>% de reads non ambigus</b>	87,52%	86,54%	85,78%	81,00%	87,14%	89,42%
	<b>% de reads ambigus</b>	7,02%	6,63%	9,01%	13,89%	7,83%	6,63%
	<b>% de reads trop courts</b>	5,23%	6,61%	5,09%	4,93%	4,88%	4,69%

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

**Tableau 6 : Valeurs de qualité de l’alignement avec STAR des échantillons témoins du conditionnement MP.** Les résultats de l’alignement sont présentés pour chaque échantillon avec en rouge les valeurs relatives à une mauvaise qualité ou à une hétérogénéité des échantillons.

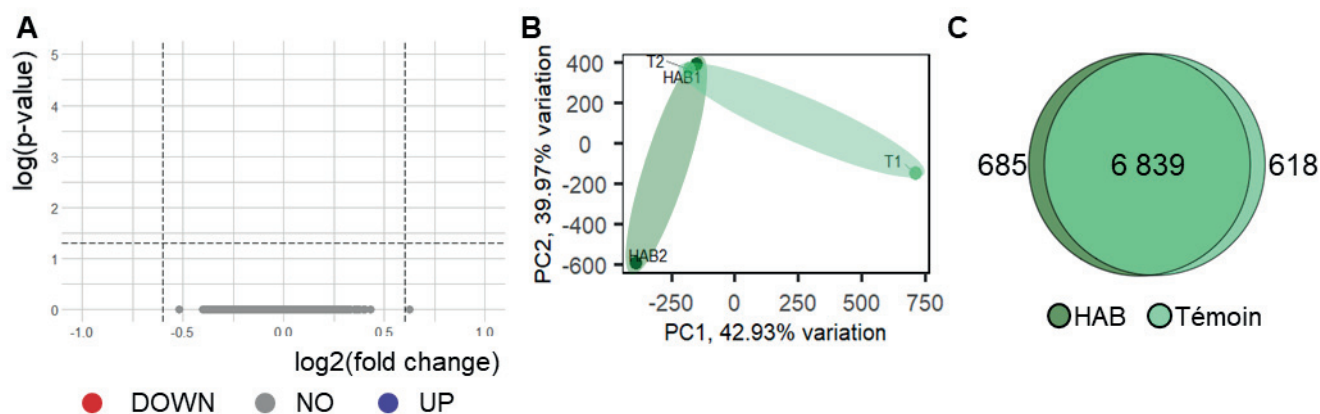
		T2	T5	T8	T9	T3	T4
<b>Input</b>	<b>Nombre de reads</b>	30 749 730	36 605 430	54 411 369	33 863 629	11 229 876	19 726 635
	<b>Taille des reads</b>	287	292	289	247	286	276
	<b>% de reads non ambigus</b>	75,98%	77,19%	76,80%	66,82%	75,33%	75,49%
	<b>% de reads ambigus</b>	21,80%	20,78%	21,20%	30,05%	23,01%	22,74%
	<b>% de reads trop courts</b>	2,15%	1,97%	1,95%	2,91%	1,60%	1,66%
<b>IP</b>	<b>Nombre de reads</b>	9 417 682	13 948 252	13 271 214	9 402 111	11 229 264	11 068 421
	<b>Taille des reads</b>	295	289	283	289	294	293
	<b>% de reads non ambigus</b>	89,06%	87,91%	87,53%	88,07%	89,51%	88,56%
	<b>% de reads ambigus</b>	5,63%	6,15%	6,46%	6,50%	5,48%	6,06%
	<b>% de reads trop courts</b>	5,15%	5,72%	5,83%	5,25%	4,87%	5,22%

### 3.2. Étude de l’exposition à *Alexandrium minutum*

**L’exposition des géniteurs à *A. minutum* affecte la m<sup>6</sup>A des transcrits ovocytaires sans affecter leur abondance.**

L’étude du contenu ovocytaire en transcrits ne montre pas de différence significative induite par une exposition ou non des femelles à *A. minutum* (**Figure 33A**). Cependant, l’analyse en composante principale (ACP) du niveau de méthylation de ces transcrits indique une discrimination des échantillons correspondant aux groupes contrôles et HAB selon les composantes PC1 et PC2 expliquant 42,93% et 39,97% de la variance, respectivement (**Figure 33B**). Bien que la ségrégation des échantillons T2 et HAB1 soit peu marquée, la différence de méthylation entre ces deux conditions est confirmée par la distribution des transcrits significativement méthylés (**Figure 33C**).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 33 : Influence d'une exposition maternelle à *A. minutum* sur les transcriptomes et épitranscriptomes ovocytaires.**

**A.** Volcanoplot des transcrits différentiellement représentés entre les ovocytes issus de géniteurs contrôle et exposés à *A. minutum*. Les couleurs reflètent les variations du contenu ovocytaire (rouge : sous-représenté, gris, pas de différence, bleu : sur-représenté). **B.** Analyse en composante principale (ACP) des résultats du MeRIP-seq. Le graphique représente les deux premières composantes pour chaque échantillon. **C.** Distribution des transcrits significativement m<sup>6</sup>A-méthylés dans les ovocytes issus de femelles contrôle (Témoin, n=2) et exposées à *A. minutum* (*Harmful Algae Bloom*, HAB, n=2).

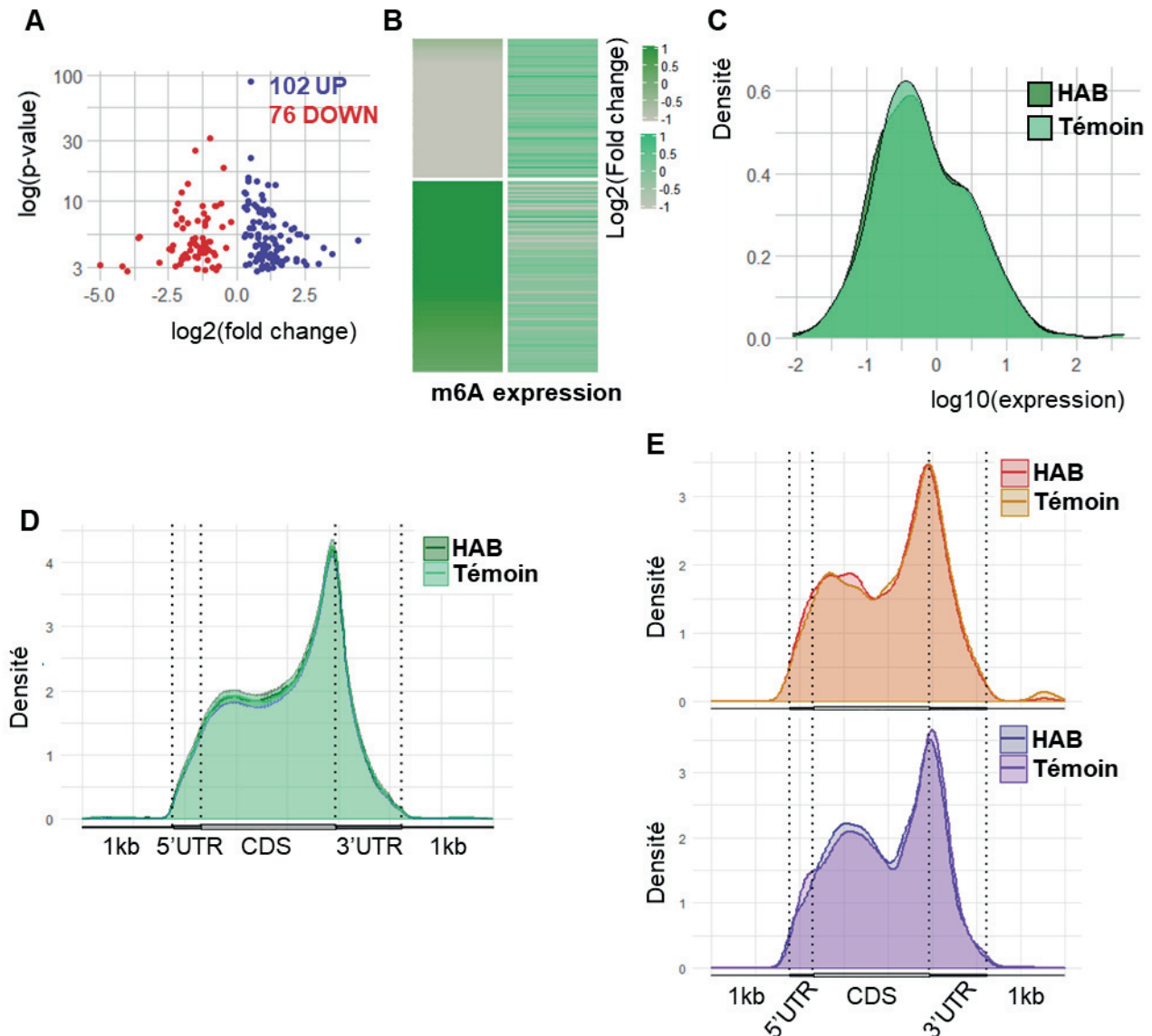
En effet, 8,4% (n=685) et 7,6% (n=618) des transcrits présentent une méthylation spécifique dans les gamètes provenant de femelles exposées ou non à la microalgue toxique, respectivement. Les 6 839 (84,0%) transcrits communs à ces conditions laissent entrevoir une potentielle variation de la localisation de cette méthylation.

Ces résultats ne mettent pas en évidence de différence d'abondance des transcrits, mais une différence de leur méthylation, dans les ovocytes issus de femelles contrôles et exposées à *A. minutum*.

#### **L'exposition de femelles à *A. minutum* pendant la gamétogenèse module le niveau de méthylation d'une sous-population de transcrits dans les ovocytes.**

L'exposition à *A. minutum* provoque un différentiel de niveau de m<sup>6</sup>A pour 178 transcrits (DM), dont 76 et 102 présentent une diminution ou une augmentation du niveau de méthylation, respectivement (**Figure 34A**). Le changement du niveau de m<sup>6</sup>A des DM n'est pas corrélé avec une variation du nombre de transcrits dans les ovocytes (**Figure 34B**).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 34 : Caractérisation des changements épitranscriptomiques ovocytaires induits par l'exposition maternelle à *A. minutum***

**A.** Volcanoplot des transcrits différentiellement méthylés (DM) entre les ovocytes issus de géniteurs contrôle et exposés à *A. minutum*. Les couleurs reflètent les variations du niveau de méthylation (rouge : hypométhylé, gris, pas de différence, bleu : hyperméthylé). **B.** Association entre le facteur de variation ('*fold change*') du niveau de méthylation (à gauche) et le contenu ovocytaire (à droite) des transcrits différentiellement méthylés entre les conditions « témoin » et « HAB ». **C.** Distribution de la représentation des transcrits ( $\log_{10}$  TPM) différentiellement méthylés dans les ovocytes « témoin » et « HAB ». **D.** Profil de localisation de la m<sup>6</sup>A sur l'ensemble des transcrits dans les conditions contrôle et HAB. **E.** Profil de localisation de la m<sup>6</sup>A sur les transcrits différentiellement méthylés. En haut (rouge) DM hypométhylés, en bas (violet) DM hyperméthylés. UTR : région non traduite ('untranslated region') ; CDS : séquence codante ; kb : kilobase ; HAB : *A. minutum* (*Harmful Algae Bloom* : HAB).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

De la même manière, la **figure 34C** montre une superposition des courbes d'abondance des transcrits illustrant l'absence de différence d'expression des DM entre les conditionnements témoin et HAB. Une observation cohérente avec l'absence de différence d'accumulation de transcrits dans leur ensemble entre les conditions d'exposition.

Le transcriptome ovocytaire présente une m<sup>6</sup>A de l'UTR 5' à l'UTR 3' avec un enrichissement dans la région codante (CDS) et particulièrement autour du codon stop (**Figure 34D**). Cependant, l'exposition à *A. minutum* affecte la méthylation d'une sous population de transcrits qui possède un profil spécifique de méthylation. En effet, bien que l'enrichissement important au niveau du codon stop soit présent, un second pic d'enrichissement apparaît en 5' de la CDS des DM (**Figure 34E**). Cette distribution bimodale de la m<sup>6</sup>A dans les DM semble résulter d'une diminution de la méthylation relative au niveau du codon stop au profit de la CDS-5' par rapport aux transcrits dont la méthylation n'est pas affectée par l'exposition à *A. minutum*.

#### **L'exposition maternelle à *A. minutum* affecte la méthylation de gènes associés au contrôle de la division cellulaire.**

L'analyse de l'ontologie des gènes (GO) codants les transcrits DM dans les ovocytes de géniteurs exposés à *A. minutum* montre un enrichissement en termes liés à la régulation de la division cellulaire. Ils sont associés à l'assemblage du fuseau mitotique, la signalisation de la division cellulaire ou l'organisation nucléaire (**Figure 35**).

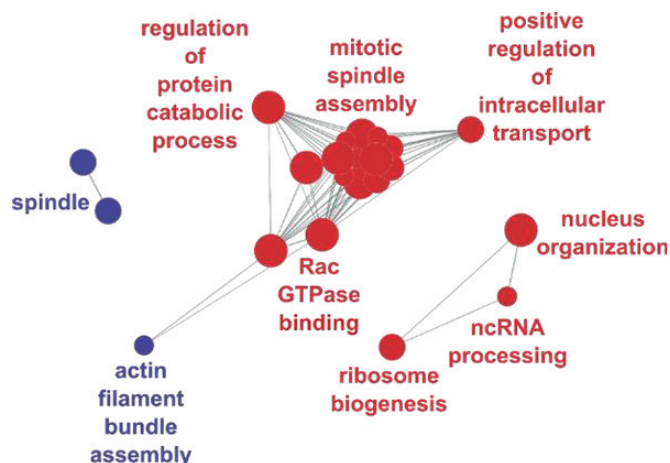
### **3.3. Étude de l'exposition aux microplastiques**

#### **L'exposition aux MP affecte les transcriptomes et les épitranscriptomes ovocytaires.**

L'exposition des géniteurs aux MP perturbe à la fois le transcriptome ovocytaire et leur épitranscriptome m<sup>6</sup>A associé. L'analyse du contenu ovocytaire en transcrits, suite à une exposition aux MP lors de l'ovogenèse, met en avant l'abondance différentielle de 12 gènes dont deux sont surexprimés et 10 sous-exprimés (**Figure 36A**). L'analyse en composantes principales des résultats du MeRIP-seq met en avant une séparation des échantillons selon la présence ou non des MP lors du conditionnement.



### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 35 : Annotation fonctionnelle des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle à *A. minutum*.**

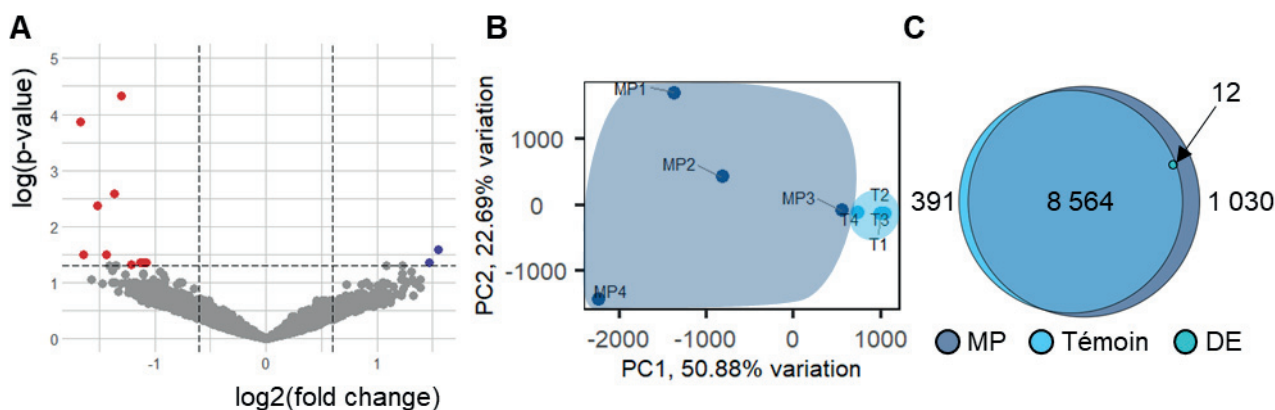
Représentation en réseau des termes ontologiques significativement enrichis (test hypergéométrique, FDR<0,05) dans les ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle au dinoflagellé *A. minutum*. Les couleurs reflètent l'augmentation (cluster 'up', bleu) ou la diminution (cluster 'down', rouge) du niveau de m<sup>6</sup>A des gènes associés aux termes indiqués. La couleur associée au terme correspond au cluster d'appartenance de la majorité des termes qui le définissent (ex. la majorité des gènes associés au terme '*nucleus organization*' sont hypométhylés en condition HAB). La taille des cercles est inversement corrélée à la *p*-value du résultat du test d'enrichissement des termes.

Les PC1 et PC2 expliquent 50,88% et 22,69% de la variance, respectivement (**Figure 36B**). Cette séparation des échantillons, selon les conditions, est confirmée par la répartition des transcrits méthylés au sein des transcriptomes ovocytaires des conditions MP et témoin (**Figure 36C**). En effet, 391 (3,9%) et 1 030 (10,2%) transcrits sont identifiés comme spécifiquement méthylés dans les épitranscriptomes des conditions témoin ou MP, respectivement. Les 12 transcrits au contenu enrichi ou déplété par rapport aux contrôles sont méthylés dans les deux conditions.

#### **Les MP induisent une relocalisation en 5' de la m<sup>6</sup>A des transcrits différentiellement méthylés.**

Une exposition parentale aux MP conduit à une augmentation significative du niveau de m<sup>6</sup>A sur les transcrits de 476 gènes, et aucune diminution n'est détectée (**Figure 37A**).

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?



**Figure 36 : Dynamique de l'expression et de la méthylation des gènes des ovocytes entre les conditions d'exposition : Microplastiques**

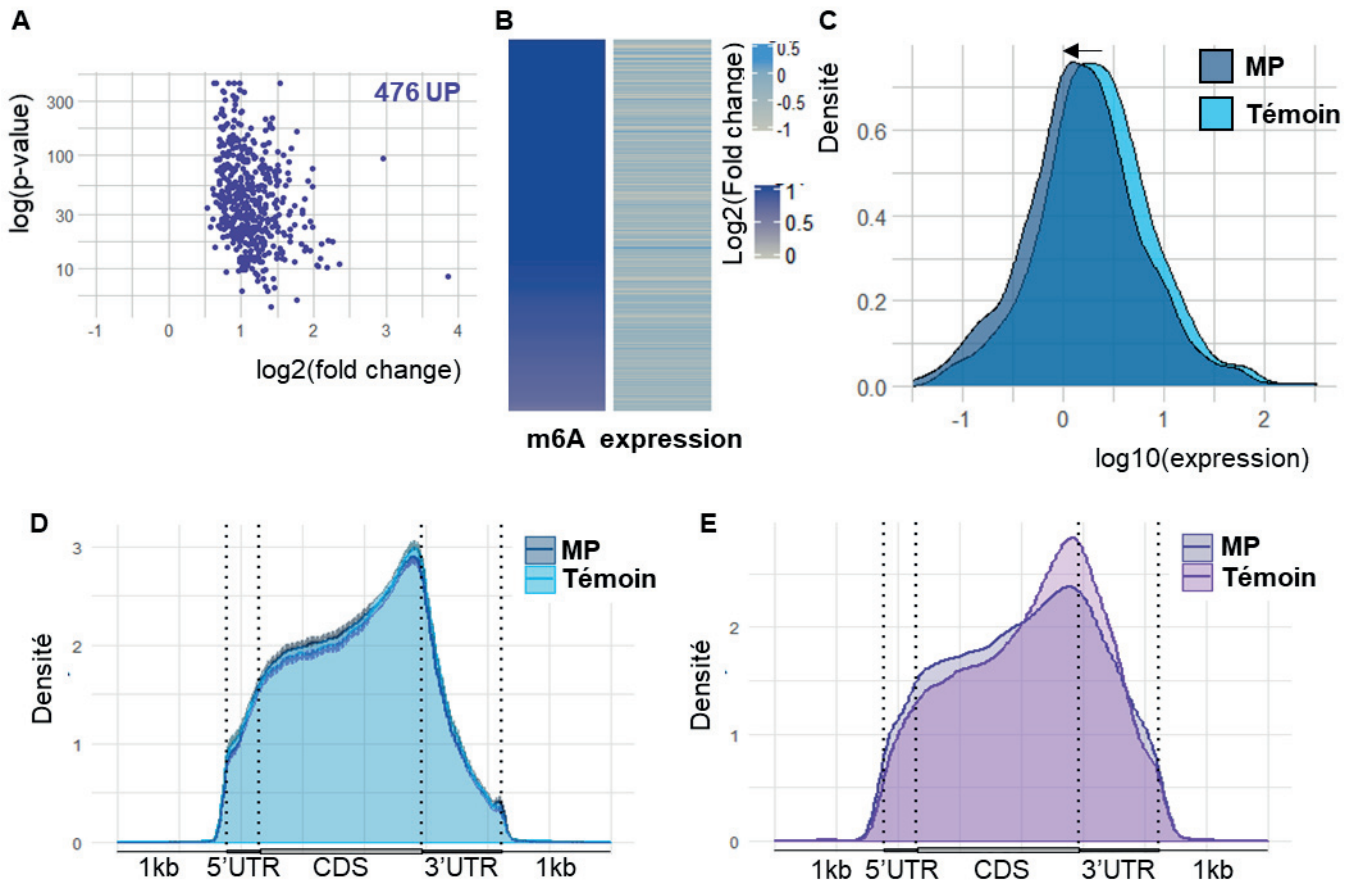
**A.** Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre les conditions « traités » et « contrôles ». **B.** Analyse en composante principale (ACP) des résultats du MeRIP-seq. Le graphique représente les deux premières composantes pour chaque échantillon. **C.** Distribution des transcrits significativement méthylés dans les ovocytes issus de femelles contrôle (Témoin, n= 4) et exposées aux MP (MP, n=4). T : témoin, DE : différentiellement exprimé.

L'analyse de l'expression des DM met en avant une potentielle corrélation négative entre le niveau de m<sup>6</sup>A en hausse et une représentation en baisse dans les transcriptomes des ovocytes MP (**Figure 37B**). Bien qu'une telle corrélation ne soit pas statistiquement significative, cette tendance est confirmée par un décalage de la distribution de l'abondance des DM vers des valeurs plus faibles de TPM (**Figure 37C**). La **figure 37D** montre la localisation générale de la m<sup>6</sup>A le long des transcrits significativement méthylés des deux conditions d'exposition. La m<sup>6</sup>A est présente dans l'ensemble de la CDS et particulièrement concentrée autour du codon stop, un profil similaire à celui précédemment observé lors du développement (cf. chapitre II) et du conditionnement HAB. Cependant, suite à l'exposition des géniteurs aux MP, la localisation de la m<sup>6</sup>A dans les DM est modifiée avec une diminution de la méthylation autour du codon stop en faveur de la région 5' de la CDS (**Figure 37E**).

#### **L'exposition aux MP affecte l'épitranscriptome de gènes liés à la régulation de l'expression des gènes et du développement.**

La fonction des gènes codant les DM dans les ovocytes MP, explorée par l'analyse de l'ontologie des gènes, indique un enrichissement en termes liés à la régulation de la transcription, de la traduction et de l'épissage.

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

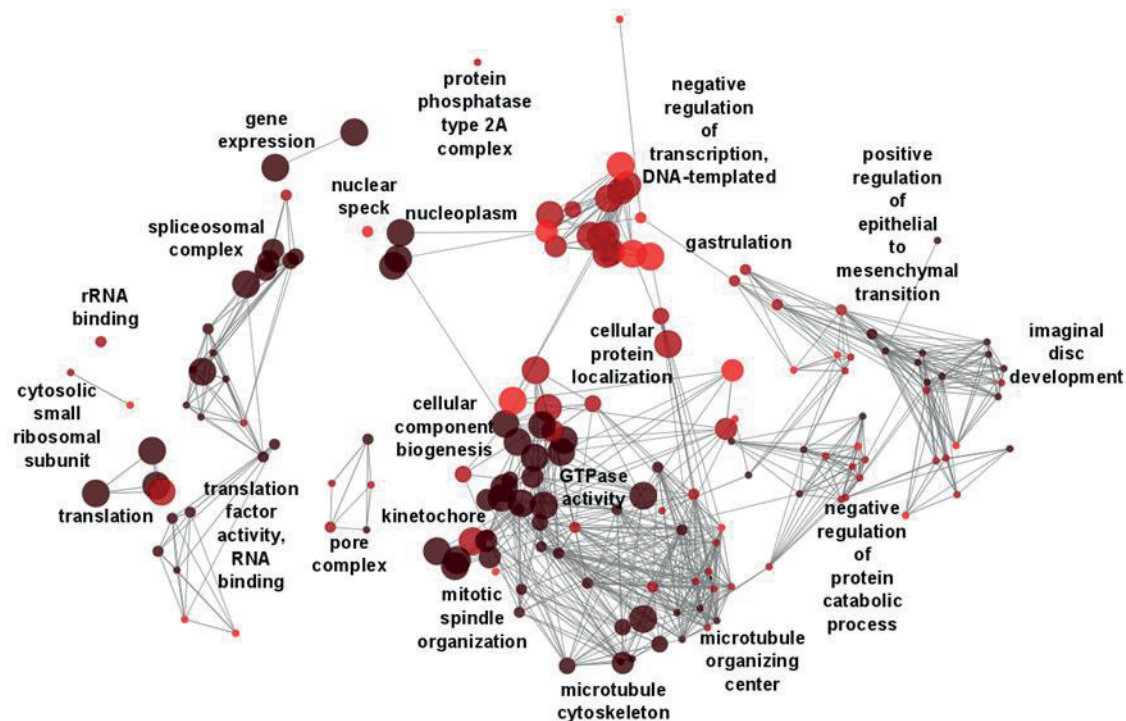


**Figure 37 : Caractérisation des changements épitranscriptomiques ovocytaires induits par l'exposition maternelle aux microplastiques.**

**A.** Volcanoplote des transcrits différentiellement méthylés (DM) entre les ovocytes issus de géniteurs contrôle et exposés aux microplastiques. Les couleurs reflètent les variations du niveau de méthylation (rouge : hypométhylé, gris, pas de différence, bleu : hyperméthylé). **B.** Association entre le facteur de variation (*'fold change'*) du niveau de méthylation (à gauche) et le contenu ovocytaire (à droite) des transcrits différentiellement méthylés dans les ovocytes entre les conditions « témoin » et « MP ». **C.** Distribution de la représentation des transcrits ( $\log_{10}$  TPM) différentiellement méthylés dans les ovocytes « témoin » et « MP ». **D.** Profil de localisation de la m<sup>6</sup>A sur l'ensemble des transcrits dans les conditions contrôle et MP. **E.** Profil de localisation de la m<sup>6</sup>A sur les transcrits différentiellement méthylés. UTR : région non traduite (*'untranslated region'*) ; CDS : séquence codante ; kb : kilobase; MP : microplastiques.

## Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

Ils sont aussi associés à la division cellulaire, la gastrulation et la transition épithélio-mésenchymateuse (**Figure 38**). Ces fonctions indiquent que l'exposition maternelle aux MP modifie l'épitranscriptome de gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes lors de la gastrulation.



**Figure 38 : Annotation fonctionnelle des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle aux microplastiques.**

Représentation en réseau des termes ontologiques significativement enrichis (test hypergéométrique, FDR<0,01) dans les ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle aux MP. La teinte reflète la p-value du test d'enrichissement des termes (dégradé du clair au foncé correspondant à une p-value de 0,01 à <0,0005, respectivement). Le diamètre des cercles est corrélé au nombre de gènes associé à chaque terme.

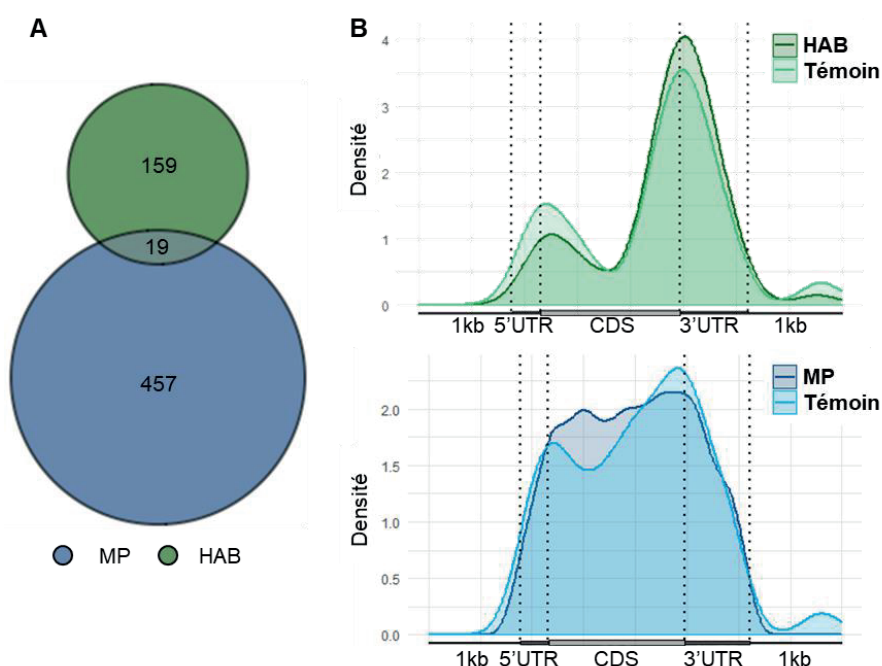
### 3.4. Comparaison de la réponse épitranscriptomique entre les conditionnements

**L'environnement maternel induit des signatures épitranscriptomiques ovocytaires spécifiques.**

L'algue toxique *A. minutum* et les microplastiques engendrent une altération de la méthylation de 178 et 476 transcrits dans les ovocytes de géniteurs exposés, respectivement. Parmi ces transcrits différentiellement méthylés par rapport aux contrôles, seuls 19 sont communs entre les conditionnements HAB et MP (**Figure**

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

**39A).** Sur ces 19 DM communs, la méthylation présente une distribution bimodale dans les conditions contrôles pour les deux traitements, avec un enrichissement important autour du codon stop et un second pic dans la partie 5' de la CDS. Lors d'une exposition HAB cette distribution varie, avec une augmentation de la méthylation autour du codon stop, au détriment d'une méthylation en 5'-CDS. Au contraire, l'exposition aux MP induit sur ces mêmes DM un autre profil de méthylation qui se caractérise par une perte de la distribution bimodale de la m<sup>6</sup>A en faveur d'une répartition uniforme le long de la CDS (**Figure 39B**). En parallèle de ces changements de profil de méthylation, les niveaux de m<sup>6</sup>A qui augmentent pour tous ces DM suite à l'exposition maternelle aux MP, peuvent varier à la hausse ou à la baisse en condition HAB. (**Tableau 7**).



**Figure 39 : Comparaison des signatures épitranscriptomiques ovocytaires de l'exposition maternelle à la microalgue *A. minutum* et aux microplastiques.**

**A.** Distribution des transcrits différentiellement méthylés entre les ovocytes issus de femelles exposées à *A. minutum* (HAB) et aux microplastiques (MP). **B.** Profil de localisation de la m<sup>6</sup>A sur les 19 DM communs aux deux conditionnements, suite à l'exposition à *A. minutum* (graphique du haut) ou aux MP (graphique du bas). MP : microplastiques, HAB : *A. minutum*, UTR : region non traduite ; CDS : séquence codante ; kb : kilobase.



### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

**Les DM communs sont issus de gènes impliqués dans des fonctions cruciales lors du développement.**

Par ailleurs, les fonctions des gènes codant ces DM indiquent leur implication dans la régulation de la mitose (contrôle du cycle cellulaire, fuseau mitotique), de la morphogenèse (neurogenèse, signalisation Wnt, adhésion cellulaire) et la régulation de la transcription et de la traduction (**Tableau 7**). L'analyse de la m<sup>6</sup>A sur ces transcrits met en évidence que l'environnement maternel induit des signatures épitranscriptomiques ovocytaires spécifiques au niveau des gènes impliqués dans des fonctions cruciales lors du développement.

**Tableau 7 : Comparaison de la variation du niveau de m<sup>6</sup>A des 19 transcrits différenciellement méthylés suite aux conditionnements maternels en présence d'*A. minutum* ou des MP.**

Gènes	Fonction putative	MP	HAB
High mobility group box 1	Réponse inflammatoire		
Protein CWC15 homolog A	<i>Spliceosome</i>		
Uncharacterized LOC105317977	-		
Neurexin-4	Fonction neuronale		
Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3	Morphogenèse, prolifération		
Centrosomal protein of 78 kDa	Centrosome		
ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	Synthèse ATP		
Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-1	Signalisation Wnt, télomères		
Importin subunit alpha-5	Import nucléaire		
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	Homéostasie cellulaire		
Kinesin-like protein KIF11-A	Fuseau mitotique		
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4	Établissement de la lignée germinale		
protocadherin gamma-A7	Adhésion cellulaire		
Histone RNA hairpin-binding protein	Régulation transcriptionnelle des histones		
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Centrosome, fuseau mitotique		
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	Signalisation Ras, régulation du cycle cellulaire		
G2/mitotic-specific cyclin-A	Régulation du cycle cellulaire		
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Régulation de la traduction		
Filamin-C	Contractilité du cytosquelette		

## 4. Discussion

Ce travail présente la caractérisation de la méthylation des ARN ovocytaires chez *C. gigas* suite à une exposition maternelle à un dinoflagellé toxique ou aux MP. Les résultats montrent que ces deux contaminants engendrent une variation du niveau et de la localisation de la méthylation de transcrits potentiellement impliqués dans la régulation du développement embryonnaire. De plus, les modifications épitranscriptomiques observées présentent des signatures spécifiques en fonction du stress environnemental examiné. Cette étude, est la première étude démontrant un effet maternel impliquant la m<sup>6</sup>A chez un Lophotrochozoaire, à notre connaissance.

Une exposition parentale à *A. minutum* induit une diminution de la taille des larves et une augmentation de la mortalité lors de la fixation. Elle affecte aussi la qualité des spermatozoïdes *via* une réduction de la motilité et une augmentation du contenu en lipides, alors que la qualité des ovocytes (diamètre et circularité) n'est pas affectée (Castrec *et al.*, 2019). Cependant, le vecteur de l'effet parental reste inconnu.

Notre étude a mis en évidence une variation significative du niveau de m<sup>6</sup>A à la hausse ou à la baisse sur 178 transcrits ovocytaires associés à la division cellulaire suite à une exposition maternelle à *A. minutum*. Cette différence de méthylation ne semble pas être corrélée avec un changement de contenu ovocytaire cohérent avec une absence de différence dans la qualité des ovocytes (Castrec *et al.*, 2019). Cependant, cette différence de niveau de m<sup>6</sup>A peut avoir un impact sur le développement des larves issues de ces ovocytes. En effet, la m<sup>6</sup>A est impliquée dans de nombreux processus développementaux dont la MZT et la division cellulaire (Zhao *et al.*, 2017, Ivanova *et al.*, 2017, Fei *et al.*, 2020, Kontur *et al.*, 2020). La MZT comprend la dégradation des transcrits maternels et la régulation de la compaction de la chromatine permettant l'activation du génome zygotique (Vastenhouw *et al.*, 2019). La m<sup>6</sup>A est un mécanisme de dégradation des ARNm maternels, dont la dégradation YTHDF-dépendante chez les Vertébrés déclenche la MZT (Zhao *et al.*, 2017, Ivanova *et al.*, 2017, Kontur *et al.*, 2020). Nous avons montré dans le chapitre I et II la conservation d'un mécanisme similaire. Or, une perturbation de ce mécanisme de dégradation entraîne une réduction de la taille des individus chez le poisson zèbre (Zhao *et al.*, 2017), un phénotype également observé chez les larves de l'huître creuse suite à une exposition maternelle à *A. minutum*. (Castrec *et al.*, 2019). Ces phénotypes semblables entre l'huître et le poisson zèbre pourraient correspondre à des



### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

mécanismes moléculaires similaires qui seraient conservés, tels que la dégradation des m<sup>6</sup>A-ARN *via* la famille des YTHDF.

L'analyse des termes de GO complète l'hypothèse d'une altération de la MZT responsable de l'effet délétère de l'exposition à *A. minutum* sur les phénotypes développementaux. Elle montre une augmentation de la m<sup>6</sup>A sur les transcrits impliqués dans la modification des histones et une diminution sur les transcrits impliqués dans la régulation des ARN non-codants (**Tableau S1**). En effet, la maturation des miARN et la modification de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me3) sont contrôlées par la m<sup>6</sup>A (Alarcón *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2021). Ces mécanismes impliqués dans la dégradation des ARN maternels (Vastenhouw *et al.*, 2019) et la formation de l'hétérochromatine (Xu *et al.*, 2021), respectivement, sont potentiellement conservés chez l'huître (Fellous *et al.*, 2014b, Rosani *et al.*, 2016). L'altération du niveau de m<sup>6</sup>A de ces transcrits perturbe potentiellement la dégradation des m<sup>6</sup>A-ARNm maternels et l'activation du génome zygotique, suite à une exposition maternelle à *A. minutum*, pouvant mener à une diminution de la taille et de la survie larvaire, reflétant un effet maternel égoïste.

En parallèle de l'altération de la MZT, l'analyse de l'ontologie des gènes met aussi en avant une implication de la m<sup>6</sup>A dans la régulation de la division cellulaire. Fei et collaborateurs (2020) ont récemment décrit une boucle de régulation du cycle cellulaire où la m<sup>6</sup>A et YTHDF2 régulent l'entrée en mitose. La perturbation de ce mécanisme, *via* une modification du niveau de méthylation de transcrits codant des acteurs de cette boucle, engendre potentiellement une altération de la segmentation pouvant réduire la survie des larves de *C. gigas* issus de parents exposés à *A. minutum*.

Néanmoins, l'exposition maternelle à *A. minutum* permet aussi la mise en place d'un effet adaptatif dans la descendance, appelé effet maternel d'anticipation, qui est alors moins sensible à la microalgue (Castrec *et al.*, 2019). Ce trait adaptatif est potentiellement lié à une augmentation de la m<sup>6</sup>A sur les transcrits impliqués dans la réponse au stress. En effet, IGF2BP est un médiateur majeur de l'effet de la m<sup>6</sup>A en région 3' du transcrit, localisation prévalente de cette marque chez l'huître. IGF2BP permet le stockage des m<sup>6</sup>A-ARN dans des granules lors d'un stress chez les Vertébrés, ce qui les protègent de la dégradation pour être traduit à postériori (Huang *et al.*, 2018). Lors du développement du poisson zèbre, IGF2BP protège des m<sup>6</sup>A-ARN maternels de la dégradation (Ren *et al.*, 2020). Cet acteur étant exprimé dans les ovocytes et identifié au niveau protéique chez l'huître (Le Franc *et al.*, 2020), il est

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

donc possible qu'un mécanisme similaire permette la mise en place d'une réponse rapide chez les larves d'huître. Ceci faciliterait la résistance au stress causé par *A. minutum* et ferait de la m<sup>6</sup>A un vecteur d'un effet maternel d'anticipation couplé à un effet égoïste *via* son effet précoce lors de la segmentation et de la MZT.

Cependant, nous ne pouvons exclure la participation d'un éventuel effet paternel à ce phénotype. En effet, le phénotype des larves observés dans l'étude de Castrec et collaborateurs (2019) est obtenu *via* les gamètes des géniteurs mâles et femelles exposés à *A. minutum*, où la qualité des spermatozoïdes est réduite. Néanmoins, la quantité d'ARN apportée par les spermatozoïdes est faible et un tel effet n'impliquerait probablement pas les épitranscriptomes m<sup>6</sup>A. Par ailleurs, la présence des acteurs de la machinerie et en premier lieu des *readers* à un niveau protéique dans les ovocytes n'a pas été abordé dans cette étude. La quantification des *readers* permettrait de mieux appréhender le devenir des m<sup>6</sup>A-ARN maternels et donc les mécanismes perturbés par l'exposition maternelle à ce dinoflagellé toxique. De la même manière, la présence de PST dans les ovocytes, suite au conditionnement avec *A. minutum*, ne permet pas d'écarter un impact direct des PST sur la machinerie de la m<sup>6</sup>A pouvant être à l'origine de l'altération de la méthylation des transcrits maternels.

De même que l'exposition à *A. minutum*., l'exposition maternelle aux MP engendre une modification du niveau de m<sup>6</sup>A des transcrits. Cependant, cette exposition est associée à une augmentation de la m<sup>6</sup>A en 5' de la CDS et une diminution de l'expression de ces transcrits potentiellement impliqués dans la régulation de la gastrulation et de la morphogenèse chez l'huître. Cette perturbation des épitranscriptomes est associée à une réduction de la taille, de la survie et un retard développemental des larves issues d'ovocytes de géniteurs exposés aux MP lors de la gamétogenèse. La qualité de ces ovocytes est affectée avec une réduction de leur nombre et de leur taille associée à une perturbation de leur transcriptome (Sussarellu *et al.*, 2016). Les observations de Sussarellu et collaborateurs (2016) mènent à l'hypothèse d'une perturbation des ARNm maternels conduisant au phénotype décrit et dont le mécanisme de régulation de ces ARNm ovocytaires perturbé reste inconnu.

La méthylation des ARN maternels participe à la régulation de l'ovogenèse chez de nombreuses espèces (Qi *et al.*, 2016, Kan *et al.*, 2017, Fan *et al.*, 2019, Sui *et al.*, 2020, Kontur *et al.*, 2020). Chez la souris, YTHDF2 détermine la qualité des ovocytes. En effet, sa fonction dans la dégradation des m<sup>6</sup>A-ARN lui permet de façonner le

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

transcriptome des ovocytes pendant la vitellogenèse (Ivanova *et al.*, 2017). Suite à une exposition aux MP, l'augmentation du niveau de m<sup>6</sup>A de certains transcrits est potentiellement corrélée à la diminution de leur expression, qui pourrait refléter une perturbation de leur accumulation depuis la gonade maternelle. Ceci est cohérent avec la diminution de la qualité des ovocytes après exposition parentale aux MP chez l'huître (Sussarellu *et al.*, 2016), renforçant l'hypothèse de l'implication de YTHDF dans la perturbation de l'ovogenèse de *C. gigas*.

À cela s'ajoute une relocalisation de la m<sup>6</sup>A proche en 5' de la CDS au détriment du codon stop. Bien que la localisation de la méthylation au niveau du codon *start* stimule la traduction chez les plantes (Luo *et al.*, 2019), la méthylation autour du codon stop est associée à la liaison d'IGF2BP (Huang *et al.*, 2018). La diminution de la méthylation en 3' affecte donc potentiellement la stabilité des transcrits méthylés et pourrait accentuer l'effet délétère des MP sur l'ovogenèse.

Plus tard lors du développement, Sussarellu et collaborateurs (2016) décrivent une diminution de la survie, de la taille et un retard développemental des larves qui reflète un effet maternel égoïste suite à une exposition aux MP. En addition aux profils de m<sup>6</sup>A, nos résultats en GO évoquent une perturbation de la gastrulation et de la morphogenèse induite par les MP, *via* la régulation de l'expression des gènes, de la division cellulaire et de la transition épithélio-mésenchymateuse (**Tableau S2**). La perturbation de ces fonctions *via* la m<sup>6</sup>A est cohérente avec les fonctions régulées par cette méthylation au cours du développement de l'huître creuse mises en évidence dans le chapitre précédent.

Les conditionnements avec *A. minutm* et les MP engendrent une modification de la méthylation des ARN maternels dans les ovocytes associée à une perturbation du phénotype des larves. L'effet parental de ces deux stress chez *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2016, Castrec *et al.*, 2019), est aussi observé chez d'autres espèces (Lee *et al.*, 2013, Rolton *et al.*, 2016, Martins et Guilhermino, 2018, Zhang *et al.*, 2019b). Cependant, notre étude met en avant pour la première fois un effet maternel médié potentiellement par la m<sup>6</sup>A chez un organisme marin. Bien que le mécanisme de transmission de l'effet maternel soit commun à ces deux stress, la régulation de la méthylation des ARN ovocytaires apparaît comme différente. En effet, seule une faible proportion des transcrits différenciellement méthylés est commune à ces deux stress (12,0% et 4,2% pour les conditionnements HAB et MP, respectivement) dont la

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

localisation de la m<sup>6</sup>A et la variation de la méthylation diffèrent selon les stress. À cela s'ajoute une perturbation potentielle de différents processus développementaux. Ainsi, *A. minutum* induit un dérèglement des étapes précoces de l'embryogenèse, alors que les MP affectent la gastrulation et la morphogenèse des larves. Cette différence de m<sup>6</sup>A dans les ovocytes peut expliquer la différence de phénotype observé entre les deux stress, où la qualité des ovocytes n'est pas affectée lors du conditionnement HAB, alors qu'un retard développemental chez les larves est observé suite à l'exposition aux MP (Sussarellu *et al.*, 2016, Castrec *et al.*, 2019).

Bien que la méthylation varie différemment entre les deux conditionnements, les transcrits communs montrent une perturbation des mêmes mécanismes. Ces mécanismes pourraient constituer un socle général de médiation épitranscriptomique d'un stress parental. En effet, ils sont notamment impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de la voie de signalisation Wnt, une perturbation de ces mécanismes confirmé par l'analyse transcriptomique et protéique des ovocytes issus de géniteurs exposés aux MP (Sussarellu *et al.*, 2016). Une modification de la méthylation de ces transcrits peut donc engendrer des perturbations dans la division et la prolifération cellulaire (Liu *et al.*, 2020d, Fei *et al.*, 2020) pouvant expliquer la réduction de la survie et de la taille des larves suite à l'exposition maternelle aux MP et à la microalgue toxique (Sussarellu *et al.*, 2016, Castrec *et al.*, 2019).

Le gène « *high mobility group box 1* » (*hmgb1*) est décrit pour être impliqué dans la réponse inflammatoire et immunitaire chez *C. gigas* (Li *et al.*, 2013), une réponse observée chez les Bivalves face aux MP et *A. minutum* (Hégaret *et al.*, 2011, Von Moos *et al.*, 2012, Mello *et al.*, 2013, Paul-Pont *et al.*, 2016, Castrec *et al.*, 2018, Teng *et al.*, 2020). L'exposition parentale à ces deux stress modifie différemment la méthylation de ce gène. Lors du conditionnement HAB, la méthylation globale du transcrit diminue alors que sa localisation autour du codon stop augmente. Comme décrit précédemment, l'augmentation de la méthylation au niveau du codon stop favorise potentiellement la liaison d'IGF2BP, protégeant les transcrits de la dégradation. Ils pourront alors être traduits à posteriori et permettre aux larves de résister au stress induit par *A. minutum*. Dans le cas d'une exposition aux MP, la méthylation globale de ce transcrit augmente conduisant à une méthylation uniforme de la CDS et associée à une diminution de son expression dans l'ovocyte. La perte du pic autour du codon stop peut être liée à une diminution de la stabilité de ce transcrit ne permettant pas d'effet adaptatif face aux MP. Une absence d'effet adaptatif *via* un

### Chapitre III : La m<sup>6</sup>A : un vecteur de transmission de traits de vie environnementaux par effet maternel ?

effet parental observé lors d'un conditionnement embryonnaire avec des nanoplastiques (Tallec *et al.*, 2021).

À cela s'ajoute une régulation de la méthylation différente sur les transcrits du gène *DDX4* (*Probable ATP-dependent RNA helicase*) ou *VASA*. La mise en place de la lignée germinale chez *C. gigas* repose notamment sur les transcrits maternels de cet acteur (Fabioux *et al.*, 2004a). La perturbation de sa méthylation suite à l'exposition maternelle à *A. minutum* ou aux MP affecte potentiellement le devenir de ce transcrit dans l'embryon et impacterait la reproduction de la descendance. Cet impact sur la reproduction de la descendance, *via* un effet parental, est observé chez les daphnies suite à une exposition aux MP (Martins et Guilhermino, 2018).

En conclusion, cette étude permet de montrer un effet maternel, suite à un conditionnement en présence d'une microalgue toxique ou de MP, médié par la m<sup>6</sup>A des ARN maternels mise en place lors de la gamétogenèse. La variation de cette méthylation dans les ovocytes constitue un vecteur de l'effet parental reflétant une héritabilité épitranscriptomique intergénérationnelle. Ce vecteur impacte le développement embryonnaire et potentiellement l'adaptation des juvéniles à l'environnement rencontré par ses parents. Cependant, cette méthylation répond de manière spécifique au stress avec la mise en place d'un effet adaptatif et la dégradation des ARN maternels observés suite à l'exposition maternelle à *A. minutum* ou aux MP, respectivement. La détection et la quantification de *readers* à un niveau protéique et le suivi de la méthylation dans les premiers stades de développement permettraient de mieux appréhender le devenir des m<sup>6</sup>A-ARN maternels dans l'embryon et les mécanismes moléculaires impactés par ces effets maternels. Ce travail met en évidence, pour la première fois à notre connaissance, un effet maternel médié par la m<sup>6</sup>A *via* les ARN maternels. Il apporte de nouvelles connaissances quant à la régulation de la m<sup>6</sup>A chez un Lophotrochozoaire et permet une meilleure compréhension de l'évolution de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnel dans un contexte eco-devo.

## 5. Tableaux complémentaires

**Tableau S1** : Liste complète des annotations fonctionnelles (FDR < 0,05) des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle à *A. minutum*.

**Tableau S2** : Liste complète des annotations fonctionnelles (FDR < 0,05) des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle aux MP.

**Tableau S1** : Liste complète des annotations fonctionnelles (FDR < 0,05) des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle à *A. minutum*.

Cluster	GOID	GO Term	Ontology Source	PValue Corrected	% Associated Genes	Nr. Genes
Cluster #DOWN	GO:0003918	DNA topoisomerase type II (double strand cut, ATP-hydrolyzing) activity	MF	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:2001032	regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0004809	tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase activity	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0016316	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase activity	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0032183	SUMO binding	MF	0,00	50,00	2,00
Cluster #DOWN	GO:0030576	Cajal body organization	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0070140	SUMO-specific isopeptidase activity	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0042176	regulation of protein catabolic process	BP	0,00	12,77	6,00
Cluster #DOWN	GO:0006997	nucleus organization	BP	0,00	19,05	4,00
Cluster #DOWN	GO:0042254	ribosome biogenesis	BP	0,00	6,19	6,00
Cluster #DOWN	GO:0005762	mitochondrial large ribosomal subunit	CC	0,01	28,57	2,00
Cluster #DOWN	GO:0034470	ncRNA processing	BP	0,04	4,00	4,00
Cluster #DOWN	GO:0031110	regulation of microtubule polymerization or depolymerization	BP	0,04	9,09	2,00
Cluster #DOWN	GO:0035371	microtubule plus-end	CC	0,01	20,00	2,00
Cluster #DOWN	GO:0008090	retrograde axonal transport	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0048525	negative regulation of viral process	BP	0,01	28,57	2,00
Cluster #DOWN	GO:0043923	positive regulation by host of viral transcription	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0043921	modulation by host of viral transcription	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0052472	modulation by host of symbiont transcription	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #DOWN	GO:0003779	actin binding	MF	0,00	10,61	7,00
Cluster #DOWN	GO:0048365	Rac GTPase binding	MF	0,00	38,46	5,00
Cluster #DOWN	GO:0003779	actin binding	MF	0,00	10,61	7,00
Cluster #DOWN	GO:0034988	Fc-gamma receptor I complex binding	MF	0,00	75,00	3,00
Cluster #DOWN	GO:0050821	protein stabilization	BP	0,01	10,00	3,00
Cluster #DOWN	GO:0051015	actin filament binding	MF	0,01	13,64	3,00
Cluster #DOWN	GO:0032388	positive regulation of intracellular transport	BP	0,01	4,88	6,00
Cluster #DOWN	GO:0051220	cytoplasmic sequestering of protein	BP	0,00	50,00	3,00
Cluster #DOWN	GO:0042176	regulation of protein catabolic process	BP	0,00	12,77	6,00
Cluster #DOWN	GO:0043113	receptor clustering	BP	0,01	13,64	3,00
Cluster #DOWN	GO:0045022	early endosome to late endosome transport	BP	0,00	15,79	3,00
Cluster #DOWN	GO:0042177	negative regulation of protein catabolic process	BP	0,00	28,57	4,00



Cluster #DOWN	GO:0051224	negative regulation of protein transport	BP	0,02	7,32	3,00
Cluster #DOWN	GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	BP	0,04	5,08	3,00
Cluster #DOWN	GO:0007195	adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway	BP	0,00	60,00	3,00
Cluster #DOWN	GO:0090307	mitotic spindle assembly	BP	0,00	42,86	3,00
Cluster #DOWN	GO:0042307	positive regulation of protein import into nucleus	BP	0,03	6,38	3,00
Cluster #DOWN	GO:0048365	Rac GTPase binding	MF	0,00	38,46	5,00
Cluster #UP	GO:0045347	negative regulation of MHC class II biosynthetic process	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0051879	Hsp90 protein binding	MF	0,00	50,00	2,00
Cluster #UP	GO:0000354	cis assembly of pre-catalytic spliceosome	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0035441	cell migration involved in vasculogenesis	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0035499	carnosine biosynthetic process	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0034773	histone H4-K20 trimethylation	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0036124	histone H3-K9 trimethylation	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0005819	spindle	CC	0,00	5,22	7,00
Cluster #UP	GO:0032436	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	BP	0,01	22,22	2,00
Cluster #UP	GO:0001726	ruffle	CC	0,04	5,36	3,00
Cluster #UP	GO:0032271	regulation of protein polymerization	BP	0,04	5,66	3,00
Cluster #UP	GO:0044354	macropinosome	CC	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0022614	membrane to membrane docking	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0071561	nucleus-vacuole junction	CC	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0009267	cellular response to starvation	BP	0,03	11,76	2,00
Cluster #UP	GO:0071562	nucleus-vacuole junction assembly	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0000011	vacuole inheritance	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0000329	fungus-type vacuole membrane	CC	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0042144	vacuole fusion, non-autophagic	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0071255	Cvt vesicle assembly	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0004694	eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinase activity	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0070578	RISC-loading complex	CC	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0007279	pole cell formation	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0035190	syncytial nuclear migration	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0035087	siRNA loading onto RISC involved in RNA interference	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0070868	heterochromatin organization involved in chromatin silencing	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0043392	negative regulation of DNA binding	BP	0,03	11,76	2,00
Cluster #UP	GO:0000922	spindle pole	CC	0,00	6,67	5,00
Cluster #UP	GO:0005819	spindle	CC	0,00	5,22	7,00
Cluster #UP	GO:0000784	nuclear chromosome, telomeric region	CC	0,02	18,18	2,00
Cluster #UP	GO:0070198	protein localization to chromosome, telomeric region	BP	0,00	40,00	2,00
Cluster #UP	GO:0070212	protein poly-ADP-ribosylation	BP	0,00	40,00	2,00
Cluster #UP	GO:0070213	protein auto-ADP-ribosylation	BP	0,00	40,00	2,00

Cluster #UP	GO:0007004	telomere maintenance via telomerase	BP	0,01	20,00	2,00
Cluster #UP	GO:0018107	peptidyl-threonine phosphorylation	BP	0,03	12,50	2,00
Cluster #UP	GO:0032212	positive regulation of telomere maintenance via telomerase	BP	0,00	40,00	2,00
Cluster #UP	GO:0032436	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	BP	0,01	22,22	2,00
Cluster #UP	GO:0051016	barbed-end actin filament capping	BP	0,00	66,67	2,00
Cluster #UP	GO:0001726	ruffle	CC	0,04	5,36	3,00
Cluster #UP	GO:0032420	stereocilium	CC	0,02	13,33	2,00
Cluster #UP	GO:0005902	microvillus	CC	0,04	9,09	2,00
Cluster #UP	GO:0016344	meiotic chromosome movement towards spindle pole	BP	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0034703	cation channel complex	CC	0,02	5,00	4,00
Cluster #UP	GO:0040038	polar body extrusion after meiotic divisions	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0032271	regulation of protein polymerization	BP	0,04	5,66	3,00
Cluster #UP	GO:0051017	actin filament bundle assembly	BP	0,02	7,89	3,00
Cluster #UP	GO:0017146	NMDA selective glutamate receptor complex	CC	0,00	100,00	2,00
Cluster #UP	GO:0044354	macropinosome	CC	0,02	100,00	1,00
Cluster #UP	GO:0030042	actin filament depolymerization	BP	0,00	15,00	3,00
Cluster #UP	GO:0070649	formin-nucleated actin cable assembly	BP	0,04	50,00	1,00
Cluster #UP	GO:0051016	barbed-end actin filament capping	BP	0,00	66,67	2,00
Cluster #UP	GO:0001726	ruffle	CC	0,04	5,36	3,00
Cluster #UP	GO:0032420	stereocilium	CC	0,02	13,33	2,00
Cluster #UP	GO:0005902	microvillus	CC	0,04	9,09	2,00
Cluster #UP	GO:0032271	regulation of protein polymerization	BP	0,04	5,66	3,00
Cluster #UP	GO:0051017	actin filament bundle assembly	BP	0,02	7,89	3,00
Cluster #UP	GO:0017146	NMDA selective glutamate receptor complex	CC	0,00	100,00	2,00
Cluster #UP	GO:0030042	actin filament depolymerization	BP	0,00	15,00	3,00
Cluster #UP	GO:0032436	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	BP	0,01	22,22	2,00

**Tableau S2** : Liste complète des annotations fonctionnelles (FDR < 0,05) des ARN ovocytaires différentiellement méthylés après exposition maternelle aux MP.

GOID	GOTerm	Ontology Source	PValue Corrected	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0000159	protein phosphatase type 2A complex	CC	0,00	37,50	3,00
GO:0016607	nuclear speck	CC	0,01	7,21	15,00
GO:0019843	rRNA binding	MF	0,00	11,49	10,00
GO:0010467	gene expression	BP	0,00	4,23	292,00
GO:0005634	nucleus	CC	0,00	4,13	294,00
GO:0022626	cytosolic ribosome	CC	0,01	10,11	9,00
GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	CC	0,00	12,96	7,00
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	BP	0,00	4,78	78,00
GO:0005840	ribosome	CC	0,00	8,57	55,00
GO:0043604	amide biosynthetic process	BP	0,00	5,71	75,00
GO:0006412	translation	BP	0,00	8,44	62,00
GO:0007369	gastrulation	BP	0,00	10,71	12,00
GO:0070491	repressing transcription factor binding	MF	0,01	11,86	7,00
GO:0016055	Wnt signaling pathway	BP	0,01	6,85	17,00
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,01	5,19	38,00
GO:0031967	organelle envelope	CC	0,00	8,02	19,00
GO:0046930	pore complex	CC	0,00	20,59	7,00
GO:0005635	nuclear envelope	CC	0,00	11,76	12,00
GO:0005643	nuclear pore	CC	0,00	17,14	6,00
GO:0031965	nuclear membrane	CC	0,00	13,43	9,00
GO:0070013	intracellular organelle lumen	CC	0,00	5,05	102,00
GO:0005654	nucleoplasm	CC	0,00	6,02	65,00
GO:0031981	nuclear lumen	CC	0,00	6,00	95,00
GO:0051276	chromosome organization	BP	0,00	5,83	48,00
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,01	5,19	38,00
GO:0016043	cellular component organization	BP	0,00	4,25	162,00
GO:0044085	cellular component biogenesis	BP	0,00	5,77	83,00
GO:0006996	organelle organization	BP	0,00	4,92	122,00
GO:0022607	cellular component assembly	BP	0,00	5,59	76,00
GO:0007010	cytoskeleton organization	BP	0,00	6,11	68,00
GO:0051276	chromosome organization	BP	0,00	5,83	48,00
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	BP	0,00	4,44	77,00
GO:0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	BP	0,01	5,25	36,00
GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	BP	0,00	4,71	75,00
GO:0022604	regulation of cell morphogenesis	BP	0,00	5,88	33,00
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	BP	0,01	4,46	67,00
GO:0003924	GTPase activity	MF	0,00	7,34	48,00
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	BP	0,00	9,77	17,00
GO:0006414	translational elongation	BP	0,00	13,10	11,00
GO:0006417	regulation of translation	BP	0,00	12,17	14,00
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	BP	0,01	10,96	8,00
GO:0008135	translation factor activity, RNA binding	BP	0,00	21,82	12,00
GO:0003746	translation elongation factor activity	BP	0,00	29,63	8,00
GO:1901069	guanosine-containing compound catabolic process	BP	0,01	16,67	5,00
GO:0051098	regulation of binding	BP	0,01	11,86	7,00
GO:0001702	gastrulation with mouth forming second	BP	0,01	20,00	4,00
GO:0005813	centrosome	CC	0,00	9,09	12,00
GO:0034502	protein localization to chromosome	BP	0,00	30,77	4,00
GO:0010718	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	BP	0,00	40,00	4,00
GO:0000794	condensed nuclear chromosome	CC	0,01	22,22	4,00

GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,00	30,77	4,00
GO:0018107	peptidyl-threonine phosphorylation	BP	0,00	31,25	5,00
GO:0005654	nucleoplasm	CC	0,00	6,02	65,00
GO:0031981	nuclear lumen	CC	0,00	6,00	95,00
GO:0045934	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	BP	0,00	5,01	47,00
GO:0016055	Wnt signaling pathway	BP	0,01	6,85	17,00
GO:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	BP	0,00	5,17	48,00
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	BP	0,00	5,09	46,00
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	BP	0,01	4,70	54,00
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,01	5,19	38,00
GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,00	5,99	26,00
GO:0007389	pattern specification process	BP	0,00	8,04	16,00
GO:0003002	regionalization	BP	0,00	8,81	14,00
GO:0007369	gastrulation	BP	0,00	10,71	12,00
GO:0060562	epithelial tube morphogenesis	BP	0,00	9,42	13,00
GO:0016055	Wnt signaling pathway	BP	0,01	6,85	17,00
GO:0042177	negative regulation of protein catabolic process	BP	0,00	35,71	5,00
GO:0001702	gastrulation with mouth forming second	BP	0,01	20,00	4,00
GO:0010718	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	BP	0,00	40,00	4,00
GO:0090100	positive regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	BP	0,01	16,67	5,00
GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,00	30,77	4,00
GO:0018107	peptidyl-threonine phosphorylation	BP	0,00	31,25	5,00
GO:0044085	cellular component biogenesis	BP	0,00	5,77	83,00
GO:0022607	cellular component assembly	BP	0,00	5,59	76,00
GO:0043933	protein-containing complex subunit organization	BP	0,00	6,30	47,00
GO:0099512	supramolecular fiber	CC	0,00	9,43	38,00
GO:0065003	protein-containing complex assembly	BP	0,00	7,88	41,00
GO:0000793	condensed chromosome	CC	0,00	7,76	19,00
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	CC	0,00	12,53	49,00
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	BP	0,00	10,26	16,00
GO:0034622	cellular protein-containing complex assembly	BP	0,00	10,92	38,00
GO:0005874	microtubule	CC	0,00	15,34	27,00
GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
GO:0048519	negative regulation of biological process	BP	0,00	4,30	117,00
GO:0008134	transcription factor binding	MF	0,00	5,29	55,00
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	BP	0,00	4,44	77,00
GO:0048523	negative regulation of cellular process	BP	0,00	4,40	114,00
GO:0051649	establishment of localization in cell	BP	0,01	4,32	79,00
GO:0046907	intracellular transport	BP	0,01	4,68	54,00
GO:0031324	negative regulation of cellular metabolic process	BP	0,00	4,50	73,00
GO:0034613	cellular protein localization	BP	0,00	5,83	42,00
GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	BP	0,00	4,71	75,00
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	BP	0,01	4,46	67,00
GO:0045934	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	BP	0,00	5,01	47,00
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	BP	0,00	5,65	38,00
GO:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	BP	0,00	5,17	48,00
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	BP	0,00	5,09	46,00
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	BP	0,01	4,70	54,00

GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	BP	0,01	5,19	38,00
GO:0000244	spliceosomal tri-snRNP complex assembly	BP	0,00	100,00	6,00
GO:0003723	RNA binding	MF	0,00	9,21	64,00
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	BP	0,00	11,19	15,00
GO:0005681	spliceosomal complex	CC	0,00	18,67	31,00
GO:0030532	small nuclear ribonucleoprotein complex	CC	0,00	31,25	10,00
GO:0071013	catalytic step 2 spliceosome	CC	0,00	10,78	11,00
GO:0097525	spliceosomal snRNP complex	CC	0,00	36,36	8,00
GO:0035097	histone methyltransferase complex	CC	0,00	19,05	8,00
GO:0006396	RNA processing	BP	0,00	10,55	44,00
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	BP	0,00	14,81	8,00
GO:0016071	mRNA metabolic process	BP	0,00	11,91	38,00
GO:0008380	RNA splicing	BP	0,00	15,52	36,00
GO:0046540	U4/U6 x U5 tri-snRNP complex	CC	0,00	70,00	7,00
GO:0071339	MLL1 complex	CC	0,00	38,89	7,00
GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	BP	0,00	17,93	26,00
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	BP	0,00	17,36	25,00
GO:0045185	maintenance of protein location	BP	0,00	12,00	9,00
GO:0034988	Fc-gamma receptor I complex binding	MF	0,00	75,00	3,00
GO:0031523	Myb complex	CC	0,00	60,00	3,00
GO:0051220	cytoplasmic sequestering of protein	BP	0,00	50,00	3,00
GO:0042176	regulation of protein catabolic process	BP	0,00	19,15	9,00
GO:0034453	microtubule anchoring	BP	0,00	46,15	6,00
GO:0042177	negative regulation of protein catabolic process	BP	0,00	35,71	5,00
GO:0007052	mitotic spindle organization	BP	0,00	16,48	15,00
GO:0001702	gastrulation with mouth forming second	BP	0,01	20,00	4,00
GO:0005080	protein kinase C binding	MF	0,00	80,00	4,00
GO:0051764	actin crosslink formation	BP	0,01	33,33	3,00
GO:0007020	microtubule nucleation	BP	0,00	60,00	6,00
GO:0010718	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	BP	0,00	40,00	4,00
GO:0007195	adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway	BP	0,00	60,00	3,00
GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,00	30,77	4,00
GO:0090307	mitotic spindle assembly	BP	0,00	57,14	4,00
GO:0048365	Rac GTPase binding	MF	0,00	30,77	4,00
GO:0045185	maintenance of protein location	BP	0,00	12,00	9,00
GO:0043933	protein-containing complex subunit organization	BP	0,00	6,30	47,00
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	BP	0,00	12,32	26,00
GO:0005694	chromosome	CC	0,00	8,27	44,00
GO:0031023	microtubule organizing center organization	BP	0,00	17,91	12,00
GO:0000819	sister chromatid segregation	BP	0,00	15,58	12,00
GO:0005815	microtubule organizing center	CC	0,00	14,14	28,00
GO:0051276	chromosome organization	BP	0,00	5,83	48,00
GO:0000775	chromosome, centromeric region	CC	0,00	9,88	24,00
GO:0140014	mitotic nuclear division	BP	0,00	8,04	18,00
GO:0000776	kinetochore	CC	0,00	31,37	16,00
GO:0000793	condensed chromosome	CC	0,00	7,76	19,00
GO:0005819	spindle	CC	0,00	14,18	19,00
GO:0034453	microtubule anchoring	BP	0,00	46,15	6,00
GO:0000228	nuclear chromosome	CC	0,00	6,71	21,00
GO:0000280	nuclear division	BP	0,00	9,26	30,00
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	CC	0,00	32,35	11,00
GO:0005874	microtubule	CC	0,00	15,34	27,00
GO:0007020	microtubule nucleation	BP	0,00	60,00	6,00
GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
GO:0016043	cellular component organization	BP	0,00	4,25	162,00
GO:0043168	anion binding	MF	0,00	4,17	122,00
GO:0044085	cellular component biogenesis	BP	0,00	5,77	83,00
GO:0000166	nucleotide binding	MF	0,00	5,18	94,00

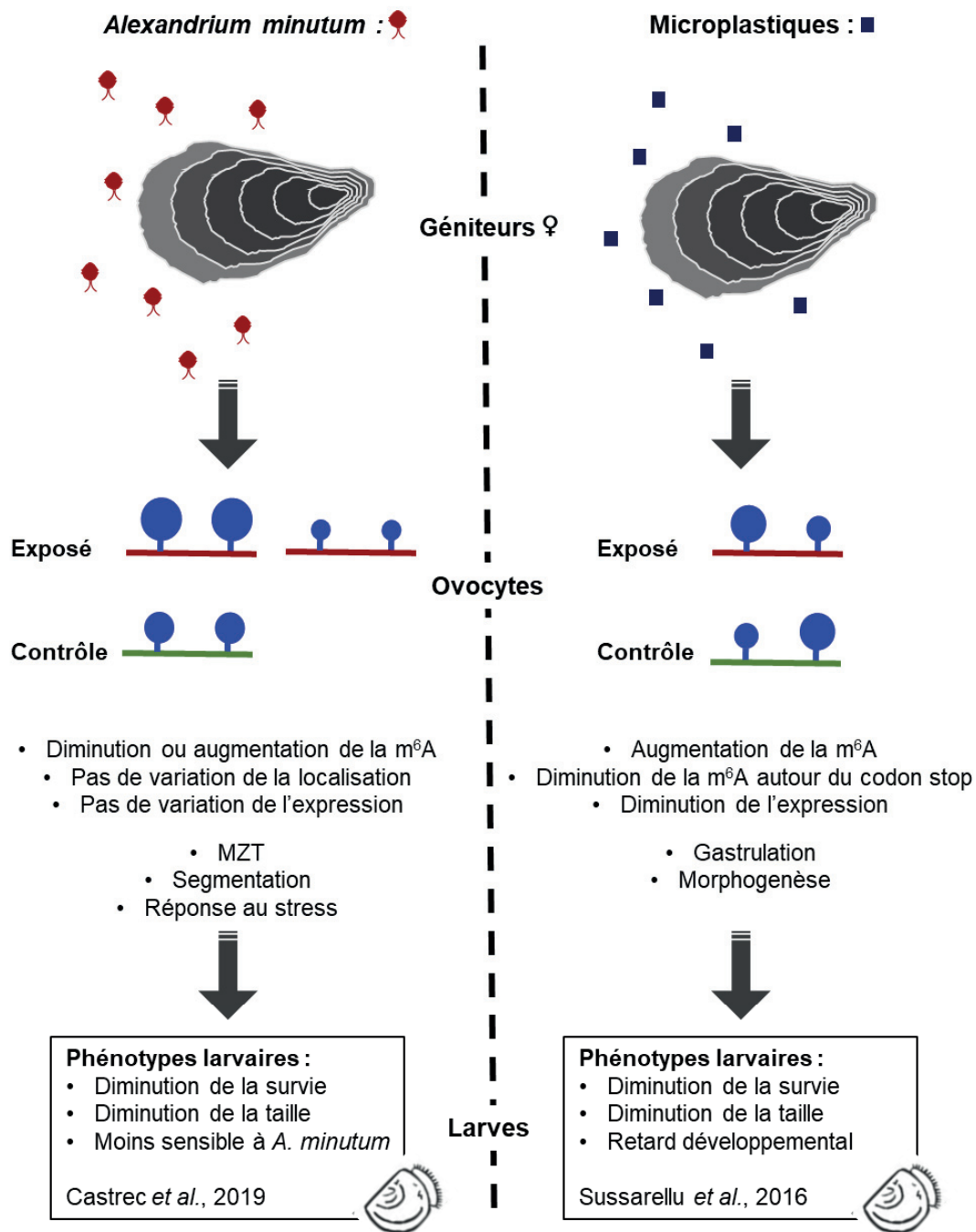


GO:0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	BP	0,01	5,25	36,00
GO:0006996	organelle organization	BP	0,00	4,92	122,00
GO:0022607	cellular component assembly	BP	0,00	5,59	76,00
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	MF	0,00	5,13	78,00
GO:0043933	protein-containing complex subunit organization	BP	0,00	6,30	47,00
GO:0099512	supramolecular fiber	CC	0,00	9,43	38,00
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	BP	0,00	12,32	26,00
GO:0022604	regulation of cell morphogenesis	BP	0,00	5,88	33,00
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	BP	0,01	4,46	67,00
GO:0007010	cytoskeleton organization	BP	0,00	6,11	68,00
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	MF	0,00	9,19	33,00
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	MF	0,00	5,19	80,00
GO:0065003	protein-containing complex assembly	BP	0,00	7,88	41,00
GO:0000280	nuclear division	BP	0,00	9,26	30,00
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	BP	0,00	10,26	16,00
GO:0017111	nucleoside-triphosphatase activity	MF	0,00	6,19	67,00
GO:0034622	cellular protein-containing complex assembly	BP	0,00	10,92	38,00
GO:0005525	GTP binding	MF	0,00	12,11	31,00
GO:0005874	microtubule	CC	0,00	15,34	27,00
GO:0003924	GTPase activity	MF	0,00	7,34	48,00
GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
GO:0007389	pattern specification process	BP	0,00	8,04	16,00
GO:0008340	determination of adult lifespan	BP	0,00	38,46	5,00
GO:0003002	regionalization	BP	0,00	8,81	14,00
GO:0008360	regulation of cell shape	BP	0,00	12,96	7,00
GO:0007369	gastrulation	BP	0,00	10,71	12,00
GO:0007444	imaginal disc development	BP	0,00	25,00	11,00
GO:0007527	adult somatic muscle development	BP	0,00	100,00	3,00
GO:0060562	epithelial tube morphogenesis	BP	0,00	9,42	13,00
GO:0070160	tight junction	CC	0,01	15,15	5,00
GO:0008362	chitin-based embryonic cuticle biosynthetic process	BP	0,00	50,00	3,00
GO:0030866	cortical actin cytoskeleton organization	BP	0,00	33,33	5,00
GO:0035006	melanization defense response	BP	0,00	60,00	3,00
GO:0001702	gastrulation with mouth forming second	BP	0,01	20,00	4,00
GO:0007391	dorsal closure	BP	0,00	37,50	6,00
GO:0007431	salivary gland development	BP	0,00	18,75	6,00
GO:0007560	imaginal disc morphogenesis	BP	0,00	24,24	8,00
GO:0035220	wing disc development	BP	0,00	25,71	9,00
GO:0007377	germ-band extension	BP	0,00	75,00	3,00
GO:0010718	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	BP	0,00	40,00	4,00
GO:0035099	hemocyte migration	BP	0,00	60,00	3,00
GO:0060446	branching involved in open tracheal system development	BP	0,01	33,33	3,00
GO:0090100	positive regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	BP	0,01	16,67	5,00
GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	BP	0,00	30,77	4,00
GO:0007476	imaginal disc-derived wing morphogenesis	BP	0,00	25,00	7,00
GO:0060857	establishment of glial blood-brain barrier	BP	0,00	80,00	4,00
GO:0019991	septate junction assembly	BP	0,00	50,00	4,00
GO:0035317	imaginal disc-derived wing hair organization	BP	0,00	38,46	5,00
GO:0035321	maintenance of imaginal disc-derived wing hair orientation	BP	0,00	100,00	3,00
GO:0022402	cell cycle process	BP	0,00	5,41	44,00
GO:0000278	mitotic cell cycle	BP	0,00	5,56	44,00
GO:0051098	regulation of binding	BP	0,01	11,86	7,00
GO:0051983	regulation of chromosome segregation	BP	0,00	24,14	7,00
GO:1903047	mitotic cell cycle process	BP	0,00	5,94	35,00
GO:0006996	organelle organization	BP	0,00	4,92	122,00
GO:0019730	antimicrobial humoral response	BP	0,00	16,22	6,00

GO:0043933	protein-containing complex subunit organization	BP	0,00	6,30	47,00
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	BP	0,00	6,59	23,00
GO:0099512	supramolecular fiber	CC	0,00	9,43	38,00
GO:0000075	cell cycle checkpoint	BP	0,00	9,23	12,00
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	BP	0,00	12,32	26,00
GO:0005694	chromosome	CC	0,00	8,27	44,00
GO:0010948	negative regulation of cell cycle process	BP	0,01	10,26	8,00
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	BP	0,00	7,19	24,00
GO:0007051	spindle organization	BP	0,00	16,04	17,00
GO:0031023	microtubule organizing center organization	BP	0,00	17,91	12,00
GO:0000819	sister chromatid segregation	BP	0,00	15,58	12,00
GO:0005815	microtubule organizing center	CC	0,00	14,14	28,00
GO:0007010	cytoskeleton organization	BP	0,00	6,11	68,00
GO:0007093	mitotic cell cycle checkpoint	BP	0,00	15,22	7,00
GO:0031981	nuclear lumen	CC	0,00	6,00	95,00
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	MF	0,00	9,19	33,00
GO:0051276	chromosome organization	BP	0,00	5,83	48,00
GO:0065003	protein-containing complex assembly	BP	0,00	7,88	41,00
GO:0000775	chromosome, centromeric region	CC	0,00	9,88	24,00
GO:0140014	mitotic nuclear division	BP	0,00	8,04	18,00
GO:0000776	kinetochore	CC	0,00	31,37	16,00
GO:0005819	spindle	CC	0,00	14,18	19,00
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	CC	0,00	12,53	49,00
GO:0033044	regulation of chromosome organization	BP	0,00	11,76	12,00
GO:0034453	microtubule anchoring	BP	0,00	46,15	6,00
GO:0007052	mitotic spindle organization	BP	0,00	16,48	15,00
GO:0000228	nuclear chromosome	CC	0,00	6,71	21,00
GO:0000280	nuclear division	BP	0,00	9,26	30,00
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	BP	0,00	10,26	16,00
GO:0005813	centrosome	CC	0,00	9,09	12,00
GO:0005881	cytoplasmic microtubule	CC	0,00	31,82	7,00
GO:0034622	cellular protein-containing complex assembly	BP	0,00	10,92	38,00
GO:0000235	astral microtubule	CC	0,00	55,56	5,00
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	CC	0,00	32,35	11,00
GO:0005525	GTP binding	MF	0,00	12,11	31,00
GO:0005874	microtubule	CC	0,00	15,34	27,00
GO:0005876	spindle microtubule	CC	0,00	32,00	8,00
GO:0007020	microtubule nucleation	BP	0,00	60,00	6,00
GO:0051306	mitotic sister chromatid separation	BP	0,00	22,22	6,00
GO:0003924	GTPase activity	MF	0,00	7,34	48,00
GO:0051258	protein polymerization	BP	0,00	18,02	20,00
GO:0090307	mitotic spindle assembly	BP	0,00	57,14	4,00
GO:0007091	metaphase/anaphase transition of mitotic cell cycle	BP	0,00	22,22	6,00
GO:0030071	regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	BP	0,00	22,22	6,00
GO:0007094	mitotic spindle assembly checkpoint	BP	0,00	22,73	5,00



## 6. Bilan du chapitre III



**Figure 40 : Schéma bilan du chapitre III**

L'étude des méthylomes ovocytaires en présence d'*A. minutum* ou de MP met en évidence une variation du niveau et de la localisation de la m<sup>6</sup>A des transcrits accumulés dans les ovocytes. L'exposition HAB engendre une variation du niveau de m<sup>6</sup>A sur des m<sup>6</sup>A-ARN impliqués dans la MZT, la segmentation et la réponse au stress cohérent avec le phénotype larvaire observé par Castrec *et al.*, 2019. L'exposition aux MP engendre une augmentation de la méthylation. La relocalisation de la m<sup>6</sup>A en 5' de ces transcrits, dont l'accumulation ovocytaire tend à diminuer, est impliquée dans la gastrulation et la morphogenèse, cohérent avec le phénotype larvaire observé par Sussarellu *et al.*, 2016. La m<sup>6</sup>A est donc un vecteur de transmission d'effet maternel potentiellement transgénérationnel.



# **Synthèse générale et perspectives**



## Synthèse générale et perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, une voie épitranscriptomique a été identifiée chez *C. gigas*. La caractérisation de la voie m<sup>6</sup>A ainsi que la machinerie associée présentent une régulation dynamique au cours du développement de l'huître. Ainsi, dans une perspective épitranscriptomique le développement embryo-larvaire peut être divisé en quatre parties : la segmentation (ovocyte à morula), la gastrulation (blastula à gastrula), la différenciation des tissus (trochophore et larve D) et la métamorphose (pédivéligère et naissain).

Lors de la segmentation de l'embryon, les m<sup>6</sup>A-ARN potentiellement impliqués dans la cytotérière sont méthylés au niveau du codon stop associé à l'expression de potentiel *readers*, comme YTHDF et Prrc2a, impliqués dans l'initiation de la traduction. En effet, YTHDF et Prrc2a favorisent la traduction et la stabilité des m<sup>6</sup>A-ARN, respectivement, lorsque les ARNm sont méthylés du côté 3' du transcrit chez les Vertébrés (Wang *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2018b, 2019b). Chez l'huître, ces m<sup>6</sup>A-ARNm maternels sont potentiellement stabilisés puis traduits pour soutenir les premières divisions cellulaires en amont de l'activation du génome zygotique. En parallèle, leur dégradation conduit à l'activation du génome zygotique, qui dépend d'YTHDF2 chez les Vertébrés (Zhao *et al.*, 2017, Ivanova *et al.*, 2017, Kontur *et al.*, 2020). Ce mécanisme est potentiellement conservé chez l'huître creuse et reposerait sur YTHDF conduisant à la consommation des m<sup>6</sup>A-ARN *via* leur traduction. Cependant, le rôle de cet acteur dans l'embryogenèse reste à confirmer. Une approche pourrait être réalisée notamment *via* l'injection de m<sup>6</sup>A-oligo ou A-oligo afin de séquestrer les *readers* majoritaires dans l'ovocyte. L'analyse des phénotypes induits permettrait de mieux appréhender le rôle de ces potentiels *readers* impliqués dans les premières étapes de l'embryogenèse et donc de la m<sup>6</sup>A chez l'huître.

Lors de la gastrulation, le blastopore se forme et les trois feuillets cellulaires des triploblastiques se mettent en place. C'est aussi à cette étape que l'expression des gènes *HOX* et *BMP* organisent les axes antéro-postérieur et dorso-ventral guidant la différenciation cellulaire chez l'huître creuse (Lelong *et al.*, 2000, Herpin *et al.*, 2005b, 2005a, 2007, Zhang *et al.*, 2012, Paps *et al.*, 2015, Tan *et al.*, 2017, 2018). Cette étape du développement, postérieure à la MZT, correspond à une forte méthylation autour du codon stop de m<sup>6</sup>A-ARN liée aux fonctions de transduction du signal et de la

## Synthèse générale et perspectives

différenciation cellulaire. De plus, l'expression des potentiels *readers*, tels qu'YTHDC1, YTHDC2, hnRNPA2B1 et IGF2BP, participent à la régulation de la traduction, de l'apport énergétique et de l'intégration des signaux de gastrulation. Cette situation rappelle par le rôle d'IGF2BP qui se lie en région 3' des m<sup>6</sup>A-ARN et favorise la traduction d'acteurs de la différenciation cellulaire chez les Vertébrés (Huang *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2020d). L'implication de hnRNPA2B1 dans la maturation des miARN (Alarcón *et al.*, 2015) contrôle la dégradation de transcrits codant des facteurs de pluripotence conduisant à la différenciation des cellules souches embryonnaires (Tay *et al.*, 2008). La m<sup>6</sup>A est un acteur crucial de la différenciation cellulaire *via* la voie de signalisation des SMAD. En effet, les SMAD2/3 recrutent le complexe de méthylation sur des transcrits spécifiques, tels que *nanog*, engendrant leur dégradation et la différenciation du mésoderme et du neuroectoderme chez les Mammifères (Batista *et al.*, 2014, Bertero *et al.*, 2018).

Cette différenciation initiée lors de la gastrulation se poursuit dans les stades trochophore et larve D. Ils sont caractérisés par des m<sup>6</sup>A-ARN impliqués de la différenciation cellulaire méthylés autour du codon stop et par l'expression d'acteurs liés à l'export nucléaire et à l'épissage comprenant YTHDC1 et YTHDC2. En effet, la liaison d'YTHDC1 en 3' des m<sup>6</sup>A-ARNm recrute des facteurs régulant le site de polyadénylation (Kasowitz *et al.*, 2018). La longueur de l'UTR 3' affecte la migration des cellules germinales primordiales chez le médaka (Sasado *et al.*, 2017) et donc potentiellement la localisation des cellules différenciées chez l'huître creuse. Bien qu'YTHDC2 engendre la traduction en se liant en 3' des m<sup>6</sup>A-ARNm, celle-ci est transitoire (Hsu *et al.*, 2017, Wojtas *et al.*, 2017, Mao *et al.*, 2019). De plus, sa fonction chez les Vertébrés a été décrite dans le cadre de la gamétogenèse où il permet la transition entre la mitose et la méiose (Wojtas *et al.*, 2017, Zeng *et al.*, 2020) et sa fonction dans le développement reste à explorer.

Enfin, l'épitranscriptome des stades de la métamorphose (larve pédivéligère et naissain) présente une méthylation en 3' des transcrits correspondant à la transduction de signaux morphogénétiques. En effet, la voie TGF- $\beta$  est impliquée dans la métamorphose de *C. gigas* (Lelong *et al.*, 2000, Herpin *et al.*, 2005b, 2007, Le Quéré *et al.*, 2009), et est régulée par la m<sup>6</sup>A chez les Vertébrés (Batista *et al.*, 2014, Bertero *et al.*, 2018). Cependant, le rôle de la m<sup>6</sup>A dans la régulation de la voie TGF- $\beta$  et plus largement dans la métamorphose reste à examiner *via* l'étude des *readers* exprimés à cette étape du développement.

## Synthèse générale et perspectives

La m<sup>6</sup>A est une voie épitranscriptomique conservée chez l'huître creuse régulant des mécanismes cruciaux du développement tels que la MZT, la différenciation cellulaire et la morphogenèse. Li et collaborateurs ont récemment mis en évidence le rôle de la myosine au cours du développement de l'huître grâce à la technologie du CRISPR/Cas9 (Li *et al.*, 2021). Une technique qui pourrait alors être utilisée afin de confirmer les activités de méthyltransférase et de déméthylase des acteurs identifiés.

De la même manière, elle permettrait d'élucider le rôle des *readers* dans la régulation du devenir des m<sup>6</sup>A-ARN et donc dans le développement. De manière générale, les études fonctionnelles de la machinerie identifiée permettraient de mieux appréhender le rôle et l'évolution de la m<sup>6</sup>A dans la régulation du développement chez l'huître creuse.

Chez les Vertébrés, la m<sup>6</sup>A est décrite sur différentes classes d'ARN telles que les ARNm, lncARN, miARN ou encore des éléments transposables (Meyer *et al.*, 2012, Alarcón *et al.*, 2015, Patil *et al.*, 2016, Ni *et al.*, 2019, He *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2020b). Bien que chez les Ecdysozoaires, une telle variété de transcrits méthylés n'ait pas été explorée à ce jour à notre connaissance, l'huître creuse présente une méthylation spécifique des ARNm, des lncARN et des éléments transposables. En effet, cette méthylation régule potentiellement la stabilité des ARNm et lncARN, un rôle conservé chez les Vertébrés (Wang *et al.*, 2014a, Liu *et al.*, 2020b). La localisation de la m<sup>6</sup>A a été particulièrement étudiée sur les ARNm des Bilatériens où celle-ci est majoritairement retrouvée en 3' des transcrits chez les Vertébrés (Dominissini *et al.*, 2012, Meyer *et al.*, 2012) alors que la situation chez les Ecdysozoaires semble plus complexe. Bien que *C. elegans* présente une méthylation quasi nulle des ARNm (Sendinc *et al.*, 2020), chez les Insectes étudiés cette localisation varie selon les espèces mais aussi les stades de développement. Chez la drosophile, la m<sup>6</sup>A est principalement enrichie au niveau de l'UTR 5' et l'UTR 3', dont seule la méthylation en 3' des transcrits semble varier au cours du développement (Kan *et al.*, 2017, 2020). Bien que chez le ver à soie, la m<sup>6</sup>A soit localisée au niveau de la CDS (Li *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2020c), chez l'abeille elle se situe autour du codon stop. Sa localisation varie au cours du développement larvaire de l'abeille, où la m<sup>6</sup>A est enrichie au niveau du codon start et de l'UTR 5' pour les stades larvaires précoces (Wang *et al.*, 2021).

De même que pour les Vertébrés et l'abeille, la m<sup>6</sup>A des ARNm de *C. gigas* est principalement localisée autour du codon stop. Ce profil de m<sup>6</sup>A varie au cours du



## Synthèse générale et perspectives

développement embryo-larvaire de l'huître pour les m<sup>6</sup>A-ARN jouant potentiellement un rôle dans la gastrulation, la différenciation cellulaire et la métamorphose. En effet, le profil des stades précoces est bimodal (proche du codon start et autour du codon stop) et évolue vers une méthylation unimodale autour du codon stop, une variation proche de celle observée chez les larves de l'abeille lors de la différenciation des castes (Wang *et al.*, 2021). La méthylation en 3' des ARNm apparaît alors comme un caractère partagé chez les Bilatériens qui aurait évolué chez certains Diptères et aurait été perdu chez les « modèles historiques » *D. melanogaster* et *C. elegans*. Cette hypothèse reste à confirmer par l'étude de la m<sup>6</sup>A dans une plus grande variété d'espèces et notamment de Protostomiens, par l'analyse de MeRIP-seq chez les modèles Annélides et Plathelminthes ou encore au sein des Mollusques chez les Céphalopodes dont des résultats préliminaires au laboratoire indiquent la présence de m<sup>6</sup>A-ARN chez la seiche *Sepia officinalis*.

La machinerie des Vertébrés comprend trois classes qui sont les *writers*, les *erasers* et les *readers* et seulement les *writers* et *readers* ont été décrits chez les Ecdysozoaires. Chez l'huître les trois classes d'acteurs sont globalement conservés, mais ils présentent tout de même des spécificités.

L'ensemble des *writers* décrits chez les Vertébrés est conservé chez *D. melanogaster* et potentiellement d'une manière générale chez les Ecdysozoaires, mais *C. elegans* ne présente qu'un nombre restreint de méthyltransférases (Kan *et al.*, 2017, Lence *et al.*, 2019, Van Tran *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019, Liberman *et al.*, 2020, Sendinc *et al.*, 2020, Gu *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2021). Bien que notre étude se soit concentrée sur la caractérisation de deux *writers*, celle-ci a permis de montrer la conservation du complexe de méthylation et METTL16, présents chez les Vertébrés et la drosophile (Lence *et al.*, 2017, Mendel *et al.*, 2018, Zaccara *et al.*, 2019, Leismann *et al.*, 2020). La caractérisation de l'ensemble des méthyltransférases permettrait d'élucider notamment l'évolution de METTL4. Son activité catalytique diverge entre une activité m<sup>6</sup>mA chez les Vertébrés et une activité m<sup>6</sup>A chez la drosophile (Kan *et al.*, 2017, Goh *et al.*, 2020). La caractérisation de l'ensemble des méthyltransférases chez un Lophotrochozoaire permettrait de comprendre si l'activité m<sup>6</sup>A est conservée généralement chez les Protostomiens. Cette divergence d'activité met en avant l'importance de la caractérisation de l'activité catalytique des *writers* qui devra être examinée chez *C. gigas* pour confirmer les actions de méthyltransférase m<sup>6</sup>A chez

## Synthèse générale et perspectives

notre modèle d'étude. La production de protéines recombinantes suivie d'un test enzymatique avec un oligonucléotide comportant le motif « DRACH » et de la SAM permettrait d'élucider l'activité catalytique de l'acteur. En effet, la production de différentes isoformes comprenant ou non des délétions au sein du domaine catalytique permettrait de valider la conservation de l'activité et de caractériser le domaine catalytique chez *C. gigas*. De plus, le développement d'un inhibiteur d'une méthyltransférase telle que METTL3 (Bedi *et al.*, 2020) permettrait d'élucider la conservation de l'activité catalytique et le rôle de METTL3 chez l'huître creuse. Dans le cas du complexe de méthylation une immunoprécipitation de METTL3 suivie d'une identification en spectrométrie de masse permettrait d'identifier les acteurs complexés avec METTL3 dont l'activité et la spécificité dépendent.

Les Vertébrés comprennent deux *erasers*, ALKBH5 et FTO. L'étude de la FTO montre une conservation chez les Vertébrés et une acquisition indépendante chez certaines microalgues (Balacco et Soller, 2018). Chez la drosophile les enzymes de la famille Fe(II)/2-oxoglutarate dioxygénases ne présentent pas d'activité enzymatique envers la m<sup>6</sup>A (Lence *et al.*, 2017), cohérent avec une présence d'orthologues d'ALKBH5 restreinte aux Deutérostomiens (Balacco et Soller, 2018). Cependant, nos résultats mettent en avant la conservation d'ALKBH5 chez l'huître creuse. Bien que son activité catalytique reste à confirmer, l'étude des *erasers* chez les Lophotrochozoaires doit être élargie afin de mieux cerner l'évolution de l'activité de déméthylase de la m<sup>6</sup>A. De plus, la dynamique de la m<sup>6</sup>A chez les Ecdysozoaires (Kan *et al.*, 2017, Knuckles et Bühler, 2018, Wang *et al.*, 2021) suggère la présence de voies enzymatiques de déméthylation et donc la présence d'une classe de m<sup>6</sup>A-déméthylases jusqu'alors inconnue. Il serait intéressant de rechercher de potentiels candidats chez l'huître qui seraient conservés chez les Ecdysozoaires. En effet, l'absence de détection de m<sup>6</sup>Am chez la drosophile suggère l'absence de m<sup>6</sup>Am chez les Protostomiens et ferait de l'huître creuse un modèle tout indiqué pour l'étude des *erasers*. Suite à une vérification de la présence de m<sup>6</sup>Am par spectrométrie de masse chez l'huître creuse, la transfection de potentiels *erasers* dans une culture de cellules d'huître permettrait de vérifier son activité spécifique envers la m<sup>6</sup>A via la détection d'une diminution de la m<sup>6</sup>A-ARN.

Les Vertébrés présentent un large panel de *readers* dont les fonctions peuvent apparaître redondantes (Alarcón *et al.*, 2015, Hsu *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2018b, Huang *et al.*, 2018, Kasowitz *et al.*, 2018, Zaccara et Jaffrey, 2020, Kontur *et al.*, 2020). Chez

## Synthèse générale et perspectives

les Ecdysozoaires, la famille des YTH est conservée chez les Insectes (Kan *et al.*, 2017, Jiang *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2021) alors qu'aucun *reader* ne semble conservé chez *C. elegans* (Sendinc *et al.*, 2020), bien que les YTH soient présents dans large diversité d'Eucaryotes (Berlivet *et al.*, 2019). Cet état des connaissances suggère une complexification des protéines de liaison à la m<sup>6</sup>A chez les Vertébrés, acquise au cours de l'évolution des Bilatériens. Cependant, la complexité de la famille des YTH chez les plantes (Balacco et Soller, 2018, Litholdo et Bousquet-Antonelli, 2019, Arribas-Hernández *et al.*, 2020) et la présence d'YTH chez les levures (Hazra *et al.*, 2019) permet d'émettre l'hypothèse d'une acquisition plus ancienne. Une théorie confirmée par notre étude où l'ensemble des YTH mais aussi trois *readers* décrits chez les Vertébrés sont conservés chez *C. gigas*. Cette famille des YTH est divisée en deux groupes, les YTHDC et YTHDF. Bien qu'YTHDC1 et YTHDC2 soient conservés chez les Bilatériens (Bailey *et al.*, 2017, Hsu *et al.*, 2017, Le Franc *et al.*, 2020), le domaine YTH chez la drosophile est absent dans la séquence de son orthologue YTHDC2 (Bailey *et al.*, 2017). Cette perte de spécificité de liaison aux m<sup>6</sup>A-ARN est potentiellement intervenue après la séparation des Ecdysozoaires et des Lophotrochozoaires. Enfin, bien que chez les plantes et les Vertébrés plusieurs paralogues des YTHDF soient présents (Wang *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2017, Berlivet *et al.*, 2019, Arribas-Hernández *et al.*, 2020, Kontur *et al.*, 2020), une seule forme est présente chez les Ecdysozoaires (Kan *et al.*, 2017, Jiang *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2021). Cette observation chez les Protostomiens est confirmée par notre étude où une seule YTHDF est identifiée et suggère une évolution commune chez ce clade. De plus, cela conforte les hypothèses d'une redondance de fonction des YTHDF chez les Vertébrés (Zaccara et Jaffrey, 2020, Kontur *et al.*, 2020).

Bien que l'ensemble des acteurs identifiés chez les Ecdysozoaires soient conservés chez les Vertébrés, la machinerie de ces derniers montre une complexité plus importante qui peut être envisagée comme une acquisition de spécialisation catalytique au cours de l'évolution. Cependant, la grande majorité des acteurs décrits chez les Vertébrés a été identifiée chez l'huître. À la lumière de nos résultats chez un Lophotrochozoaire, la machinerie de l'huître creuse apparaît plus proche de celle décrite chez les Vertébrés. Cette divergence met en évidence une potentielle évolution de la machinerie des Ecdysozoaires après la séparation des Ecdysozoaires et Lophotrochozoaires. Ces observations remettent en question la validité de la généralisation des caractéristiques de *D. melanogaster* et *C. elegans* pour l'ensemble

## Synthèse générale et perspectives

des Protostomiens. Néanmoins il convient de rester prudent quant à cette conclusion générale car la machinerie des Ecdysozoaires n'a été décrite que chez trois espèces d'Insectes et un Nématode. Une étude sur un plus grand nombre d'espèces de Protostomiens permettrait de mieux appréhender l'évolution de cette machinerie. Une recherche *in silico* des acteurs de la m<sup>6</sup>A et des domaines impliqués dans cette voie épitranscriptomique permettrait d'évaluer la conservation de la machinerie et son évolution au sein des Protostomiens.

L'huître apparaît alors comme un modèle pour l'étude de la m<sup>6</sup>A. Cette méthylation impliquée dans le développement et la transmission de traits maternels montre une histoire évolutive proche de celle des Vertébrés. La m<sup>6</sup>A détectée au niveau des transcrits VASA maternels suggère une régulation de la lignée germinale de *C. gigas* par la m<sup>6</sup>A, modulée par les facteurs environnementaux. La variation de la m<sup>6</sup>A de ce transcrit suggère une réponse environnementale transgénérationnelle en impactant la gamétogenèse de la descendance. Un suivi de la méthylation de ce transcrit, ainsi que des phénotypes de la descendance lors du développement et de la gamétogenèse, dans des conditions environnementales contrastées permettrait d'évaluer le rôle de la m<sup>6</sup>A dans la mise en place de la lignée germinale et de la gamétogenèse. Une altération de la gamétogenèse de la descendance via un effet maternel médié par la m<sup>6</sup>A confirmerait son rôle transgénérationnel. Or, les ARN et donc la m<sup>6</sup>A ont une demi-vie courte en comparaison aux marques épigénétiques au niveau de l'ADN ou de la chromatine qui apparaissent alors comme plus pérennes. La m<sup>6</sup>A et sa machinerie associée sont en interaction avec les marques épigénétiques guidant notamment les modifications des histones H3K9 (Li *et al.*, 2020d, Xu *et al.*, 2021). Cette voie épitranscriptomique pourrait fixer dans le génome un effet maternel transgénérationnel en modulant les modifications des histones. Il serait donc intéressant de suivre les modifications des histones telles que les méthylations de H3K9 conservées chez l'huître (Fellous *et al.*, 2015) au cours du développement et de la gamétogenèse de la descendance suite à une exposition à *A. minutum* ou aux MP.

Dans l'ensemble, les études réalisées pendant ce doctorat constituent un travail pionnier qui a permis de révéler un niveau de régulation de l'expression des gènes inconnu chez les Lophotrochozoaires, qui ouvre de nombreuses perspectives de recherches. Les résultats obtenus permettent une meilleure compréhension de la

## **Synthèse générale et perspectives**

régulation épigénétique du développement et son évolution dans un contexte eco-evo-devo.







# **Bibliographie**



## Bibliographie

### -A-

**Adams, J.M., Cory, S.**, 1975, « Modified nucleosides and bizarre 5'-termini in mouse myeloma mRNA », *Nature*, 255, 5503, p. 28- 33, doi: 10.1038/255028a0.

**Agreste**, 2020, « Enquête Aquaculture 2018 », Disponible sur: [https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/ChdAgri2003/C&D\\_2020\\_Aquaculture-2018V3.pdf](https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/ChdAgri2003/C&D_2020_Aquaculture-2018V3.pdf).

**Alarcón, C.R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., Tavazoie, S.F.**, 2015, « HNRNPA2B1 Is a Mediator of m6A-Dependent Nuclear RNA Processing Events », *Cell*, 162, 6, p. 1299- 1308, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.011.

**De Almeida, T.R., Alix, M., Cam, A. Le, Klopp, C., Montfort, J., Toomey, L., Ledoré, Y., Bobe, J., Chardard, D., Schaerlinger, B., Fontaine, P.**, 2019, « Domestication may affect the maternal mRNA profile in unfertilized eggs, potentially impacting the embryonic development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) », *PLoS ONE*, 14, 12, p. 1- 25, doi: 10.1371/journal.pone.0226878.

**Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.**, 1997, « Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs », *Nucleic Acids Research*, 25, 17, p. 3389- 3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

**Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M.**, 2012, « The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health », *Harmful Algae*, 14, p. 10- 35, doi: 10.1016/j.hal.2011.10.012.

**Arribas-Hernández, L., Simonini, S., Hansen, M.H., Botterweg Paredes, E., Bressendorff, S., Dong, Y., Østergaard, L., Brodersen, P.**, 2020, « Recurrent requirement for the m6A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis », *Development*, 28, p. dev.189134, doi: 10.1242/dev.189134.

**Arthur, C., Baker, J., Bamford, H.**, 2009, « Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence , Effects , and Fate of Microplastic Marine Debris ».

**Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H.**, 2017, « Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions », *Environment International*, 102, p. 165- 176, doi: 10.1016/j.envint.2017.02.013.

**Ayadi, L., Galvanin, A., Pichot, F., Marchand, V., Motorin, Y.**, 2019, « RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions », *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 3, p. 253- 269, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.11.009.

## Bibliographie

### -B-

- Badyaev, A. V., Uller, T.**, 2009, « Parental effects in ecology and evolution: Mechanisms, processes and implications », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 1520, p. 1169- 1177, doi: 10.1098/rstb.2008.0302.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., Pasquinelli, A.E.**, 2005, « Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation », *Cell*, 122, 4, p. 553- 563, doi: 10.1016/j.cell.2005.07.031.
- Baguñà, J., Martinez, P., Paps, J., Riutort, M.**, 2008, « Back in time: A new systematic proposal for the Bilateria », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 1496, p. 1481- 1491, doi: 10.1098/rstb.2007.2238.
- Bailey, A.S., Batista, P.J., Gold, R.S., Grace Chen, Y., de Rooij, D.G., Chang, H.Y., Fuller, M.T., Freeman, M., Bailey, A.S., Batista, P.J., Gold, R.S., Grace Chen, Y., de Rooij, D.G., Chang, H.Y., Fuller, M.T.**, 2017, « The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline », *eLife*, 6, p. 1- 29, doi: 10.7554/eLife.26116.
- Balacco, D.L., Soller, M.**, 2018, « The m<sup>6</sup>A writer: Rise of a machine for growing tasks », *Biochemistry*, 58, 5, p. acs.biochem.8b01166, doi: 10.1021/acs.biochem.8b01166.
- Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A.J., Graba, Y.**, 2014, « Hox Proteins Mediate Developmental and Environmental Control of Autophagy », *Developmental Cell*, 28, 1, p. 56- 69, doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.024.
- Bartel, D.P.**, 2004, « MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, Function », *Cell*, 116, 2, p. 281- 297, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Bartolomei, M.S., Webber, A.L., Brunkow, M.E., Tilghman, S.M.**, 1993, « Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene », *Genes and Development*, 7, 9, p. 1663- 1673, doi: 10.1101/gad.7.9.1663.
- Barucca, M., Canapa, A., Biscotti, M.A.**, 2016, « An overview of Hox genes in Lophotrochozoa: Evolution and functionality », *Journal of Developmental Biology*, 4, 1, p. 1- 15, doi: 10.3390/jdb4010012.
- Batista, P.J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., Bouley, D.M., Lujan, E., Haddad, B., Daneshvar, K., Carter, A.C., Flynn, R.A., Zhou, C., Lim, K.S., Dedon, P., Wernig, M., Mullen, A.C., Xing, Y., Giallourakis, C.C., Chang, H.Y., Howard, Y., Batista, P.J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., Bouley, D.M., Dedon, P., Wernig, M., Mullen, A.C., Xing, Y., Giallourakis, C.C., Chang, H.Y.**, 2014, « M6A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells », *Cell Stem Cell*, 15, 6, p. 707- 719, doi: 10.1016/j.stem.2014.09.019.
- Bayne, B.L.**, 2017, *Biology of Oysters, Developments in Aquaculture and Fisheries Science*.
- Bedi, R.K., Huang, D., Eberle, S.A., Wiedmer, L., Śledź, P., Cafilisch, A.**, 2020, « Small-Molecule Inhibitors of METTL3, the Major Human Epitranscriptomic Writer »,

## Bibliographie

*ChemMedChem*, 15, 9, p. 744- 748, doi: 10.1002/cmdc.202000011.

**Berlivet, S., Scutenaire, J., Deragon, J.M., Bousquet-Antonelli, C.**, 2019, « Readers of the m 6 A epitranscriptomic code », *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 3, p. 329- 342, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.12.008.

**Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yiangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N.C., de Los Mozos, I.R., Sadee, C., Lenaerts, A.-S.S., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E., Ule, J., Stunnenberg, H.G., Mendjan, S., Vallier, L., Sadée, C., Lenaerts, A.-S.S., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E., Ule, J., Stunnenberg, H.G., Mendjan, S., Vallier, L.**, 2018, « The SMAD2/3 interactome reveals that TGF $\beta$  controls m 6 A mRNA methylation in pluripotency », *Nature*, 555, 7695, p. 256- 259, doi: 10.1038/nature25784.

**Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M.**, 2000, « Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France) », *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 125, 3, p. 359- 369, doi: 10.1016/S0305-0491(99)00187-X.

**Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A.**, 2013, « Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.) », *Environmental Science & Technology*, 47, 1, p. 593- 600, doi: 10.1021/es302763x.

**Bhat, S.A., Ahmad, S.M., Mumtaz, P.T., Malik, A.A., Dar, M.A., Urwat, U., Shah, R.A., Ganai, N.A.**, 2016, « Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility », *Non-coding RNA Research*, 1, 1, p. 43- 50, doi: 10.1016/j.ncrna.2016.11.002.

**Bhutani, N., Burns, D.M., Blau, H.M.**, 2011, « Perspective DNA Demethylation Dynamics », *Cell*, 146, 6, p. 866- 872, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042.

**Bier, E., De Robertis, E.M.**, 2015, « BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning », *Science*, 348, 6242, doi: 10.1126/science.aaa5838.

**Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J.**, 2009, « ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks », *Bioinformatics*, 25, 8, p. 1091- 1093, doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.

**Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., Macleod, D.**, 1985, « A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA », *Cell*, 40, 1, p. 91- 99, doi: 10.1016/0092-8674(85)90312-5.

**Bissen, S.T., Weisblat, D.A.**, 1991, « Transcription in leech: mRNA synthesis is required for early cleavages in *Helobdella embryos* », *Developmental Biology*, 146, 1, p. 12- 23, doi: 10.1016/0012-1606(91)90442-6.

**Blighe, K., Lewis, M.**, 2019, « PCAtools: everything Principal Components Analysis », R package, Disponible sur: <https://github.com/kevinblighe/PCAtools>.

**Boccaletto, P., MacHnicka, M.A., Purta, E., Pitkowski, P., Baginski, B., Wirecki,**

## Bibliographie

- T.K., De Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P.A., Kotter, A., Helm, M., Bujnicki, J.M.**, 2018, « MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update », *Nucleic Acids Research*, 46, D1, p. D303- D307, doi: 10.1093/nar/gkx1030.
- Bodi, Z., Button, J.D., Grierson, D., Fray, R.G.**, 2010, « Yeast targets for mRNA methylation », *Nucleic Acids Research*, 38, 16, p. 5327- 5335, doi: 10.1093/nar/gkq266.
- Bokar, J.A., Rath-Shambaugh, M.E., Ludwiczak, R., Narayan, P., Rottman, F.**, 1994, « Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei », *The Journal of biological chemistry*, 269, 26, p. 17697- 704, Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021282>.
- Bokar, J.A., Shambaugh, M.E., Polayes, D., Matera, A.G., Rottman, F.M.**, 1997, « Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. », *RNA (New York, N.Y.)*, 3, 11, p. 1233- 47, Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409616>.
- Bonduriansky, R., Day, T.**, 2009, « Nongenetic inheritance and its evolutionary implications », *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, p. 103- 125, doi: 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173441.
- Borcier, E., Morvezen, R., Boudry, P., Miner, P., Charrier, G., Laroche, J., Hegaret, H.**, 2017, « Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus* », *Aquatic Toxicology*, 184, p. 142- 154, doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.009.
- Botta, R., Asche, F., Borsum, J.S., Camp, E. V.**, 2020, « A review of global oyster aquaculture production and consumption », *Marine Policy*, 117, July 2019, p. 103952, doi: 10.1016/j.marpol.2020.103952.
- Bourc'his, D., Bestor, T.H.**, 2004, « Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L », *Nature*, 431, 7004, p. 96- 99, doi: 10.1038/nature02886.
- Bourgeois, G., Létoquart, J., van Tran, N., Graille, M.**, 2017, « Trm112, a protein activator of methyltransferases modifying actors of the eukaryotic translational apparatus », *Biomolecules*, 7, 1, p. 1- 19, doi: 10.3390/biom7010007.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L.**, 2005, « Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP », *Nature*, 434, 7034, p. 763- 767, doi: 10.1038/nature03415.
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Hélène Thomas**, 2020a, « Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages », *Chemosphere*, 254, p. 1- 10, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126793.
- Bringer, A., Hélène Thomas, Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J.**, 2020b, « High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster *D-larvae*, *Crassostrea gigas*, depending on particle size », *Environmental Pollution*,



## Bibliographie

260, p. 113978, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2020.113978.

**Brown, J.A., Kinzig, C.G., DeGregorio, S.J., Steitz, J.A.,** 2016, « Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 49, p. 14013- 14018, doi: 10.1073/pnas.1614759113.

**Byrne, B.M., Gruber, M., Ab, G.,** 1989, « The evolution of egg yolk proteins », *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 53, 1, p. 33- 69, doi: 10.1016/0079-6107(89)90005-9.

### -C-

**Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L.,** 2009, « BLAST+: Architecture and applications », *BMC Bioinformatics*, 10, p. 1- 9, doi: 10.1186/1471-2105-10-421.

**Carroll, S.M., Narayan, P., Rottman, F.M.,** 1990, « N6-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA. », *Molecular and cellular biology*, 10, 9, p. 4456- 4465, doi: 10.1128/MCB.10.9.4456.

**Castrec, J., Soudant, P., Payton, L., Tran, D., Miner, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Huvet, A., Quillien, V., Boullot, F., Amzil, Z., Hégaret, H., Fabioux, C., Goïc, N. Le, Huvet, A., Quillien, V., Boullot, F., Amzil, Z., Hégaret, H., Fabioux, C.,** 2018, « Bioactive extracellular compounds produced by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* are highly detrimental for oysters », *Aquatic Toxicology*, 199, February, p. 188- 198, doi: S0166445X18301267.

**Castrec, J., Hégaret, H., Alunno-Bruscia, M., Picard, M., Soudant, P., Petton, B., Boulais, M., Suquet, M., Quéau, I., Ratiskol, D., Foulon, V., Le Goïc, N., Fabioux, C.,** 2019, « The dinoflagellate *Alexandrium minutum* affects development of the oyster *Crassostrea gigas*, through parental or direct exposure », *Environmental Pollution*, 246, p. 827- 836, doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.084.

**Castrec, J., Hégaret, H., Huber, M., Le Grand, J., Huvet, A., Tallec, K., Boulais, M., Soudant, P., Fabioux, C.,** 2020, « The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* impairs the performance of oyster embryos and larvae », *Harmful Algae*, 92, January, p. 101744, doi: 10.1016/j.hal.2020.101744.

**Cayir, A., Barrow, T.M., Guo, L., Byun, H.M.,** 2019, « Exposure to environmental toxicants reduces global N6-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes », *Environmental Research*, 175, December 2018, p. 228- 234, doi: 10.1016/j.envres.2019.05.011.

**Chang, M., Lv, H., Zhang, W., Ma, C., He, X., Zhao, S., Zhang, Z.-W.W., Zeng, Y.-X.X., Song, S., Niu, Y., Tong, W.-M.M.,** 2017, « Region-specific RNA m 6 A methylation represents a new layer of control in the gene regulatory network in the mouse brain », *Open Biology*, 7, 9, p. 170166, doi: 10.1098/rsob.170166.

**Chapelle, A., Le Gac, M., Labry, C., Siano, R., Quere, J., Caradec, F., Le Bec, C., Nezan, E., Doner, A., Gouriou, J.,** 2015, « The Bay of Brest (France), a new risky site for toxic *Alexandrium minutum* blooms and PSP shellfish contamination », *Harmful Algae News*, 51, August, p. 4- 5.

**Chen, H., Liu, Q., Yu, D., Natchiar, K., Zhou, C., Hsu, C., Hsu, P.-H., Zhang, X.,**



## Bibliographie

- Klaholz, B., Gregory, R., Cheng, X., Shi, Y.**, 2020, « METTL5, an 18S rRNA-specific m<sup>6</sup>A methyltransferase, modulates expression of stress response genes », 617, doi: 10.1101/2020.04.27.064162.
- Chen, J., Torcia, S., Xie, F., Lin, C., Cakmak, H., Franciosi, F., Horner, K., Onodera, C., Song, J.S., Cedars, M.I., Ramalho-Santos, M., Conti, M.**, 2013, « Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes », *Nature Cell Biology*, 15, 12, p. 1415- 1423, doi: 10.1038/ncb2873.
- Chen, J., Sun, Y., Xu, X., Wang, D., He, J., Zhou, H., Lu, Y., Zeng, J., Du, F., Gong, A., Xu, M.**, 2017a, « YTH domain family 2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition/proliferation dichotomy in pancreatic cancer cells », *Cell Cycle*, 16, 23, p. 2259- 2271, doi: 10.1080/15384101.2017.1380125.
- Chen, T., Hao, Y.J., Zhang, Y., Li, M.M., Wang, M., Han, W., Wu, Y., Lv, Y., Hao, J., Wang, L., Li, A., Yang, Y.Y.G.Y., Jin, K.X., Zhao, X., Li, Y., Ping, X.L., Lai, W.Y., Wu, L.G., Jiang, G., Wang, H.L., Sang, L., Wang, X.J., Yang, Y.Y.G.Y., Zhou, Q.**, 2015, « M6A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency », *Cell Stem Cell*, 16, 3, p. 289- 301, doi: 10.1016/j.stem.2015.01.016.
- Chen, Y.G., Kim, M. V., Chen, X., Batista, P.J., Aoyama, S., Wilusz, J.E., Iwasaki, A., Chang, H.Y.**, 2017b, « Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity », *Molecular Cell*, 67, 2, p. 228-238.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.022.
- Cherif-feildel, M.**, 2019, *Structure et fonctionnement de la niche germinale chez un Lophotrochozoaire, l'huître creuse Crassostrea gigas*, Thèse de doctorat.
- Chmielowska-Bąk, J., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J.**, 2019, « In search of the mRNA modification landscape in plants », *BMC plant biology*, 19, 1, p. 421, doi: 10.1186/s12870-019-2033-2.
- Choe, J., Lin, S., Zhang, W., Liu, Q., Wang, L., Ramirez-Moya, J., Du, P., Kim, W., Tang, S., Sliz, P., Santisteban, P., George, R.E., Richards, W.G., Wong, K.K., Locker, N., Slack, F.J., Gregory, R.I.**, 2018, « mRNA circularization by METTL3–eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis », *Nature*, 561, 7724, p. 556- 560, doi: 10.1038/s41586-018-0538-8.
- Clift, D., Schuh, M.**, 2013, « Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 9, p. 549- 562, doi: 10.1038/nrm3643.
- Cock, P.J.A., Chilton, J.M., Grüning, B., Johnson, J.E., Soranzo, N.**, 2015, « NCBI BLAST+ integrated into Galaxy », *GigaScience*, 4, 1, p. 0- 6, doi: 10.1186/s13742-015-0080-7.
- Coker, H., Wei, G., Brockdorff, N.**, 2019, « m6A modification of non-coding RNA and the control of mammalian gene expression », *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 3, p. 310- 318, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.12.002.
- Coker, H., Wei, G., Moindrot, B., Mohammed, S., Nesterova, T., Brockdorff, N.**, 2020, « The role of the Xist 5' m6A region and RBM15 in X chromosome inactivation », *Wellcome Open Research*, 5, p. 31, doi:

## Bibliographie

10.12688/wellcomeopenres.15711.1.

**Cole, M., Galloway, T.S.**, 2015, « Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae », *Environmental Science and Technology*, 49, 24, p. 14625- 14632, doi: 10.1021/acs.est.5b04099.

**Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S.**, 2013, « Microplastic ingestion by zooplankton », *Environmental Science and Technology*, 47, 12, p. 6646- 6655, doi: 10.1021/es400663f.

**Comeau, L.A., Babarro, J.M.F., Riobó, P., Scarratt, M., Starr, M., Tremblay, R.**, 2019, « PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium minutum* induces valve microclosures in the mussel *Mytilus galloprovincialis* », *Aquaculture*, 500, October 2018, p. 407- 413, doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.025.

**Coots, R.A., Liu, X.M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., Qian, S.B.**, 2017, « m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation », *Molecular Cell*, 68, 3, p. 504-514.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.002.

**Coquereau, L., Jolivet, A., Hégaret, H., Chauvaud, L.**, 2016, « Short-Term behavioural responses of the great scallop pecten maximus exposed to the toxic alga *alexandrium minutum* measured by accelerometry and passive acoustics », *PLoS ONE*, 11, 8, p. 1- 15, doi: 10.1371/journal.pone.0160935.

**Cox, K.H., Takahashi, J.S.**, 2019, « Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism », *Journal of Molecular Endocrinology*, 63, 4, p. R93- R102, doi: 10.1530/JME-19-0153.

**Cranfield, H.J.**, 1975, « The ultrastructure and histochemistry of the larval cement of *Ostrea edulis* L. », *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55, 2, p. 497- 503, doi: 10.1017/S0025315400016088.

**Crofton, A.E., Cartwright, E.L., Feitzinger, A.A., Lott, S.E.**, 2018, « Effect of larval nutrition on maternal mRNA contribution to the *Drosophila* Egg », *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8, 6, p. 1933- 1941, doi: 10.1534/g3.118.200283.

**Cui, X., Meng, J., Zhang, S., Chen, Y., Huang, Y.**, 2016a, « A novel algorithm for calling mRNA m6A peaks by modeling biological variances in MeRIP-seq data », *Bioinformatics*, 32, 12, p. i378- i385, doi: 10.1093/bioinformatics/btw281.

**Cui, X., Wei, Z., Zhang, L., Liu, H., Sun, L., Zhang, S.W., Huang, Y., Meng, J.**, 2016b, « Guitar: An R/Bioconductor Package for Gene Annotation Guided Transcriptomic Analysis of RNA-Related Genomic Features », *BioMed Research International*, 2016, doi: 10.1155/2016/8367534.

-D-

**Delatte, B., Wang, F., Ngoc, L.V., Collignon, E., Bonvin, E., Deplus, R., Calonne, E., Hassabi, B., Putmans, P., Awe, S., Wetzels, C., Kreher, J., Soin, R., Creppe, C., Limbach, P.A., Gueydan, C., Kruys, V., Brehm, A., Minakhina, S., Defrance, M., Steward, R., Fuks, F.**, 2016, « Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine », *Science*, 351, 6270, p. 282- 285, doi: 10.1126/science.aac5253.

**Desrosiers, R.C., Friderici, K.H., Rottman, F.M.**, 1975, « Characterization of Novikoff Hepatoma mRNA Methylation and Heterogeneity in the Methylated 5'

## Bibliographie

Terminus », *Biochemistry*, 14, 20, p. 4367- 4374, doi: 10.1021/bi00691a004.

**Desrosiers, R., Friderici, K., Rottman, F.**, 1974, « Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, 10, p. 3971- 3975, doi: 10.1073/pnas.71.10.3971.

**Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Favrel, P.**, 2011, « Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns », *BMC Genomics*, 12, 1, p. 468, doi: 10.1186/1471-2164-12-468.

**Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R.**, 2013, « STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner », *Bioinformatics*, 29, 1, p. 15- 21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

**Dohmen, R.M.**, 1992, « Cell lineage in molluscan development », *Microscopy Research and Technique*, 22, 1, p. 75- 102, doi: 10.1002/jemt.1070220107.

**Dominissini, D., Moshitch-moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., Rechavi, G., Kupiec, M., Sorek, R., Rechavi, G.**, 2012, « Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq », *Nature*, 485, 7397, p. 201- 206, doi: 10.1038/nature11112.

**Dominissini, D., Nachtergaele, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Ben-Haim, M.S., Dai, Q., Di Segni, A., Salmon-Divon, M., Clark, W.C., Zheng, G., Pan, T., Solomon, O., Eyal, E., Hershkovitz, V., Han, D., Doré, L.C., Amariglio, N., Rechavi, G., He, C.**, 2016, « The dynamic N1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA », *Nature*, 530, 7591, p. 441- 446, doi: 10.1038/nature16998.

**Dorsett, M., Westlund, B., Schedl, T.**, 2009, « METT-10, a putative methyltransferase, inhibits germ cell proliferative fate in *Caenorhabditis elegans* », *Genetics*, 183, 1, p. 233- 247, doi: 10.1534/genetics.109.105270.

**Drewell, R.A., Bush, E.C., Remnant, E.J., Wong, G.T., Beeler, S.M., Stringham, J.L., Lim, J., Oldroyd, B.P.**, 2014, « The dynamic DNA methylation cycle from egg to sperm in the honey bee *Apis mellifera* », *Development (Cambridge)*, 141, 13, p. 2702- 2711, doi: 10.1242/dev.110163.

**Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., Wu, L.**, 2016, « YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex », *Nature Communications*, 7, p. 1- 11, doi: 10.1038/ncomms12626.

**Duis, K., Coors, A.**, 2016, « Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects », *Environmental Sciences Europe*, 28, 1, p. 1- 25, doi: 10.1186/s12302-015-0069-y.

**Dumollard, R., Duchon, M., Carroll, J.**, 2007, « The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo », *Current Topics in Developmental Biology*, 77, 06, p. 21- 49, doi: 10.1016/S0070-2153(06)77002-8.

**Dunn, C.W., Giribet, G., Edgecombe, G.D., Hejnal, A.**, 2014, « Animal phylogeny

## Bibliographie

and its evolutionary implications », *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, p. 371- 395, doi: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627.

**Dunn, C.W., Ryan, J.F.**, 2015, « The evolution of animal genomes », *Current Opinion in Genetics and Development*, 35, p. 25- 32, doi: 10.1016/j.gde.2015.08.006.

### -E-

**Eckersley-Maslin, M.A., Alda-Catalinas, C., Reik, W.**, 2018, « Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 7, p. 1- 15, doi: 10.1038/s41580-018-0008-z.

**Edens, B.M., Vissers, C., Su, J., Arumugam, S., Xu, Z., Shi, H., Miller, N., Rojas Ringeling, F., Ming, G., He, C., Song, H., Ma, Y.C.**, 2019, « FMRP Modulates Neural Differentiation through m6A-Dependent mRNA Nuclear Export », *Cell Reports*, 28, 4, p. 845-854.e5, doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.072.

**Edupuganti, R.R., Geiger, S., Lindeboom, R.G.H., Shi, H., Hsu, P.J., Lu, Z., Wang, S.Y., Baltissen, M.P.A., Jansen, P.W.T.C., Rossa, M., Müller, M., Stunnenberg, H.G., He, C., Carell, T., Vermeulen, M.**, 2017, « N6-methyladenosine (m6A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis », *Nature Structural and Molecular Biology*, 24, 10, p. 870- 878, doi: 10.1038/nsmb.3462.

**Elango, N., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D., Yi, S. V.**, 2009, « DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee , *Apis mellifera* », *PNAS*, 106, 27, p. 11206- 11211, Disponible sur: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900301106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900301106).

**Elliott, B.A., Ho, H.-T., Ranganathan, S. V., Vangaveti, S., Ilkayeva, O., Abou Assi, H., Choi, A.K., Agris, P.F., Holley, C.L.**, 2019, « Modification of messenger RNA by 2'-O-methylation regulates gene expression in vivo », *Nature Communications*, 10, 1, p. 3401, doi: 10.1038/s41467-019-11375-7.

**Engreitz, J.M., Pandya-Jones, A., McDonel, P., Shishkin, A., Sirokman, K., Surka, C., Kadri, S., Xing, J., Goren, A., Lander, E.S., Plath, K., Guttman, M.**, 2013, « The Xist lncRNA Exploits Three-Dimensional Genome Architecture to Spread Across the X Chromosome », *Science*, 341, 6147, p. 1237973, doi: 10.1126/science.1237973.

**Extavour, C.G.M.**, 2007a, « Evolution of the bilaterian germ line: Lineage origin and modulation of specification mechanisms », *Integrative and Comparative Biology*, 47, 5, p. 770- 785, doi: 10.1093/icb/icm027.

**Extavour, C.G.M.**, 2007b, « Gray anatomy: Phylogenetic patterns of somatic gonad structures and reproductive strategies across the Bilateria », *Integrative and Comparative Biology*, 47, 3, p. 420- 426, doi: 10.1093/icb/icm052.

### -F-

**Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M.**, 2004a, « Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas* », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 2, p. 592- 598, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.009.

**Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A.**, 2009, « *In vivo* RNA



## Bibliographie

interference in oyster *-vasa* silencing inhibits germ cell development », *FEBS Journal*, 276, 9, p. 2566- 2573, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x.

**Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A.**, 2004b, « The oyster *vasa*-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas* », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 4, p. 897- 904, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.145.

**Fallet, M., Luquet, E., David, P., Cosseau, C.**, 2020, « Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks », *Gene*, 729, October 2019, p. 144166, doi: 10.1016/j.gene.2019.144166.

**Fan, Y., Zhang, C., Zhu, G.**, 2019, « Profiling of RNA N6-methyladenosine methylation during follicle selection in chicken ovary », *Poultry Science*, 98, 11, p. 6117- 6124, doi: 10.3382/ps/pez277.

**Fei, Q., Zou, Z., Roundtree, I.A., Sun, H.-L., He, C.**, 2020, « YTHDF2 promotes mitotic entry and is regulated by cell cycle mediators », *PLOS Biology*, 18, 4, p. e3000664, doi: 10.1371/journal.pbio.3000664.

**Fellous, A., Favrel, P., Guo, X., Riviere, G.**, 2014a, « The Jumonji gene family in *Crassostrea gigas* suggests evolutionary conservation of Jmj-C histone demethylases orthologues in the oyster gametogenesis and development », *Gene*, 538, 1, p. 164- 175, doi: 10.1016/j.gene.2013.12.016.

**Fellous, A., Le Franc, L., Jouaux, A., Goux, D., Favrel, P., Rivière, G.**, 2019, « Histone Methylation Participates in Gene Expression Control during the Early Development of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* », *Genes*, 10, 9, p. 695, doi: 10.3390/genes10090695.

**Fellous, A., Pascal, F., Rivière, G.**, 2014b, « Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone- demethylase orthologues during the development of the oyster *Crassostrea gigas* », *Marine Genomics*, doi: 10.1016/j.margen.2014.09.002.

**Fellous, A., Pascal, F., Rivière, G., Favrel, P., Riviere, G., Pascal, F., Rivière, G.**, 2015, « Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas* », *Marine Genomics*, 19, September, p. 23- 30, doi: 10.1016/j.margen.2014.09.002.

**Fitzpatrick, G. V., Soloway, P.D., Higgins, M.J.**, 2002, « Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1 », *Nature Genetics*, 32, 3, p. 426- 431, doi: 10.1038/ng988.

**Fleury, E., Petton, S., Corporeau, C., Benabdelmouna, A., Pouvreau, S., Le Roy, V., Guillet, T., Queau, I., Petton, B., Vilaça, R., Ledu, C., Louis, W., Normand, J., Gangnery, A., Halm, M., Penot, J., Le Gall, P., Cheve, J., Rollet, C., Bouget, J., Shapira, M., Cochennec-Laureau, N., Seugnet, J., Geairon, P., Grizon, J., Chabiran, J., Piraud, A., Bruneau, A., Auby, I., D'Amico, C., Meteigner, C., Tournaire, M., Rigouin, L., Rumèbe, M., Trut, F., Antajan, E., Lagarde, F., Mortreux, S., Messiaen, G., Godfrin, Y., Fiandrino, A., Bouquet, A., Béchade, M., Barbier, P., Blachier, P., Allain, G., Cochet, H.**, 2020, « Observatoire national du cycle de vie de l'huître creuse en France. Rapport annuel 2019. Convention DPMA

## Bibliographie

2019 », *IFREMER*, p. 1- 69.

**Foulon, V., Artigaud, S., Buscaglia, M., Bernay, B., Fabioux, C., Petton, B., Elies, P., Boukerma, K., Hellio, C., Guérard, F., Boudry, P.**, 2018, « Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae », *Scientific Reports*, 8, 1, p. 1- 14, doi: 10.1038/s41598-018-33720-4.

**Le Franc, L., Bernay, B., Petton, B., Since, M., Favrel, P., Rivière, G.**, 2020, « A functional m6A-RNA methylation pathway in the oyster *Crassostrea gigas* assumes epitranscriptomic regulation of lophotrochozoan development », *FEBS Journal*, p. 1- 16, doi: 10.1111/febs.15500.

**Fu, Y., Zhuang, X.**, 2020, « m6A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation », *Nature Chemical Biology*, 16, 9, p. 955- 963, doi: 10.1038/s41589-020-0524-y.

**Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M.S., Kakeya, H., Manabe, I., Okamura, H.**, 2013, « RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock », *Cell*, 155, 4, p. 793- 806, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.026.

**Fustin, J.M., Kojima, R., Itoh, K., Chang, H.Y., Ye, S., Zhuang, B., Oji, A., Gibo, S., Narasimamurthy, R., Virshup, D., Kurosawa, G., Doi, M., Manabe, I., Ishihama, Y., Ikawa, M., Okamura, H.**, 2018, « Two Ck1 $\delta$  transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 27, p. E6386- E6386, doi: 10.1073/pnas.1809838115.

**Fustin, J.M., Ye, S., Rakers, C., Kaneko, K., Fukumoto, K., Yamano, M., Versteven, M., Grünewald, E., Cargill, S.J., Tamai, T.K., Xu, Y., Jabbur, M.L., Kojima, R., Lamberti, M.L., Yoshioka-Kobayashi, K., Whitmore, D., Tammam, S., Howell, P.L., Kageyama, R., Matsuo, T., Stanewsky, R., Golombek, D.A., Johnson, C.H., Kakeya, H., van Ooijen, G., Okamura, H.**, 2020, « Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans », *Communications Biology*, 3, 1, p. 1- 14, doi: 10.1038/s42003-020-0942-0.

## -G-

**Galtsoff, P.S.**, 1964, *The American oyster, Crassostrea virginica Gmelin*, Vol.64., US Government Printing Office, US Government Printing Office.

**Garcia-Campos, M.A., Edelheit, S., Toth, U., Safra, M., Shachar, R., Viukov, S., Winkler, R., Nir, R., Lasman, L., Brandis, A., Hanna, J.H., Rossmanith, W., Schwartz, S.**, 2019, « Deciphering the “m6A Code” via Antibody-Independent Quantitative Profiling », *Cell*, 178, 3, p. 1- 17, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.013.

**Gardon, T., Reisser, C., Soyeux, C., Quillien, V., Le Moullac, G.**, 2018, « Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera* », *Environmental Science and Technology*, 52, 9, p. 5277- 5286, doi: 10.1021/acs.est.8b00168.

**Gatzmann, F., Falckenhayn, C., Gutekunst, J., Hanna, K., Raddatz, G., Carneiro, V.C., Lyko, F.**, 2018, « The methylome of the marbled crayfish links gene body methylation to stable expression of poorly accessible genes », *Epigenetics and Chromatin*, 11, 1, p. 1- 12, doi: 10.1186/s13072-018-0229-6.

## Bibliographie

- Gaunt, S.J.**, 2018, « Hox cluster genes and collinearities throughout the tree of animal life », *International Journal of Developmental Biology*, 62, 11- 12, p. 673- 683, doi: 10.1387/ijdb.180162sg.
- Gavery, M.R., Roberts, S.B.**, 2013, « Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc », *Peer J*, 1, e215, p. 1- 15, doi: 10.7717/peerj.215.
- Gavery, M.R., Roberts, S.B.**, 2010, « DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) », *BMC Genomics*, 11, 483, p. 1- 9, doi: 10.1186/1471-2164-11-483.
- Gerdes, P., Richardson, S.R., Mager, D.L., Faulkner, G.J.**, 2016, « Transposable elements in the mammalian embryo: Pioneers surviving through stealth and service », *Genome Biology*, 17, 1, p. 1- 17, doi: 10.1186/s13059-016-0965-5.
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A.F., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., Ben-Haim, M.S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D.A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., Zerbib, M., Maza, I., Rechavi, Y., Massarwa, R., Hanna, S., Amit, I., Levanon, E.Y., Amariglio, N., Stern-Ginossar, N., Novershtern, N., Rechavi, G., Hanna, J.H.**, 2015, « m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation », *Science*, 347, 6225, p. 1002- 1006, doi: 10.1126/science.1261417.
- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.Y., Gauffre, F., Phi, T.L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S.**, 2018, « Current opinion: What is a nanoplastic? », *Environmental Pollution*, 235, p. 1030- 1034, doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.024.
- Gilbert, S.F.**, 2001, « Ecological developmental biology: Developmental biology meets the real world », *Developmental Biology*, 233, 1, p. 1- 12, doi: 10.1006/dbio.2001.0210.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., Schier, A.F.**, 2005, « MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish », *Science*, 308, 5723, p. 833- 838, doi: 10.1126/science.1109020.
- Godini, R., Karami, K., Fallahi, H.**, 2019, « Genome imprinting in stem cells: A mini-review », *Gene Expression Patterns*, 34, July, p. 119063, doi: 10.1016/j.gep.2019.119063.
- Goh, Y.T., Koh, C.W.Q., Sim, D.Y., Roca, X., Goh, W.S.S.**, 2020, « METTL4 catalyzes m6Am methylation in U2 snRNA to regulate pre-mRNA splicing », *Nucleic Acids Research*, 48, 16, p. 9250- 9261, doi: 10.1093/nar/gkaa684.
- Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., Roberts, D.J.**, 2005, « BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system », *Mechanisms of Development*, 122, 6, p. 821- 833, doi: 10.1016/j.mod.2005.03.003.
- Gómez-Rubio, V.**, 2017, « ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition) », *Journal of Statistical Software*, 77, Book Review 2, doi: 10.18637/jss.v077.b02.



## Bibliographie

- Gonzalez, J., Qi, H., Liu, N., Lin, H.**, 2015, « Piwi Is a Key Regulator of Both Somatic and Germline Stem Cells in the *Drosophila* Testis », *Cell Reports*, 12, 1, p. 150- 161, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.004.
- Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C., Carolan, J.C.**, 2019, « Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*) », *Environmental Pollution*, 246, p. 423- 434, doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.017.
- Grizel, H., Heral, M.**, 1991, « Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) », *ICES Journal of Marine Science*, 47, 3, p. 399- 403, doi: 10.1093/icesjms/47.3.399.
- Gu, L., Wang, L., Chen, H., Hong, J., Shen, Z., Dhall, A., Lao, T., Liu, C., Wang, Z., Xu, Y., Tang, H.-W., Chakraborty, D., Chen, J., Liu, Z., Rogulja, D., Perrimon, N., Wu, H., Shi, Y.**, 2020, « CG14906 (mettl4) mediates m6A methylation of U2 snRNA in *Drosophila* », *Cell Discovery*, 6, 1, p. 44, doi: 10.1038/s41421-020-0178-7.
- Gu, Z., Eils, R., Schlesner, M.**, 2016, « Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data », *Bioinformatics*, 32, 18, p. 2847- 2849, doi: 10.1093/bioinformatics/btw313.
- Guallar, C., Bacher, C., Chapelle, A.**, 2017, « Global and local factors driving the phenology of *Alexandrium minutum* (Halim) blooms and its toxicity », *Harmful Algae*, 67, p. 44- 60, doi: 10.1016/j.hal.2017.05.005.
- Guo, J., Tang, H.-W.W., Li, J., Perrimon, N., Yan, D.**, 2018, « Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase complex », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, March, p. 201720945, doi: 10.1073/pnas.1720945115.
- Gustafson, E.A., Wessel, G.M.**, 2010, « Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells », *BioEssays*, 32, 7, p. 626- 637, doi: 10.1002/bies.201000001.

## -H-

- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P.**, 2010a, « Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas* », *Aquatic Toxicology*, 97, 2, p. 96- 108, doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.006.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P.**, 2010b, « Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas* », *Harmful Algae*, 9, 5, p. 427- 439, doi: 10.1016/j.hal.2010.01.003.
- Haberkorn, H., Tran, D., Massabuau, J.C., Ciret, P., Savar, V., Soudant, P.**, 2011, « Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum* », *Marine Pollution Bulletin*, 62, 6, p. 1191- 1197, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.034.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle,**

## Bibliographie

**G.S., Dewell, S., Zavolan, M., Tuschl, T.**, 2010, « Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP », *Cell*, 141, 1, p. 129- 141, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.009.

**Hartenstein, V., Stollewerk, A.**, 2015, « The evolution of early neurogenesis », *Developmental Cell*, 32, 4, p. 390- 407, doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.004.

**Hasley, A., Chavez, S., Danilchik, M., Wühr, M., Pelegri, F.**, 2017, « Vertebrate Embryonic Cleavage Pattern Determination », dans p. 117- 171, doi: 10.1007/978-3-319-46095-6\_4.

**Haszprunar, G., Wanninger, A.**, 2012, « Molluscs », *Current Biology*, 22, 13, p. R510- R514, doi: 10.1016/j.cub.2012.05.039.

**Hausmann, I.U., Bodi, Z., Sanchez-Moran, E., Mongan, N.P., Archer, N., Fray, R.G., Soller, M.**, 2016, « M6 A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination », *Nature*, 540, 7632, p. 301- 304, doi: 10.1038/nature20577.

**Hawkins, R.D., Hon, G.C., Lee, L.K., Ngo, Q., Lister, R., Pelizzola, M., Edsall, L.E., Kuan, S., Luu, Y., Klugman, S., Antosiewicz-Bourget, J., Ye, Z., Espinoza, C., Agarwahl, S., Shen, L., Ruotti, V., Wang, W., Stewart, R., Thomson, J.A., Ecker, J.R., Ren, B.**, 2010, « Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-Committed Human Cells », *Cell Stem Cell*, 6, 5, p. 479- 491, doi: 10.1016/j.stem.2010.03.018.

**Hazra, D., Chapat, C., Graille, M.**, 2019, « m6A mRNA Destiny: Chained to the rhYTHm by the YTH-Containing Proteins », *Genes*, 10, 1, p. 49, doi: 10.3390/genes10010049.

**He, R.Z., Jiang, J., Luo, D.X.**, 2020, « The functions of N6-methyladenosine modification in lncRNAs », *Genes and Diseases*, xxxx, p. 1- 8, doi: 10.1016/j.gendis.2020.03.005.

**Heck, A.M., Wilusz, C.J.**, 2019, « Small changes, big implications: The impact of m6A RNA methylation on gene expression in pluripotency and development », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 9, p. 194402, doi: 10.1016/j.bbagr.2019.07.003.

**Hégaret, H., Da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Haberkorn, H., Shumway, S.E., Soudant, P.**, 2011, « In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs », *Cell Biology and Toxicology*, 27, 4, p. 249- 266, doi: 10.1007/s10565-011-9186-6.

**van der Heijden, G.W., Bortvin, A.**, 2009, « Transient relaxation of transposon silencing at the onset of mammalian meiosis », *Epigenetics*, 4, 2, p. 76- 79, doi: 10.4161/epi.4.2.7783.

**Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F.M., Favrel, P., Cunningham, C.**, 2005a, « Structural and functional evidences for a type 1 TGF- $\beta$  sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria », *Mechanisms of Development*, 122, 5, p. 695- 705, doi: 10.1016/j.mod.2004.12.004.

**Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F., Favrel, P., Cunningham, C.**, 2005b,

## Bibliographie

- « Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway », *FEBS Journal*, 272, 13, p. 3424- 3440, doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04761.x.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Favrel, P., Cunningham, C.**, 2007, « A tolloid homologue from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Gene Expression Patterns*, 7, 6, p. 700- 708, doi: 10.1016/j.modgep.2007.03.001.
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X.**, 1999, « A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies », *Water Research*, 33, 7, p. 1706- 1718, doi: 10.1016/S0043-1354(98)00381-9.
- Holland, L.Z.**, 2000, « Body-plan evolution in the Bilateria: Early antero-posterior patterning and the deuterostome-protostome dichotomy », *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 4, p. 434- 442, doi: 10.1016/S0959-437X(00)00109-X.
- Hongay, C.F., Orr-Weaver, T.L.**, 2011, « *Drosophila* Inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 36, p. 14855- 14860, doi: 10.1073/pnas.1111577108.
- Hongkuan, Z., Karsoon, T., Shengkang, L., Hongyu, M.**, 2020, « The functional roles of the non-coding RNAs in molluscs », *Gene*, November, p. 145300, doi: 10.1016/j.gene.2020.145300.
- Horiuchi, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Ohashi, R., Naito, M., Kodama, T., Hamakubo, T.**, 2013, « Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle », *Journal of Biological Chemistry*, 288, 46, p. 33292- 33302, doi: 10.1074/jbc.M113.500397.
- Horner, V.L., Wolfner, M.F.**, 2008, « Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation », *Developmental Dynamics*, 237, 3, p. 527- 544, doi: 10.1002/dvdy.21454.
- Horowitz, S., Horowitz, A., Nilsen, T.W., Munns, T.W., Rottman, F.M., Munnsf, T.W., Rottman, F.M.**, 1984, « Mapping of N6-methyladenosine residues in bovine prolactin rRNA (RNA methylation/antibodies to N6-methyladenosine) », doi: 10.1073/pnas.81.18.5667.
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S.**, 2004, « Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans ».
- Hsu, P.J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J., Cheng, Y., Luo, G., Dai, Q., Liu, M., Guo, X., Sha, J., Shen, B., He, C.**, 2017, « Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis », *Cell Research*, 27, 9, p. 1115- 1127, doi: 10.1038/cr.2017.99.
- Hsu, P.J., Shi, H., Zhu, A.C., Lu, Z., Miller, N., Edens, B.M., Ma, Y.C., He, C.**, 2019, « The RNA-binding protein FMRP facilitates the nuclear export of N 6 - methyladenosine-containing mRNAs », *Journal of Biological Chemistry*, 1, p. jbc.AC119.010078, doi: 10.1074/jbc.AC119.010078.
- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B.S., Mesquita, A.**,

## Bibliographie

- Liu, C., Yuan, C.L., Hu, Y.-C.C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J.R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., Wang, Y., Hu, C., Ferchen, K., Greis, K.D., Jiang, X., Wei, M., Qu, L., Guan, J.-L.L., He, C., Yang, J., Chen, J., 2018, « Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation », *Nature Cell Biology*, 20, 3, p. 285- 295, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
- Huang, H., Weng, H., Zhou, K., Wu, T., Zhao, B.S., Sun, M.M., Chen, Z., Deng, X., Xiao, G., Auer, F., Klemm, L., Wu, H., Zuo, Z., Qin, X., Dong, Y., Zhou, Y., Qin, H., Tao, S., Du, J., Liu, J., Lu, Z., Yin, H., Mesquita, A., Yuan, C.L., Hu, Y.-C.C., Sun, W., Su, R., Dong, L., Shen, C., Li, C., Qing, Y., Jiang, X., Wu, X., Sun, M.M., Guan, J.-L.L., Qu, L., Wei, M., Müschen, M., Huang, G., He, C., Yang, J., Chen, J., 2019a, « Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally », *Nature*, 567, 7748, p. 414- 419, doi: 10.1038/s41586-019-1016-7.
- Huang, K., Fan, G., 2010, « DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: An emerging systematic view », *Regenerative Medicine*, 5, 4, p. 531- 544, doi: 10.2217/rme.10.35.
- Huang, L., Ashraf, S., Wang, J., Lilley, D.M., 2017, « Control of box C/D snoRNP assembly by N 6 - methylation of adenine », *EMBO reports*, 18, 9, p. 1631- 1645, doi: 10.15252/embr.201743967.
- Huang, R.L., Yuan, Y., Zou, G.M., Liu, G., Tu, J., Li, Q., 2014, « LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B and BMP/Smad signaling », *Stem Cells and Development*, 23, 3, p. 277- 289, doi: 10.1089/scd.2013.0345.
- Huang, T., Chen, W., Liu, J., Gu, N., Zhang, R., 2019b, « Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals », *Nature Structural and Molecular Biology*, 26, 5, p. 380- 388, doi: 10.1038/s41594-019-0218-x.
- Ignatova, V. V., Stolz, P., Kaiser, S., Gustafsson, T.H., Lastres, P.R., Sanz-Moreno, A., Cho, Y.L., Amarie, O. V., Aguilar-Pimentel, A., Klein-Rodewald, T., Calzada-Wack, J., Becker, L., Marschall, S., Kraiger, M., Garrett, L., Seisenberger, C., Hölter, S.M., Borland, K., de Logt, E. Van, Jansen, P.W.T.C., Baltissen, M.P., Valenta, M., Vermeulen, M., Wurst, W., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Rando, O.J., Kellner, S.M., Bultmann, S., Schneider, R., 2020, « The rRNA m6A methyltransferase METTL5 is involved in pluripotency and developmental programs », *Genes and Development*, 34, 9- 10, p. 715- 729, doi: 10.1101/gad.333369.119.
- |-
- Inoue, A., Jiang, L., Lu, F., Suzuki, T., Zhang, Y., 2017a, « Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting », *Nature*, 547, 7664, p. 419- 424, doi: 10.1038/nature23262.
- Inoue, K., Ichiyanagi, K., Fukuda, K., Glinka, M., Sasaki, H., 2017b, « Switching of dominant retrotransposon silencing strategies from posttranscriptional to transcriptional mechanisms during male germ-cell development in mice », *PLoS Genetics*, 13, 7, p. 1- 24, doi: 10.1371/journal.pgen.1006926.
- Ivanova, I., Much, C., Di Giacomo, M., Azzi, C., Morgan, M., Moreira, P.N.,

## Bibliographie

**Monahan, J., Carrieri, C., Enright, A.J., O'Carroll, D.**, 2017, « The RNA m 6 A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence », *Molecular Cell*, 67, 6, p. 1059-1067.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.003.

### -J-

**Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T. V.**, 2010, « The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 2, p. 113- 127, doi: 10.1038/nrm2838.

**Jankovics, F., Bence, M., Sinka, R., Faragó, A., Bodai, L., Pettkó-Szandtner, A., Ibrahim, K., Takács, Z., Szarka-Kovács, A.B., Erdélyi, M.**, 2018, « *Drosophila* *small ovary* gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation », *Development (Cambridge)*, 145, 23, doi: 10.1242/dev.170639.

**Jia, G., Fu, Y., He, C.**, 2013, « Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation », *Trends in Genetics*, 29, 2, p. 108- 115, doi: 10.1016/j.tig.2012.11.003.

**Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., He, C.**, 2011, « N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO », *Nature Chemical Biology*, 7, 12, p. 885- 887, doi: 10.1038/nchembio.687.

**Jia, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., He, C.**, 2008, « Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO », *FEBS Letters*, 582, 23- 24, p. 3313- 3319, doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.019.

**Jiang, T., Li, J., Qian, P., Xue, P., Xu, J., Chen, Y., Zhu, J., Tang, S., Zhao, Q., Qian, H., Shen, X.**, 2019, « The role of N6 - methyladenosine modification on diapause in silkworm (*Bombyx mori*) strains that exhibit different voltinism », *Molecular Reproduction and Development*, April, p. mrd.23283, doi: 10.1002/mrd.23283.

**Jones, P.A.**, 2012, « Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond », *Nature Reviews Genetics*, 13, 7, p. 484- 492, doi: 10.1038/nrg3230.

### -K-

**Kan, L., Grozhik, A. V., Vedanayagam, J., Patil, D.P., Pang, N., Lim, K.-S., Huang, Y.-C., Joseph, B., Lin, C.-J., Despic, V., Guo, J., Yan, D., Kondo, S., Deng, W.-M., Dedon, P.C., Jaffrey, S.R., Lai, E.C.**, 2017, « The m6A pathway facilitates sex determination in *Drosophila* », *Nature Communications*, 8, 1, p. 15737, doi: 10.1038/ncomms15737.

**Kan, L., Ott, S., Joseph, B., Park, E.S., Dai, C., Kleiner, R., Claridge-Chang, A., Lai, E.C.**, 2020, « A neural m 6 A/YTHDF pathway is required for learning and memory in *Drosophila* », *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.07.982090.

**Kasowitz, S.D., Ma, J., Anderson, S.J., Leu, N.A., Xu, Y., Gregory, B.D., Schultz, R.M., Wang, P.J.**, 2018, « Nuclear m 6 A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development », *PLoS Genetics*, 14, 5, p. 1- 28, doi: 10.1371/journal.pgen.1007412.



## Bibliographie

- Kay, G.F., Penny, G.D., Patel, D., Ashworth, A., Brockdorff, N., Rastan, S.**, 1993, « Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation », *Cell*, 72, 2, p. 171- 182, doi: 10.1016/0092-8674(93)90658-D.
- Ke, S., Alemu, E.A., Mertens, C., Gantman, E.C., Fak, J.J., Mele, A., Haripal, B., Zucker-Scharff, I., Moore, M.J., Park, C.Y., Vågbo, C.B., Kusnierczyk, A., Klungland, A., Darnell, J.E., Darnell, R.B.**, 2015, « A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation », *Genes & Development*, 29, 19, p. 2037- 2053, doi: 10.1101/gad.269415.115.
- Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J.J., Vågbo, C.B., Geula, S., Hanna, J.H., Black, D.L., Darnell, J.E., Darnell, R.B.**, 2017, « m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover », *Genes and Development*, 31, 10, p. 990- 1006, doi: 10.1101/gad.301036.117.
- Khandelwal, A., Bacolla, A., Vasquez, K.M., Jain, A.**, 2015, « Long non-coding RNA: A new paradigm for lung cancer », *Molecular Carcinogenesis*, 54, 11, p. 1235- 1251, doi: 10.1002/mc.22362.
- Knuckles, P., Bühler, M.**, 2018, « Adenosine methylation as a molecular imprint defining the fate of RNA », *FEBS Letters*, 592, 17, p. 0- 1, doi: 10.1002/1873-3468.13107.
- Knuckles, P., Carl, S.H., Musheev, M., Niehrs, C., Wenger, A., Bühler, M.**, 2017, « RNA fate determination through cotranscriptional adenosine methylation and microprocessor binding », *Nature Structural and Molecular Biology*, 24, 7, p. 561- 569, doi: 10.1038/nsmb.3419.
- Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I.U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S.H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M.A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., Rognant, J.-Y.Y.**, 2018, « Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/FI(2)d », *Genes & Development*, 32, 2, p. 1- 15, doi: 10.1101/gad.309146.117.
- Koh, C.W.Q., Goh, Y.T., Goh, W.S.S.**, 2019, « Atlas of quantitative single-base-resolution N6-methyl-adenine methylomes », *Nature Communications*, 10, 1, p. 5636, doi: 10.1038/s41467-019-13561-z.
- Kontur, C., Jeong, M., Cifuentes, D., Giraldez, A.J.**, 2020, « Ythdf m6A Readers Function Redundantly during Zebrafish Development », *Cell Reports*, 33, 13, p. 108598, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108598.
- Kretschmer, J., Rao, H., Hackert, P., Sloan, K.E., Höbartner, C., Bohnsack, M.T.**, 2018, « The m6A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'-3' exoribonuclease XRN1 », *Rna*, 24, 10, p. 1339- 1350, doi: 10.1261/rna.064238.117.
- Krug, R.M., Morgan, M.A., Shatkin, A.J.**, 1976, « Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. », *Journal of Virology*, 20, 1, p. 45- 53, doi: 10.1128/jvi.20.1.45-53.1976.
- Kuznetsova, S.A., Petrukov, K.S., Pletnev, F.I., Sergiev, P. V., Dontsova, O.A.**

## Bibliographie

2019, « RNA (C5-cytosine) Methyltransferases », *Biochemistry (Moscow)*, 84, 8, p. 851- 869, doi: 10.1134/S0006297919080029.

**Kwon, B.G., Koizumi, K., Chung, S.Y., Kodera, Y., Kim, J.O., Saido, K.**, 2015, « Global styrene oligomers monitoring as new chemical contamination from polystyrene plastic marine pollution », *Journal of Hazardous Materials*, 300, p. 359- 367, doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.07.039.

**Kwon, J., Jo, Y.J., Namgoong, S., Kim, N.H.**, 2019, « Functional roles of hnRNPA2/B1 regulated by METTL3 in mammalian embryonic development », *Scientific Reports*, 9, 1, p. 8640, doi: 10.1038/s41598-019-44714-1.

-L-

**Larsson, J.**, 2019, « eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses », Disponible sur: <https://cran.r-project.org/package=eulerr>.

**Lasman, L., Hanna, J.H., Novershtern, N.**, 2020a, « Role of m6A in Embryonic Stem Cell Differentiation and in Gametogenesis », *Epigenomes*, 4, 1, p. 5, doi: 10.3390/epigenomes4010005.

**Lasman, L., Krupalnik, V., Viukov, S., Mor, N., Aguilera-castrejon, A., Schneir, D., Bayerl, J., Mizrahi, O., Peles, S., Tawil, S., Sathe, S., Nachshon, A., Shani, T., Zerbib, M., Kilimnik, I., Aigner, S., Shankar, A., Mueller, J.R., Schwartz, S., Stern-ginossar, N., Yeo, G.W., Geula, S., Novershtern, N., Hanna, J.H.**, 2020b, « Context-dependent functional compensation between Ythdf m 6 A reader proteins », *Genes & Development*, 34, p. 1- 19, doi: 10.1101/gad.340695.120.

**Law, J.A., Jacobsen, S.E.**, 2010, « Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals », *Nature Reviews Genetics*, 11, 3, p. 204- 220, doi: 10.1038/nrg2719.

**Lee, J.H., Hart, S.R.L., Skalnik, D.G.**, 2004, « Histone Deacetylase Activity Is Required for Embryonic Stem Cell Differentiation », *Genesis*, 38, 1, p. 32- 38, doi: 10.1002/gene.10250.

**Lee, K.W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.H.**, 2013, « Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *tigriopus japonicus* », *Environmental Science and Technology*, 47, 19, p. 11278- 11283, doi: 10.1021/es401932b.

**Lee, Y., Choe, J., Park, O.H., Kim, Y.K.**, 2020, « Molecular Mechanisms Driving mRNA Degradation by m6A Modification », *Trends in Genetics*, 36, 3, p. 177- 188, doi: 10.1016/j.tig.2019.12.007.

**Leismann, J., Spagnuolo, M., Pradhan, M., Wacheul, L., Vu, M.A., Musheev, M., Mier, P., Andrade- Navarro, M.A., Graille, M., Niehrs, C., Lafontaine, D.L., Roignant, J.**, 2020, « The 18S ribosomal RNA m 6 A methyltransferase Mettl5 is required for normal walking behavior in *Drosophila* », *EMBO reports*, 21, 7, p. 1- 12, doi: 10.15252/embr.201949443.

**Lelong, C., Mathieu, M., Favrel, P.**, 2000, « Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor- $\beta$  supwrfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas* », *European Journal of Biochemistry*, 267, 13, p. 3986- 3993, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01432.x.



## Bibliographie

- Lence, T., Akhtar, J., Bayer, M., Schmid, K., Spindler, L., Ho, C.H., Kreim, N., Andrade-Navarro, M.A., Poeck, B., Helm, M., Roignant, J.Y.**, 2016, « M6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila* », *Nature*, 540, 7632, p. 242- 247, doi: 10.1038/nature20568.
- Lence, T., Paolantoni, C., Worpenberg, L., Roignant, J.Y.**, 2019, « Mechanistic insights into m6A RNA enzymes », *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 3, p. 222- 229, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.10.014.
- Lence, T., Soller, M., Roignant, J.Y.**, 2017, « A fly view on the roles and mechanisms of the m6A mRNA modification and its players », *RNA Biology*, 14, 9, p. 1232- 1240, doi: 10.1080/15476286.2017.1307484.
- Levis, R., Penman, S.**, 1978, « 5'-Terminal structures of poly(A)<sup>+</sup> cytoplasmic messenger RNA and of poly(A)<sup>+</sup> and poly(A)<sup>-</sup> heterogeneous nuclear RNA of cells of the dipteran *Drosophila melanogaster* », *Journal of Molecular Biology*, 120, 4, p. 487- 515, doi: 10.1016/0022-2836(78)90350-9.
- Lewis, A.M., Coates, L.N., Turner, A.D., Percy, L., Lewis, J.**, 2018, « A review of the global distribution of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) and comments on ecology and associated paralytic shellfish toxin profiles, with a focus on Northern Europe », *Journal of Phycology*, 54, 5, p. 581- 598, doi: 10.1111/jpy.12768.
- Lewis, E.B.**, 1978, « A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* », *Nature*, 276, 5688, p. 565- 570, doi: 10.1038/276565a0.
- Li, B., Wang, X., Li, Z., Lu, C., Zhang, Q., Chang, L., Li, W., Cheng, T., Xia, Q., Zhao, P.**, 2019, « Transcriptome-wide analysis of N6-methyladenosine uncovers its regulatory role for gene expression in lepidopteran *Bombyx mori* », *Insect Molecular Biology*, 28, 5, p. imb.12584, doi: 10.1111/imb.12584.
- Li, B., Ruotti, V., Stewart, R.M., Thomson, J.A., Dewey, C.N.**, 2010, « RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty », *Bioinformatics*, 26, 4, p. 493- 500, doi: 10.1093/bioinformatics/btp692.
- Li, D., Cai, L., Meng, R., Feng, Z., Xu, Q.**, 2020a, « METTL3 Modulates Osteoclast Differentiation and Function by Controlling RNA Stability and Nuclear Export », *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5, p. 1660, doi: 10.3390/ijms21051660.
- Li, D., Zhu, X., Li, Y., Zeng, X.**, 2020b, « Novel insights into the roles of RNA N6-methyladenosine modification in regulating gene expression during environmental exposures », *Chemosphere*, 261, 46, p. 127757, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127757.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R.**, 1993, « Role for DNA methylation in genomic imprinting », *Nature*, 366, 6453, p. 362- 365, doi: 10.1038/366362a0.
- Li, H., Yu, H., Li, Q.**, 2021, « Striated myosin heavy chain gene is a crucial regulator of larval myogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas* », *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, p. 388- 397, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.022.
- Li, J., Zhang, Y., Xiang, Z., Xiao, S., Yu, F., Yu, Z.**, 2013, « High mobility group box 1 can enhance NF- $\kappa$ B activation and act as a pro-inflammatory molecule in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 1, p. 63- 70,

## Bibliographie

doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.001.

**Li, X., Yang, J., Zhu, Y., Liu, Y., Shi, X., Yang, G.**, 2016a, « Mouse maternal high-fat intake dynamically programmed mRNA m6A modifications in adipose and skeletal muscle tissues in offspring », *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 8, p. 1- 9, doi: 10.3390/ijms17081336.

**Li, X., Xiong, X., Wang, K., Wang, L., Shu, X., Ma, S., Yi, C.**, 2016b, « Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N1-methyladenosine methylome », *Nature Chemical Biology*, 12, 5, p. 311- 316, doi: 10.1038/nchembio.2040.

**Li, Y., Bedi, R.K., Moroz-Omori, E. V., Cafilisch, A.**, 2020c, « Structural and Dynamic Insights into Redundant Function of YTHDF Proteins », *Journal of Chemical Information and Modeling*, p. 0- 3, doi: 10.1021/acs.jcim.0c01029.

**Li, Y., Xia, L., Tan, K., Ye, X., Zuo, Z., Li, M., Xiao, R., Wang, Z., Liu, X., Deng, M., Cui, J., Yang, M., Luo, Q., Liu, S., Cao, X., Zhu, H., Liu, T., Hu, J., Shi, J., Xiao, S., Xia, L.**, 2020d, « N 6-Methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H3K9me2 », *Nature Genetics*, 52, 9, p. 870- 877, doi: 10.1038/s41588-020-0677-3.

**Lieberman, N., O’Brown, Z.K., Earl, A.S., Boulias, K., Gerashchenko, M. V., Wang, S.Y., Fritsche, C., Fady, P.E., Dong, A., Gladyshev, V.N., Greer, E.L.**, 2020, « N6-adenosine methylation of ribosomal RNA affects lipid oxidation and stress resistance », *Science Advances*, 6, 17, doi: 10.1126/sciadv.aaz4370.

**Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., Gregory, R.I.**, 2016, « The m 6 A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells », *Molecular Cell*, 62, 3, p. 335- 345, doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.021.

**Lin, X., Chai, G., Wu, Y., Li, J., Chen, F., Liu, J., Luo, G., Tauler, J., Du, J., Lin, S., He, C., Wang, H.**, 2019, « RNA m 6 A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail », *Nature Communications*, 10, 1, doi: 10.1038/s41467-019-09865-9.

**Linder, B., Grozhik, A. V, Olarerin-George, A.O., Meydan, C., Mason, C.E., Jaffrey, S.R.**, 2015, « Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome », *Nature Methods*, 12, 8, p. 767- 772, doi: 10.1038/nmeth.3453.

**Litholdo, C.G., Bousquet-Antonelli, C.**, 2019, « Chemical RNA Modifications: The Plant Epitranscriptome », dans *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, Cham, Springer International Publishing, p. 291- 310, Springer International Publishing, Cham, doi: 10.1007/978-3-030-14760-0\_11.

**Liu, G., Wang, J., Hou, X.**, 2020a, « Transcriptome-wide N6-methyladenosine (M6a) methylome profiling of heat stress in pak-choi (*brassica rapa* ssp. *chinensis*) », *Plants*, 9, 9, p. 1- 12, doi: 10.3390/plants9091080.

**Liu, H., Xu, Y., Yao, B., Sui, T., Lai, L., Li, Z.**, 2020b, « A novel N6-methyladenosine (m6A)-dependent fate decision for the lncRNA THOR », *Cell Death and Disease*, 11, 8, doi: 10.1038/s41419-020-02833-y.

## Bibliographie

- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y.Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., He, C.,** 2014a, « A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation », *Nature Chemical Biology*, 10, 2, p. 93- 95, doi: 10.1038/nchembio.1432.
- Liu, J., Dou, X., Chen, C., Chen, C., Liu, C., Xu, M.M., Zhao, S., Shen, B., Gao, Y., Han, D., He, C., Michelle Xu, M., Zhao, S., Shen, B., Gao, Y., Han, D., He, C.,** 2020c, « N6-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription », *Science*, 367, January, p. 580- 586, doi: 10.1126/science.aay6018.
- Liu, M.M., Davey, J.W., Jackson, D.J., Blaxter, M.L., Davison, A.,** 2014b, « A conserved set of maternal genes? Insights from a molluscan transcriptome », *The International Journal of Developmental Biology*, 58, 6-7- 8, p. 501- 511, doi: 10.1387/ijdb.140121ad.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., Pan, T.,** 2015, « N6 - methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions », *Nature*, 518, 7540, p. 560- 564, doi: 10.1038/nature14234.
- Liu, N., Parisien, M., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Pan, T.,** 2013, « Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA », *RNA*, 19, 12, p. 1848- 1856, doi: 10.1261/rna.041178.113.
- Liu, N., Zhou, K.I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., Pan, T.,** 2017, « N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein », *Nucleic Acids Research*, 45, 10, p. 6051- 6063, doi: 10.1093/nar/gkx141.
- Liu, S., Li, Q., Chen, K., Zhang, Q., Li, G., Zhuo, L., Zhai, B., Sui, X., Hu, X., Xie, T.,** 2020d, « The emerging molecular mechanism of m6A modulators in tumorigenesis and cancer progression », *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 127, February, p. 110098, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110098.
- Livneh, I., Moshitch-Moshkovitz, S., Amariglio, N., Rechavi, G., Dominissini, D.,** 2019, « The m6A epitranscriptome: transcriptome plasticity in brain development and function », *Nature Reviews Neuroscience*, doi: 10.1038/s41583-019-0244-z.
- Lockwood, B.L., Julick, C.R., Montooth, K.L.,** 2017, « Maternal loading of a small heat shock protein increases embryo thermal tolerance in *Drosophila melanogaster* », *Journal of Experimental Biology*, 220, 23, p. 4492- 4501, doi: 10.1242/jeb.164848.
- Longwell, A.C., Stiles, S.S.,** 1968, « Fertilization and Completion of Meiosis in Spawned Eggs of the American Oyster, *Crassostrea Virginica* Gmelin », *Caryologia*, 21, 1, p. 65- 73, doi: 10.1080/00087114.1968.10796283.
- Louloupi, A., Ntini, E., Conrad, T., Ørom, U.A.V., Orom, U.A.,** 2018, « Transient N6-methyladenosine Transcriptome sequencing reveals a regulatory role of m6A in splicing efficiency », *bioRxiv*, 23, 12, p. 242966, doi: 10.1101/242966.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S.,** 2014, « Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 », *Genome Biology*, 15, 12, p. 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

## Bibliographie

- Lu, Z., Ma, Y., Li, Q., Liu, E., Jin, M., Zhang, L., Wei, C.**, 2019, « The role of N6-methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*) », *Cell Stress and Chaperones*, 24, 2, p. 333- 342, doi: 10.1007/s12192-018-00965-x.
- Luo, G.Z., Macqueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L.C., Lu, Z., Liu, J., Chen, K., Jia, G., Bergelson, J., He, C.**, 2014, « Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana* », *Nature Communications*, 5, p. 1- 8, doi: 10.1038/ncomms6630.
- Luo, J., Wang, Y., Wang, M., Zhang, L., Peng, H., Zhou, Y., Jia, G., He, Y.**, 2019, « Natural variation in RNA m6A methylation and its relationship with translational status. », *Plant physiology*, p. pp.00987.2019, doi: 10.1104/pp.19.00987.
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., Maleszka, R.**, 2010, « The honey bee epigenomes: Differential methylation of brain DNA in queens and workers », *PLoS Biology*, 8, 11, doi: 10.1371/journal.pbio.1000506.

### -M-

- Ma, C., Chang, M., Lv, H., Zhang, Z.-W.W., Zhang, W., He, X., Wu, G., Zhao, S., Zhang, Y., Wang, D., Teng, X., Liu, C., Li, Q., Klungland, A., Niu, Y., Song, S., Tong, W.-M.M.**, 2018, « RNA m6A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum », *Genome Biology*, 19, 1, p. 68, doi: 10.1186/s13059-018-1435-z.
- Ma, H., Wang, X., Cai, J., Dai, Q., Natchiar, S.K., Lv, R., Chen, K., Lu, Z., Chen, H., Shi, Y.G.Y.Y.G.Y., Lan, F., Fan, J., Klaholz, B.P., Pan, T., Shi, Y.G.Y.Y.G.Y., He, C.**, 2019, « N6-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation », *Nature Chemical Biology*, 15, 1, p. 88- 94, doi: 10.1038/s41589-018-0184-3.
- Madhani, H.D., Bordonné, R., Guthrie, C.**, 1990, « Multiple roles for U6 snRNA in the splicing pathway », *Genes and Development*, 4, 12 B, p. 2264- 2277, doi: 10.1101/gad.4.12b.2264.
- Manakov, S.A., Pezic, D., Marinov, G.K., Pastor, W.A., Sachidanandam, R., Aravin, A.A.**, 2015, « MIWI2 and MILI Have Differential Effects on piRNA Biogenesis and DNA Methylation », *Cell Reports*, 12, 8, p. 1234- 1243, doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.036.
- Manfrin, C., De Moro, G., Torboli, V., Venier, P., Pallavicini, A., Gerdol, M.**, 2012, « Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates », *Invertebrate Survival Journal*, 9, 2, p. 184- 199.
- Manivasagan, P., Kim, S.-K.**, 2015, « An Overview of Harmful Algal Blooms on Marine Organisms », dans *Handbook of Marine Microalgae*, Elsevier, p. 517- 526, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00034-0.
- Mao, Y., Dong, L., Liu, X.M., Guo, J., Ma, H., Shen, B., Qian, S.B.**, 2019, « m6A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2 », *Nature Communications*, 10, 1, p. 1- 11, doi: 10.1038/s41467-019-13317-9.
- Marlétaz, F., Peijnenburg, K.T.C.A., Goto, T., Satoh, N., Rokhsar, D.S.**, 2019, « A



## Bibliographie

- New Spiralian Phylogeny Places the Enigmatic Arrow Worms among Gnathiferans », *Current Biology*, 29, 2, p. 312-318.e3, doi: 10.1016/j.cub.2018.11.042.
- Marshall, D.J., Uller, T.**, 2007, « When is a maternal effect adaptive? », *Oikos*, 116, 12, p. 1957- 1963, doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x.
- Martín-Durán, J.M., Janssen, R., Wennberg, S., Budd, G.E., Hejnol, A.**, 2012, « Deuterostomic development in the protostome *Priapulid caudatus* », *Current Biology*, 22, 22, p. 2161- 2166, doi: 10.1016/j.cub.2012.09.037.
- Martín-Durán, J.M., Marlétaz, F.**, 2020, « Unravelling spiral cleavage », *Development*, 147, 1, p. dev181081, doi: 10.1242/dev.181081.
- Martins, A., Guilhermino, L.**, 2018, « Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus », *Science of the Total Environment*, 631- 632, p. 421- 428, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.054.
- Mat, A.M., Haberkorn, H., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C., Tran, D.**, 2013, « Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum* », *Aquatic Toxicology*, 140- 141, p. 458- 465, doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.008.
- Matova, N., Cooley, L.**, 2001, « Comparative aspects of animal oogenesis », *Developmental Biology*, 231, 2, p. 291- 320, doi: 10.1006/dbio.2000.0120.
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V., Patil, D.P., Linder, B., Pickering, B.F., Vasseur, J.-J., Chen, Q., Gross, S.S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., Jaffrey, S.R.**, 2017, « Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability », *Nature*, 541, 7637, p. 371- 375, doi: 10.1038/nature21022.
- McCormick, M.I.**, 2006, « Mothers matter: Crowding leads to stressed mothers and smaller offspring in marine fish », *Ecology*, 87, 5, p. 1104- 1109, doi: 10.1890/0012-9658(2006)87[1104:MMCLTS]2.0.CO;2.
- McLean, K.W., Whiteley, A.H.**, 1974, « RNA synthesis during the early development of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Experimental Cell Research*, 87, 1, p. 132- 138, doi: 10.1016/0014-4827(74)90534-5.
- Melcer, S., Hezroni, H., Rand, E., Nissim-Rafinia, M., Skoutchi, A., Stewart, C.L., Bustin, M., Meshorer, E.**, 2012, « Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation », *Nature Communications*, 3, May, doi: 10.1038/ncomms1915.
- Mello, D.F., Silva, P.M. Da, Barracco, M.A., Soudant, P., Hégaret, H.**, 2013, « Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes », *Harmful Algae*, 26, p. 45- 51, doi: 10.1016/j.hal.2013.03.003.
- Mendel, M., Chen, K.-M.M., Homolka, D., Gos, P., Pandey, R.R., McCarthy, A.A., Pillai, R.S.**, 2018, « Methylation of Structured RNA by the m6A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development », *Molecular Cell*, 71, 6, p. 986-1000.e11, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.004.
- de Mendoza, A., Hatleberg, W.L., Pang, K., Leininger, S., Bogdanovic, O., Pflueger, J., Buckberry, S., Technau, U., Hejnol, A., Adamska, M., Degnan, B.M.**,

## Bibliographie

- Degnan, S.M., Lister, R.**, 2019, « Convergent evolution of a vertebrate-like methylome in a marine sponge », *Nature Ecology and Evolution*, 3, 10, p. 1464- 1473, doi: 10.1038/s41559-019-0983-2.
- de Mendoza, A., Lister, R., Bogdanovic, O.**, 2020, « Evolution of DNA Methylome Diversity in Eukaryotes », *Journal of Molecular Biology*, 432, 6, p. 1687- 1705, doi: 10.1016/j.jmb.2019.11.003.
- Meng, J., Lu, Z., Liu, H., Zhang, L., Zhang, S., Chen, Y., Rao, M.K., Huang, Y.**, 2014, « A protocol for RNA methylation differential analysis with MeRIP-Seq data and exomePeak R/Bioconductor package », *Methods*, 69, 3, p. 274- 281, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.06.008.
- Meyer, K.D., Patil, D.P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M.A., Elemento, O., Pestova, T. V., Qian, S.B., Jaffrey, S.R.**, 2015, « 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation », *Cell*, 163, 4, p. 999- 1010, doi: 10.1016/j.cell.2015.10.012.
- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., Jaffrey, S.R.**, 2012, « Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons », *Cell*, 149, 7, p. 1635- 1646, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.003.
- Michlewski, G., Cáceres, J.F.**, 2019, « Post-transcriptional control of miRNA biogenesis », *RNA*, 25, 1, p. 1- 16, doi: 10.1261/rna.068692.118.
- Miller, M.E., Hamann, M., Kroon, F.J.**, 2020, « Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: A review and meta-analysis of current data », *PLoS ONE*, 15, 10 October, p. 1- 25, doi: 10.1371/journal.pone.0240792.
- Miossec, L., Le Deuff, R.-M., Gouletquer, P.**, 2009, « Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) », *ICES Cooperative Research Report*, 299, 299, p. 42, Disponible sur: papers3://publication/uuid/17B4CB22-2D42-4215-A830-83769CFC3BA1.
- Mohandas, T., Sparkes, R., Shapiro, L.**, 1981, « Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation », *Science*, 211, 4480, p. 393- 396, doi: 10.1126/science.6164095.
- Le Moigne, A., Foucrier, J.**, 2001, *Biologie du développement*.
- Montavon, T., Soshnikova, N.**, 2014, « Hox gene regulation and timing in embryogenesis », *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 34, p. 76- 84, doi: 10.1016/j.semcd.2014.06.005.
- Moore, L.A., Broihier, H.T., Van Doren, M., Lunsford, L.B., Lehmann, R.**, 1998, « Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila* », *Development*, 125, 4, p. 667- 678.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A.**, 2012, « Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure », *Environmental Science and Technology*, 46, 20, p. 11327- 11335, doi: 10.1021/es302332w.
- Murray, S.A., O'Connor, W.A., Alvin, A., Mihali, T.K., Kalaitzis, J., Neilan, B.A.**,

## Bibliographie

2009, « Differential accumulation of paralytic shellfish toxins from *Alexandrium minutum* in the pearl oyster, *Pinctada imbricata* », *Toxicon*, 54, 3, p. 217- 223, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.04.005.

### -N-

**Narayan, P., Ludwiczak, R.L., Goodwin, E.C., Rottman, F.M.**, 1994, « Context effects on N 6 -adenosine methylation sites in prolactin mRNA », *Nucleic Acids Research*, 22, 3, p. 419- 426, doi: 10.1093/nar/22.3.419.

**Nayler, O., Hartmann, A.M., Stamm, S.**, 2000, « The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment », *Journal of Cell Biology*, 150, 5, p. 949- 961, doi: 10.1083/jcb.150.5.949.

**Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., Dictus, W.J.A.G.**, 2002, « Hedgehog crosses the snail's midline », *Nature*, 417, 6891, p. 811- 812, doi: 10.1038/417811b.

**Ng, R.K., Dean, W., Dawson, C., Lucifero, D., Madeja, Z., Reik, W., Hemberger, M.**, 2008, « Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5 », *Nature Cell Biology*, 10, 11, p. 1280- 1290, doi: 10.1038/ncb1786.

**Ni, W., Yao, S., Zhou, Y., Liu, Y., Huang, P., Zhou, A., Liu, J., Che, L., Li, J.**, 2019, « Long noncoding RNA GAS5 inhibits progression of colorectal cancer by interacting with and triggering YAP phosphorylation and degradation and is negatively regulated by the m6A reader YTHDF3 », *Molecular Cancer*, 18, 1, p. 1- 20, doi: 10.1186/s12943-019-1079-y.

**Nicetto, D., Donahue, G., Jain, T., Peng, T., Sidoli, S., Sheng, L., Montavon, T., Becker, J.S., Grindheim, J.M., Blahnik, K., Garcia, B.A., Tan, K., Bonasio, R., Jenuwein, T., Zaret, K.S.**, 2019, « H3K9me3-heterochromatin loss at protein-coding genes enables developmental lineage specification », *Science*, 363, 6424, p. 294- 297, doi: 10.1126/science.aau0583.

**Nichols, J.L.**, 1979, « N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA », *Plant Science Letters*, 15, 4, p. 357- 361, doi: 10.1016/0304-4211(79)90141-X.

**Nielsen, C.**, 2004, « Trochophora Larvae: Cell-Lineages, Ciliary Bands, and Body Regions. 1. Annelida and Mollusca », *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 302, 1, p. 35- 68, doi: 10.1002/jez.b.20001.

**Nielsen, C.**, 2015, « Larval nervous systems: True larval and precocious adult », *Journal of Experimental Biology*, 218, 4, p. 629- 636, doi: 10.1242/jeb.109603.

**Nora, E.P., Heard, E.**, 2010, « Chromatin structure and nuclear organization dynamics during X-chromosome inactivation », *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, p. 333- 344, doi: 10.1101/sqb.2010.75.032.

### -O-

**Oishi, K., Shirai, H., Ishida, N.**, 2005, « CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome- proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in mice », *Biochemical Journal*, 386, 3, p. 575- 581, doi: 10.1042/BJ20041150.

**Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., Heard, E.**, 2004, « Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation during Early Mouse Development », *Science*, 303, 5658, p. 644- 649, doi: 10.1126/science.1092727.



## Bibliographie

**Olsen, P.H., Ambros, V.**, 1999, « The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation », *Developmental Biology*, 216, 2, p. 671- 680, doi: 10.1006/dbio.1999.9523.

**Onagbesan, O.M., Bruggeman, V., Van As, P., Tona, K., Williams, J., Decuypere, E.**, 2003, « BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7 on granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro », *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285, 5 48-5, p. 973- 983, doi: 10.1152/ajpendo.00104.2003.

**Orban, T.I., Izaurralde, E.**, 2005, « Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome », *Rna*, 11, 4, p. 459- 469, doi: 10.1261/rna.7231505.

### -P-

**Paps, J., Xu, F., Zhang, G., Holland, P.W.H.**, 2015, « Reinforcing the egg-timer: Recruitment of novel Lophotrochozoa homeobox genes to early and late development in the Pacific oyster », *Genome Biology and Evolution*, 7, 3, p. 677- 688, doi: 10.1093/gbe/evv018.

**Park, O.H., Ha, H., Lee, Y., Boo, S.H., Kwon, D.H., Song, H.K., Kim, Y.K.**, 2019, « Endoribonucleolytic Cleavage of m6A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex », *Molecular Cell*, 74, 3, p. 1- 14, doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.034.

**Patil, D.P., Chen, C.K., Pickering, B.F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., Jaffrey, S.R.**, 2016, « m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression », *Nature*, 537, 7620, p. 369- 373, doi: 10.1038/nature19342.

**Patil, D.P., Pickering, B.F., Jaffrey, S.R.**, 2017, « Reading m6A in the Transcriptome: M6A-Binding Proteins », *Trends in Cell Biology*, 28, 2, p. 113- 127, doi: 10.1016/j.tcb.2017.10.001.

**Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albetosa, M., Huvet, A., Soudant, P.**, 2016, « Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation », *Environmental Pollution*, 216, p. 724- 737, doi: 10.1016/j.envpol.2016.06.039.

**Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hégaret, H., Tran, D.**, 2017, « Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum* », *Scientific Reports*, 7, 1, p. 1- 14, doi: 10.1038/s41598-017-03797-4.

**Penaloza, C., Gutierrez, A.P., Eory, L., Wang, S., Guo, X., Archibald, A., Bean, T.P., Houston, R.D.**, 2020, « A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) », p. 1- 28, doi: 10.1101/2020.09.25.313494.

**Penalva, L.O.F., Sánchez, L.**, 2003, « RNA Binding Protein Sex-Lethal (Sxl) and Control of *Drosophila* Sex Determination and Dosage Compensation », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 3, p. 343- 359, doi: 10.1128/mmbr.67.3.343-359.2003.

## Bibliographie

- Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., Tu, B.P., Conrad, N.K.,** 2017, « The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention », *Cell*, 169, 5, p. 824-835.e14, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.003.
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., Brockdorff, N.,** 1996, « Requirement for Xist in X chromosome inactivation », *Nature*, 379, 6561, p. 131- 137, doi: 10.1038/379131a0.
- Perry, R.P., Kelley, D.E., Friderici, K., Rottman, F.,** 1975, « The methylated constituents of L cell messenger RNA: Evidence for an unusual cluster at the 5' terminus », *Cell*, 4, 4, p. 387- 394, doi: 10.1016/0092-8674(75)90159-2.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K.M., Hodgson, J., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W.,** 2006, « Transcriptional elongation of non-coding bxd RNAs promoted by the Trithorax TAC1 complex represses Ubx by a transcriptional interference mechanism », *Cell*, 127, 6, p. 1209- 1221.
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., Pernet, F.,** 2015, « Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* », *Aquaculture Environment Interactions*, 6, 3, p. 205- 222, doi: 10.3354/aei00125.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W., Sontheimer, E.J.,** 2004, « A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila* », *Cell*, 117, 1, p. 83- 94, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00258-2.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R.,** 1998, « The molecular basis of oocyte growth and development », *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 1- 2, p. 27- 37, doi: 10.1016/S0303-7207(98)00166-X.
- Ping, X.-L., Sun, B.-F.F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J.J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S.S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y.G.Y.Y.-G., Dahal, U., Lou, X.-M.M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W.-P.P., Zhu, X.-F.F., Cheng, T., Zhao, Y.-L.L., Wang, X., Danielsen, J.M.R.R., Liu, F., Yang, Y.G.Y.Y.-G.,** 2014, « Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase », *Cell Research*, 24, 2, p. 177- 189, doi: 10.1038/cr.2014.3.
- Pinto, R., Vågbø, C.B., Jakobsson, M.E., Kim, Y., Baltissen, M.P., O'Donohue, M.F., Guzmán, U.H., Małeck, J.M., Wu, J., Kirpekar, F., Olsen, J. V., Gleizes, P.E., Vermeulen, M., Leidel, S.A., Slupphaug, G., Falnes, P.,** 2020, « The human methyltransferase ZCCHC4 catalyses N6-methyladenosine modification of 28S ribosomal RNA », *Nucleic acids research*, 48, 2, p. 830- 846, doi: 10.1093/nar/gkz1147.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., De la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., Zhang, Y.,** 2003, « Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation », *Science*, 300, 5616, p. 131- 135, doi: 10.1126/science.1084274.
- Postlethwait, J.H., Schneiderman, H.A.,** 1971, « Pattern formation and determination in the antenna of the homoeotic mutant *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster* », *Developmental Biology*, 25, 4, p. 606- 640, doi: 10.1016/0012-1606(71)90008-X.
- Potok, M.E., Nix, D.A., Parnell, T.J., Cairns, B.R.,** 2013, « Reprogramming the

## Bibliographie

maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern », *Cell*, 153, 4, p. 759- 772, doi: 10.1016/j.cell.2013.04.030.

**Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A., Vervoort, M.**, 2002, « Phylogenetic Analysis of the *Wnt* Gene Family », *Current Biology*, 12, 16, p. 1395- 1400, doi: 10.1016/s0960-9822(02)01068-0.

### -Q-

**Qi, S.T., Ma, J.Y., Wang, Z.B., Guo, L., Hou, Y., Sun, Q.Y.**, 2016, « N6 - methyladenosine sequencing highlights the involvement of mRNA methylation in oocyte meiotic maturation and embryo development by regulating translation in *Xenopus laevis* », *Journal of Biological Chemistry*, 291, 44, p. 23020- 23026, doi: 10.1074/jbc.M116.748889.

**Le Quéré, H., Herpin, A., Huvet, A., Lelong, C., Favrel, P.**, 2009, « Structural and functional characterizations of an Activin type II receptor orthologue from the pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Gene*, 436, 1- 2, p. 101- 107, doi: 10.1016/j.gene.2009.01.010.

### -R-

**Ramazi, S., Allahverdi, A., Zahiri, J.**, 2020, « Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders », *Journal of Biosciences*, 45, 1, p. 3- 9, doi: 10.1007/s12038-020-00099-2.

**Raz, E.**, 2000, « Minireview The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development », *Genome Biology*, 1, 3, p. 1- 6, doi: 10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017.

**Ren, F., Lin, Q., Gong, G., Du, X., Dan, H., Qin, W., Miao, R., Xiong, Y., Xiao, R., Li, X., Gui, J.F., Mei, J.**, 2020, « *Igf2bp3* maintains maternal RNA stability and ensures early embryo development in zebrafish », *Communications Biology*, 3, 1, p. 1- 10, doi: 10.1038/s42003-020-0827-2.

**Ries, R.J., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B.F., Patil, D.P., Kwak, H., Lee, J.H., Jaffrey, S.R.**, 2019, « m6A enhances the phase separation potential of mRNA », *Nature*, 571, 7765, p. 424- 428, doi: 10.1038/s41586-019-1374-1.

**Rist, S., Baun, A., Hartmann, N.B.**, 2017, « Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction », *Environmental Pollution*, 228, p. 398- 407, doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.048.

**Rivière, G.**, 2014, « Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates », *Frontiers in Physiology*, 5, 129, p. 1- 7, doi: 10.3389/fphys.2014.00129.

**Riviere, G., Fellous, A., Franco, A., Bernay, B., Favrel, P.**, 2011, « A crucial role in fertility for the oyster angiotensin-converting enzyme orthologue *CgACE* », *PLoS ONE*, 6, 12, doi: 10.1371/journal.pone.0027833.

**Riviere, G., He, Y., Tecchio, S., Crowell, E., Sourdain, P., Guo, X., Favrel, P.**,

## Bibliographie

- 2017, « Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development », *PLOS Genetics*, 13, 6, p. 1- 16, doi: /doi.org/10.1371/journal.pgen.1006807 June.
- Riviere, G., Klopp, C., Ibouniyamine, N., Huvet, A., Boudry, P., Favrel, P.**, 2015, « GigaTON: An extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas* », *BMC Bioinformatics*, 16, 1, p. 1- 12, doi: 10.1186/s12859-015-0833-4.
- Riviere, G., Wu, G.-C.C., Fellous, A., Goux, D., Sourdaire, P., Favrel, P.**, 2013, « DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas* », *Marine Biotechnology*, 15, 6, p. 1- 15, doi: 10.1007/s10126-013-9523-2.
- Robbens, S., Rouzé, P., Cock, J.M., Spring, J., Worden, A.Z., Van De Peer, Y.**, 2008, « The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae », *Journal of Molecular Evolution*, 66, 1, p. 80- 84, doi: 10.1007/s00239-007-9059-z.
- Rockwell, A.L., Hongay, C.F.**, 2019, « The m6A Dynamics of Profilin in Neurogenesis », *Frontiers in Genetics*, 10, November, p. 1- 7, doi: 10.3389/fgene.2019.00987.
- Rolton, A., Vignier, J., Volety, A.K., Pierce, R.H., Henry, M., Shumway, S.E., Bricelj, V.M., Hégaret, H., Soudant, P.**, 2016, « Effects of field and laboratory exposure to the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on the reproduction of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and subsequent development of offspring », *Harmful Algae*, 57, p. 13- 26, doi: 10.1016/j.hal.2016.04.011.
- Rondon, R., Grunau, C., Fallet, M., Charlemagne, N., Sussarellu, R., Chaparro, C., Montagnani, C., Mitta, G., Bachère, E., Akcha, F., Cosseau, C.**, 2017, « Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome », *Environmental Epigenetics*, 3, 1, p. 1- 13, doi: 10.1093/eep/dvx004.
- Rong, B., Zhang, Q., Wan, J., Xing, S., Dai, R., Li, Y., Cai, J., Xie, J., Song, Y., Chen, J., Zhang, L., Yan, G., Zhang, W., Gao, H., Han, J.D.J., Qu, Q., Ma, H., Tian, Y., Lan, F.**, 2020, « Ribosome 18S m6A Methyltransferase METTL5 Promotes Translation Initiation and Breast Cancer Cell Growth », *Cell Reports*, 33, 12, p. 108544, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108544.
- Rosani, U., Abbadì, M., Green, T., Bai, C.M., Turolla, E., Arcangeli, G., Wegner, K.M., Venier, P.**, 2020, « Parallel analysis of miRNAs and mRNAs suggests distinct regulatory networks in *Crassostrea gigas* infected by Ostreid herpesvirus 1 », *BMC genomics*, 21, 1, p. 620, doi: 10.1186/s12864-020-07026-7.
- Rosani, U., Pallavicini, A., Venier, P.**, 2016, « The miRNA biogenesis in marine bivalves », *PeerJ*, 2016, 3, doi: 10.7717/peerj.1763.
- Roundtree, I.A., Luo, G.-Z.Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., He, E., Shen, B., He, C.**, 2017, « YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs », *eLife*, 6, p. 1- 28, doi: 10.7554/eLife.31311.
- Rountree, M.R., Selker, E.U.**, 2010, « DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa* », *Heredity*, 105, 1, p. 38- 44, doi: 10.1038/hdy.2010.44.

## Bibliographie

**Ruszkowska, A., Ruszkowski, M., Dauter, Z., Brown, J.A.**, 2018, « Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16 », *Scientific Reports*, 8, 1, p. 1- 13, doi: 10.1038/s41598-018-23608-8.

-S-

**Saffman, E.E., Lasko, P.**, 1999, « Germline development in vertebrates and invertebrates », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 8- 9, p. 1141- 1163, doi: 10.1007/s000180050363.

**Safra, M., Sas-Chen, A., Nir, R., Winkler, R., Nachshon, A., Bar-Yaacov, D., Erlacher, M., Rossmanith, W., Stern-Ginossar, N., Schwartz, S.**, 2017, « The m1A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution », *Nature*, 551, 7679, p. 251- 255, doi: 10.1038/nature24456.

**Sai, L., Li, Y., Zhang, Y.Y., Zhang, J., Qu, B., Guo, Q., Han, M., Jia, Q., Yu, G., Li, K., Bo, C., Zhang, Y.Y., Shao, H., Peng, C.**, 2020, « Distinct m6A methylome profiles in poly(A) RNA from *Xenopus laevis* testis and that treated with atrazine », *Chemosphere*, 245, p. 125631, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125631.

**Saint-carlier, E., Riviere, G.**, 2015, « Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate », *FEBS Letters*, 589, 13, p. 1459- 1466, doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.043.

**Saletore, Y., Meyer, K., Korfach, J., Vilfan, I.D., Jaffrey, S., Mason, C.E.**, 2012, « The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications », *Genome Biology*, 13, 10, p. 175, doi: 10.1186/gb-2012-13-10-175.

**Salz, H.K.**, 2011, « Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing », *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 4, p. 395- 400, doi: 10.1016/j.gde.2011.03.001.

**Sánchez Alvarado, A., Newmark, P.A., Robb, S.M.C., Juste, R.**, 2002, « The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration », *Development*, 129, 24, p. 5659- 5665, doi: 10.1242/dev.00167.

**Sankaranarayanan, S., Higashiyama, T.**, 2018, « Capacitation in Plant and Animal Fertilization », *Trends in Plant Science*, 23, 2, p. 129- 139, doi: 10.1016/j.tplants.2017.10.006.

**Santos, F.F., Hendrich, B., Reik, W., Dean, W.**, 2002, « Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo », *developmental Biology*, 241, 1, p. 172- 182, doi: 10.1006/dbio.2001.0501.

**Sasado, T., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M., Naruse, K.**, 2017, « Mutation in *cpsf6/CFIm68* (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor Subunit 6*) causes short 3'UTRs and disturbs gene expression in developing embryos, as revealed by an analysis of primordial germ cell migration using the medaka mutant », *PLoS ONE*, 12, 3, p. 1- 21, doi: 10.1371/journal.pone.0172467.

**Sato, Y., Hilbert, L., Oda, H., Wan, Y., Heddleston, J.M., Chew, T.L., Zaburdaev, V., Keller, P., Lionnet, T., Vastenhouw, N., Kimura, H.**, 2019, « Histone H3K27 acetylation precedes active transcription during zebrafish zygotic genome activation



## Bibliographie

as revealed by live-cell analysis », *Development (Cambridge)*, 146, 19, doi: 10.1242/dev.179127.

**Schöller, E., Weichmann, F., Treiber, T., Ringle, S., Treiber, N., Flatley, A., Feederle, R., Bruckmann, A., Meister, G.**, 2018, « Interactions, localization and phosphorylation of the m6A generating METTL3-METTL14-WTAP complex. », *RNA (New York, N.Y.)*, 24, 4, p. rna.064063.117, doi: 10.1261/rna.064063.117.

**Scholtz, G., Wolff, C.**, 2013, « Arthropod Embryology: Cleavage and Germ Band Development », dans *Arthropod Biology and Evolution*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, p. 63- 89, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-36160-9\_4.

**Schumann, U., Zhang, H.N., Sibbritt, T., Pan, A., Horvath, A., Gross, S., Clark, S.J., Yang, L., Preiss, T.**, 2020, « Multiple links between 5-methylcytosine content of mRNA and translation », *BMC Biology*, 18, 1, p. 1- 23, doi: 10.1186/s12915-020-00769-5.

**Schütt, C., Nöthiger, R.**, 2000, « Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects », *Development*, 127, 4, p. 667- 677.

**Schwartz, S.**, 2018, « M<sup>1</sup>A within cytoplasmic mRNAs at single nucleotide resolution: A reconciled transcriptome-wide map », *Rna*, 24, 11, p. 1427- 1436, doi: 10.1261/rna.067348.118.

**Schwartz, S., Agarwala, S.D., Mumbach, M.R., Jovanovic, M., Mertins, P., Shishkin, A., Tabach, Y., Mikkelsen, T.S., Satija, R., Ruvkun, G., Carr, S.A., Lander, E.S., Fink, G.R., Regev, A.**, 2013, « High-Resolution Mapping Reveals a Conserved, Widespread, Dynamic mRNA Methylation Program in Yeast Meiosis », *Cell*, 155, 6, p. 1409- 1421, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.047.

**Schwartz, S., Mumbach, M.R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G.G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N.E., Freinkman, E., Pacold, M.E., Satija, R., Mikkelsen, T.S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S.A., Lander, E.S., Regev, A.**, 2014, « Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites », *Cell Reports*, 8, 1, p. 284- 296, doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.048.

**Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J.**, 2003, « Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection », *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 7, p. 383- 406, doi: 10.1007/s10295-003-0074-9.

**Sendinc, E., Valle-Garcia, D., Jiao, A., Shi, Y.**, 2020, « Analysis of m6A RNA methylation in *Caenorhabditis elegans* », *Cell Discovery*, 6, 1, doi: 10.1038/s41421-020-00186-6.

**Seo, K.W., Kleiner, R.E.**, 2019, « YTHDF2 Recognition of N<sup>1</sup>-Methyladenosine (m<sup>1</sup>A)-Modified RNA Is Associated with Transcript Destabilization », *ACS Chemical Biology*, p. acschembio.9b00655, doi: 10.1021/acschembio.9b00655.

**Shah, A., Rashid, F., Awan, H.M., Hu, S., Wang, X., Chen, L., Shan, G.**, 2017, « The DEAD-Box RNA Helicase DDX3 Interacts with m6A RNA Demethylase ALKBH5 », *Stem Cells International*, 2017, p. 27- 29, doi: 10.1155/2017/8596135.

**Shen, L., Liang, Z., Gu, X., Chen, Y., Teo, Z.W.N., Hou, X., Cai, W.M., Dedon,**

## Bibliographie

- P.C., Liu, L., Yu, H.**, 2016, « N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in *Arabidopsis* », *Developmental Cell*, 38, 2, p. 186- 200, doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.008.
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B.S., Ma, H., Hsu, P.J., Liu, C., He, C.**, 2017, « YTHDF3 facilitates translation and decay of N 6-methyladenosine-modified RNA », *Cell Research*, 27, 3, p. 315- 328, doi: 10.1038/cr.2017.15.
- Shibata, N., Kashima, M., Ishiko, T., Nishimura, O., Rouhana, L., Misaki, K., Yonemura, S., Saito, K., Siomi, H., Siomi, M.C., Agata, K.**, 2016, « Inheritance of a Nuclear PIWI from Pluripotent Stem Cells by Somatic Descendants Ensures Differentiation by Silencing Transposons in Planarian », *Developmental Cell*, 37, 3, p. 226- 237, doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.009.
- Shima, H., Matsumoto, M., Ishigami, Y., Ebina, M., Muto, A., Sato, Y., Kumagai, S., Ochiai, K., Suzuki, T., Igarashi, K.**, 2017, « S -Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N 6 -Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1 », *Cell Reports*, 21, 12, p. 3354- 3363, doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.092.
- Shimba, S., Bokar, J.A., Rottman, F., Reddy, R.**, 1995, « Accurate and efficient N -6-adenosine methylation in spliceosomal U6 small Nuclear RNA by HeLa cell extract in vitro », *Nucleic Acids Research*, 23, 13, p. 2421- 2426, doi: 10.1093/nar/23.13.2421.
- Śledź, P., Jinek, M.**, 2016, « Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex », *eLife*, 5, September, p. 1- 16, doi: 10.7554/eLife.18434.
- Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieland, J.A.F.O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., Agami, R.**, 2017, « Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation », *Cell*, 169, 2, p. 326-337.e12, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.031.
- Smayda, T.J.**, 1997, « Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea », *Limnology and Oceanography*, 42, 5 II, p. 1137- 1153, doi: 10.4319/lo.1997.42.5\_part\_2.1137.
- Sneider, T.W., Teague, W.M., Rogachevsky, L.M.**, 1975, « S-adenosylmethionine: Dna-cytosine 5-methyltransferase from a novikoff rat hepatoma cell line », *Nucleic Acids Research*, 2, 10, p. 1685- 1700, doi: 10.1093/nar/2.10.1685.
- Sogard, S.M., Berkeley, S.A., Fisher, R.**, 2008, « Maternal effects in rockfishes *Sebastes spp.*: A comparison among species », *Marine Ecology Progress Series*, 360, p. 227- 236, doi: 10.3354/meps07468.
- Soldano, A., Worpenberg, L., Paolantoni, C., Longhi, S., Miriam, M.**, 2020, « The m6A reader Ythdf restricts axonal growth in *Drosophila* through target selection modulation of the Fragile X mental », *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.04.976886.
- Solnica-Krezel, L.**, 2005, « Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation », *Current Biology*, 15, 6, p. 213- 228, doi: 10.1016/j.cub.2005.03.016.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G.**, 2007, « New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease », *Molecular Cell*, 28, 5, p. 721- 729, doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.018.



## Bibliographie

**Song, J., Yi, C.**, 2020, « Reading Chemical Modifications in the Transcriptome », *Journal of Molecular Biology*, 432, 6, p. 1824- 1839, doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.006.

**Stricker, S.A.**, 1999, « Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals », *Developmental Biology*, 211, 2, p. 157- 176, doi: 10.1006/dbio.1999.9340.

**Sui, X., Hu, Y., Ren, C., Cao, Q., Zhou, S., Cao, Y., Li, M., Shu, W., Huo, R.**, 2020, « METTL3-mediated m6A is required for murine oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition », *Cell Cycle*, 19, 4, p. 391- 404, doi: 10.1080/15384101.2019.1711324.

**Sun, L., Fazal, F.M., Li, P., Broughton, J.P., Lee, B., Tang, L., Huang, W., Kool, E.T., Chang, H.Y., Zhang, Q.C.**, 2019, « RNA structure maps across mammalian cellular compartments », *Nature Structural & Molecular Biology*, 26, 4, p. 322- 330, doi: 10.1038/s41594-019-0200-7.

**Sun, W., Feng, J.**, 2018, « Differential lncRNA expression profiles reveal the potential roles of lncRNAs in antiviral immune response of *Crassostrea gigas* », *Fish and Shellfish Immunology*, 81, May, p. 233- 241, doi: 10.1016/j.fsi.2018.07.032.

**Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., Riviere, G., Rivière, G.**, 2018, « Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos », *Aquatic Toxicology*, 196, p. submitted, doi: 10.1016/j.aquatox.2018.01.001.

**Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Goïc, N. Le, Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A.**, 2016, « Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 9, p. 2430- 2435, doi: 10.1073/pnas.1519019113.

**Suzuki, M.M., Kerr, A.R.W., De Sousa, D., Bird, A.**, 2007, « CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome », *Genome Research*, 17, 5, p. 625- 631, doi: 10.1101/gr.6163007.

**Swalla, B.J.**, 2006, « Building divergent body plans with similar genetic pathways », *Heredity*, 97, 3, p. 235- 243, doi: 10.1038/sj.hdy.6800872.

## -T-

**Tadros, W., Lipshitz, H.D.**, 2009, « The maternal-to-zygotic transition : a play in two acts », *Development*, 136, 18, p. 3033- 3042, doi: 10.1242/dev.033183.

**Tallec, K., Paul-Pont, I., Petton, B., Alunno-Bruscia, M., Bourdon, C., Bernardini, I., Boulais, M., Lambert, C., Quéré, C., Bideau, A., Le Goïc, N., Cassone, A.-L., Le Grand, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A.**, 2021, « Amino-nanopolystyrene exposures of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos induced no apparent intergenerational effects », *Nanotoxicology*, p. 1- 17, doi: 10.1080/17435390.2021.1879963.

**Tan, S., Huan, P., Liu, B.**, 2017, « Expression patterns indicate that BMP2/4 and Chordin, not BMP5-8 and Gremlin, mediate dorsal–ventral patterning in the mollusk *Crassostrea gigas* », *Development Genes and Evolution*, 227, 2, p. 75- 84, doi:

## Bibliographie

10.1007/s00427-016-0570-3.

**Tan, S., Huan, P., Liu, B.**, 2018, « An investigation of oyster TGF- $\beta$  receptor genes and their potential roles in early molluscan development », *Gene*, 663, April, p. 65- 71, doi: 10.1016/j.gene.2018.04.035.

**Tang, C., Klukovich, R., Peng, H., Wang, Z., Yu, T., Zhang, Y., Zheng, H., Klungland, A., Yan, W.**, 2017, « ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 2, p. 201717794, doi: 10.1073/pnas.1717794115.

**Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I.**, 2008, « MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation », *Nature*, 455, 7216, p. 1124- 1128, doi: 10.1038/nature07299.

**Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., Wang, Q.**, 2020, « Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas* », *Environmental Pollution*, 269, p. 116169, doi: 10.1016/j.envpol.2020.116169.

**Thomas, M., Jon, B., Craig, S., Edward, R., Ruth, H., John, B., Dick, V.A., Heather, L.A., Matthew, S.**, 2020, « The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters », *Heliyon*, 6, 1, p. e03103, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e03103.

**Thomas, Y., Cassou, C., Gernez, P., Pouvreau, S.**, 2018, « Oysters as sentinels of climate variability and climate change in coastal ecosystems », *Environmental Research Letters*, 13, 10, doi: 10.1088/1748-9326/aae254.

**Di Timoteo, G., Dattilo, D., Centrón-Broco, A., Colantoni, A., Guarnacci, M., Rossi, F., Incarnato, D., Oliviero, S., Fatica, A., Morlando, M., Bozzoni, I.**, 2020, « Modulation of circRNA Metabolism by m6A Modification », *Cell Reports*, 31, 6, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107641.

**Toonen, R.J., Pawlik, J.R.**, 2001, « Foundations of gregariousness: A dispersal polymorphism among the planktonic larvae of a marine invertebrate », *Evolution*, 55, 12, p. 2439- 2454, doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00759.x.

**Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J.C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P.**, 2015, « The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas* », *Aquatic Toxicology*, 158, p. 41- 49, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.023.

**Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C.**, 2010, « Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum* », *Aquaculture*, 298, 3- 4, p. 338- 345, doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.030.

**Van Tran, N., Ernst, F.G.M., Hawley, B.R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K.E., Bohnsack, M.T., Jaffrey, S.R., Graille, M., Lafontaine, D.L.J.**, 2019, « The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112 », *Nucleic Acids Research*, 47, 15, p. 7719- 7733, doi:

## Bibliographie

10.1093/nar/gkz619.

**Trixl, L., Lusser, A.**, 2019, « The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark », *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10, 1, p. 1- 17, doi: 10.1002/wrna.1510.

### -U-

**Urist, M.R.**, 1965, « Bone: Formation by Autoinduction », *Science*, 150, 3698, p. 893- 899, doi: 10.1126/science.150.3698.893.

### -V-

**Valentine, J.W.**, 1997, « Cleavage patterns and the topology of the metazoan tree of life », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 15, p. 8001- 8005, doi: 10.1073/pnas.94.15.8001.

**Vastenhouw, N.L., Cao, W.X., Lipshitz, H.D.**, 2019, « The maternal-to-zygotic transition revisited », *Development (Cambridge, England)*, 146, 11, doi: 10.1242/dev.161471.

**Vogeler, S., Bean, T.P., Lyons, B.P., Galloway, T.S.**, 2016, « Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development », *BMC Developmental Biology*, 16, 1, p. 33, doi: 10.1186/s12861-016-0129-6.

### -W-

**Waku, T., Nakajima, Y., Yokoyama, W., Nomura, N., Kako, K., Kobayashi, A., Shimizu, T., Fukamizu, A.**, 2016, « NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner », *Journal of Cell Science*, 129, 12, p. 2382- 2393, doi: 10.1242/jcs.183723.

**Wan, Y., Tang, K., Zhang, D., Xie, S., Zhu, X., Wang, Z., Lang, Z.**, 2015, « Transcriptome-wide high-throughput deep m6A-seq reveals unique differential m6A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana* », *Genome Biology*, 16, 1, p. 1- 26, doi: 10.1186/s13059-015-0839-2.

**Wang, L., Liang, Y., Lin, R., Xiong, Q., Yu, P., Ma, J., Cheng, M., Han, H., Wang, X., Wang, G., Liang, F., Pei, Z., Chen, D., Yuan, Q., Jiang, Y.-Z.Z., Lin, S.**, 2020a, « Mettl5 mediated 18S rRNA N6-methyladenosine (m6A) modification controls stem cell fate determination and neural function », *Genes and Diseases*, xxxx, p. 4- 10, doi: 10.1016/j.gendis.2020.07.004.

**Wang, M., Xiao, Y., Li, Y., Wang, X., Qi, S., Wang, Y., Zhao, L., Wang, K., Peng, W., Luo, G.-Z., Xue, X., Jia, G., Wu, L.**, 2021, « RNA m6A Modification Functions in Larval Development and Caste Differentiation in Honeybee (*Apis mellifera*) », *Cell Reports*, 34, 1, p. 108580, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108580.

**Wang, P., Doxtader, K.A., Nam, Y.**, 2016a, « Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases », *Molecular Cell*, 63, 2, p. 306- 317, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.041.

**Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., Gong, Z., Wang, Q., Huang, J., Tang, C., Zou, T., Yin, P.**, 2016b, « Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex », *Nature*, 534, 7608, p. 575- 578, doi: 10.1038/nature18298.

## Bibliographie

- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., He, C., Zhike, L., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., He, C.,** 2014a, « N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability », *Nature*, *505*, 7481, p. 117- 120, doi: 10.1038/nature12730.
- Wang, X., Zhao, B.S., Roundtree, I.A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., He, C.,** 2015, « N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency », *Cell*, *161*, 6, p. 1388- 1399, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014.
- Wang, X., Li, Q., Lian, J., Li, L., Jin, L., Cai, H., Xu, F., Qi, H., Zhang, L., Wu, F., Meng, J., Que, H., Fang, X., Guo, X., Zhang, G.,** 2014b, « Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation », *BMC Genomics*, *15*, 1119, p. 1- 11, doi: 10.1186/1471-2164-15-1119.
- Wang, Y., Li, Y., Toth, J.I., Petroski, M.D., Zhang, Z., Zhao, J.C.,** 2014c, « N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells », *Nature Cell Biology*, *16*, 2, p. 191- 198, doi: 10.1038/ncb2902.
- Wang, Y., Li, Y., Yue, M., Wang, J., Kumar, S., Wechsler-Reya, R.J., Zhang, Z., Ogawa, Y., Kellis, M., Duyster, G., Zhao, J.C.,** 2018, « N 6-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications », *Nature Neuroscience*, *21*, 2, p. 195- 206, doi: 10.1038/s41593-017-0057-1.
- Wang, Y., Zhang, L., Ren, H., Guo, J., Mao, D., Yan, D.,** 2020b, « Role of Hakai in m6A modification pathway in *Drosophila* », *Research square*, p. 1- 26, doi: 10.21203/rs.3.rs-47812/v1.
- Warda, A.S., Kretschmer, J., Hackert, P., Lenz, C., Urlaub, H., Höbartner, C., Sloan, K.E., Bohnsack, M.T.,** 2017, « Human METTL16 is a N 6 - methyladenosine (m6A) methyltransferase that targets pre- mRNAs and various non- coding RNAs », *EMBO reports*, *18*, 11, p. e201744940, doi: 10.15252/embr.201744940.
- Wasson, J.A., Simon, A.K., Myrick, D.A., Wolf, G., Driscoll, S., Pfaff, S.L., Macfarlan, T.S., Katz, D.J.,** 2016, « Maternally provided LSD1/KDM1A enables the maternal-to-zygotic transition and prevents defects that manifest postnatally », *eLife*, *5*, JANUARY2016, p. 1- 25, doi: 10.7554/eLife.08848.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M.A., Sakaki, Y., Sasaki, H.,** 2008, « Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes », *Nature*, *453*, 7194, p. 539- 543, doi: 10.1038/nature06908.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D.,** 2007, « Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome », *Nature Genetics*, *39*, 4, p. 457- 466, doi: 10.1038/ng1990.
- Wei, C.M., Gershowitz, A., Moss, B.,** 1976, « 5'-Terminal and Internal Methylated Nucleotide Sequences in Hela Cell mRNA », *Biochemistry*, *15*, 2, p. 397- 401, doi: 10.1021/bi00647a024.

## Bibliographie

- Wei, T., Simko, V.**, 2017, « R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix »,.
- Weick, E.M., Miska, E.A.**, 2014, « piRNAs: From biogenesis to function », *Development (Cambridge)*, 141, 18, p. 3458- 3471, doi: 10.1242/dev.094037.
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., Hanna, J.H.**, 2016, « Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 3, p. 155- 169, doi: 10.1038/nrm.2015.28.
- Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C.C., Wang, J., Jiao, F., Liu, H., Yang, P., Tan, L., Lan, F., Shi, Y.G.Y., He, C.C., Shi, Y.G.Y., Diao, J.**, 2018, « Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m6A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal », *Molecular Cell*, 69, 6, p. 1028-1038.e6, doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.015.
- Wojtas, M.N., Pandey, R.R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., Pillai, R.S.**, 2017, « Regulation of m6A Transcripts by the 3'→5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline », *Molecular Cell*, 68, 2, p. 374-387.e12, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.021.
- Wu, B., Su, S., Patil, D.P., Liu, H., Gan, J., Jaffrey, S.R., Ma, J.**, 2018a, « Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1 », *Nature Communications*, 9, 1, doi: 10.1038/s41467-017-02770-z.
- Wu, J., Frazier, K., Gan, Z., Wang, T., Zhang, J., Gan, Z., Wang, T., Zhong, X.**, 2019a, « Emerging role of m 6 A RNA methylation in nutritional physiology and metabolism », *Obesity Reviews*, August, p. 1- 10, doi: 10.1111/obr.12942.
- Wu, R., Li, A., Sun, B., Sun, J.-G.G., Zhang, J., Zhang, T., Chen, Y., Xiao, Y., Gao, Y., Zhang, Q., Ma, J., Yang, X., Liao, Y., Lai, W.-Y.Y., Qi, X., Wang, S., Shu, Y., Wang, H.-L.L., Wang, F., Yang, Y.-G.G., Yuan, Z.**, 2018b, « A novel m6A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination », *Cell Research*, 29, October, p. 23- 41, doi: 10.1038/s41422-018-0113-8.
- Wu, R., Liu, Y., Zhao, Y., Bi, Z., Yao, Y., Liu, Q., Wang, F., Wang, Y., Wang, X.**, 2019b, « m 6 A methylation controls pluripotency of porcine induced pluripotent stem cells by targeting SOCS3/JAK2/STAT3 pathway in a YTHDF1/YTHDF2-orchestrated manner », *Cell Death and Disease*, 10, 3, doi: 10.1038/s41419-019-1417-4.
- Wu, Y., Yang, X., Chen, Z., Tian, L., Jiang, G., Chen, F., Li, J., An, P., Lu, L., Luo, N., Du, J., Shan, H., Liu, H., Wang, H.**, 2019c, « M 6 A-induced lncRNA RP11 triggers the dissemination of colorectal cancer cells via upregulation of Zeb1 », *Molecular Cancer*, 18, 1, p. 1- 16, doi: 10.1186/s12943-019-1014-2.
- Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F., Barlow, D.P.**, 1997, « Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island », *Nature*, 389, 6652, p. 745- 749, doi: 10.1038/39631.

-X-

**Xiang, Y., Laurent, B., Hsu, C., Nachtergaele, S., Lu, Z., Sheng, W., Xu, C., Chen, H., Ouyang, J., Wang, S., Ling, D., Hsu, P., Zou, L., Jambhekar, A., He, C.**, 2017, « m6A RNA methylation regulates the UV-induced DNA damage response », *Nature*,



## Bibliographie

543, 7646, p. 573- 576, doi: 10.1038/nature21671.m.

**Xiao, S., Cao, S., Huang, Q., Xia, L., Deng, M., Yang, M., Jia, G., Liu, X., Shi, J., Wang, W., Li, Y., Liu, S., Zhu, H., Tan, K., Luo, Q., Zhong, M., He, C., Xia, L.,** 2019, « The RNA N6-methyladenosine modification landscape of human fetal tissues », *Nature Cell Biology*, 21, 5, p. 651- 661, doi: 10.1038/s41556-019-0315-4.

**Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wang, X.-J.X.X.-J., Ma, H.-L., Huang, C.-M., Yang, Y.Y.-G., Huang, N., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Zhou, Q., Wang, X.-J.X.X.-J., Zhao, Y.-L., Yang, Y.Y.-G.,** 2016, « Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing », *Molecular Cell*, 61, 4, p. 507- 519, doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.012.

**Xing, M., Liu, Q., Mao, C., Zeng, H., Zhang, X., Zhao, S., Chen, L., Liu, M., Shen, B., Guo, X., Ma, H., Chen, H., Zhang, J.,** 2020, « The 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 promotes mouse embryonic stem cell differentiation », *EMBO reports*, 21, 10, p. 1- 15, doi: 10.15252/embr.201949863.

**Xu, B., Liu, D., Wang, Z., Tian, R., Zuo, Y.,** 2020, « Multi-substrate selectivity based on key loops and non-homologous domains: new insight into ALKBH family », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 0123456789, doi: 10.1007/s00018-020-03594-9.

**Xu, C., Wang, X., Liu, K., Roundtree, I.A., Tempel, W., Li, Y., Lu, Z., He, C., Min, J.,** 2014a, « Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain », *Nature Chemical Biology*, 10, 11, p. 927- 929, doi: 10.1038/nchembio.1654.

**Xu, F., Wang, X., Feng, Y., Huang, W., Wang, W., Li, L., Fang, X., Que, H., Zhang, G.,** 2014b, « Identification of conserved and novel microRNAs in the pacific oyster *Crassostrea gigas* by deep sequencing », *PLoS ONE*, 9, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0104371.

**Xu, R., Li, Q., Yu, H., Kong, L.,** 2018, « Oocyte maturation and origin of the germline as revealed by the expression of Nano s-like in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Gene*, 663, April, p. 41- 50, doi: 10.1016/j.gene.2018.04.021.

**Xu, W., Li, J., He, C., Wen, J., Ma, H., Rong, B., Diao, J., Wang, L., Wang, J., Wu, F., Tan, L., Shi, Y.G., Shi, Y., Shen, H.,** 2021, « METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells », *Nature*, doi: 10.1038/s41586-021-03210-1.

**Xu, X., Li, G., Li, C., Zhang, J., Wang, Q., Simmons, D.K., Chen, X., Wijesena, N., Zhu, W., Wang, Z., Wang, Z., Ju, B., Ci, W., Lu, X., Yu, D., Wang, Q.F., Aluru, N., Oliveri, P., Zhang, Y.E., Martindale, M.Q., Liu, J.,** 2019, « Evolutionary transition between invertebrates and vertebrates via methylation reprogramming in embryogenesis », *National Science Review*, 6, 5, p. 993- 1003, doi: 10.1093/nsr/nwz064.

## -Y-

**Yang, L., Fu, J., Zhou, Y.,** 2018a, « Circular RNAs and Their Emerging Roles in Immune Regulation », *Frontiers in immunology*, 9, December, p. 2977, doi: 10.3389/fimmu.2018.02977.

**Yang, X., Yang, Y., Sun, B.F., Chen, Y.S., Xu, J.W., Lai, W.Y., Li, A., Wang, X.,**

## Bibliographie

**Bhattacharai, D.P., Xiao, W., Sun, H.Y., Zhu, Q., Ma, H.L., Adhikari, S., Sun, M., Hao, Y.J., Zhang, B., Huang, C.M., Huang, N., Jiang, G. Bin, Zhao, Y.L., Wang, H.L., Sun, Y.P., Yang, Y.G.**, 2017a, « 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m<sup>5</sup>C reader », *Cell Research*, 27, 5, p. 606- 625, doi: 10.1038/cr.2017.55.

**Yang, Y., Hsu, P.J., Chen, Y., Yang, Y.**, 2018b, « Dynamic transcriptomic m<sup>6</sup>A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism », *Cell Research*, 28, 6, p. 616- 624, doi: 10.1038/s41422-018-0040-8.

**Yang, Y., Wang, L., Han, X., Yang, W.-L., Zhang, M., Ma, H.-L., Sun, B.-F., Li, A., Xia, J., Chen, J., Heng, J., Wu, B., Chen, Y.-S., Xu, J.-W., Yang, X., Yao, H., Sun, J., Lyu, C., Wang, H.-L., Huang, Y., Sun, Y.-P., Zhao, Y.-L., Meng, A., Ma, J., Liu, F., Yang, Y.-G.**, 2019, « RNA 5-Methylcytosine Facilitates the Maternal-to-Zygotic Transition by Preventing Maternal mRNA Decay », *Molecular Cell*, p. 1- 15, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.033.

**Yang, Y., Fan, X., Mao, M., Song, X., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Y., Yang, Y., Chen, L.L., Wang, Y., Wong, C.C.L., Xiao, X., Wang, Z.**, 2017b, « Extensive translation of circular RNAs driven by N<sup>6</sup>-methyladenosine », *Cell Research*, 27, 5, p. 626- 641, doi: 10.1038/cr.2017.31.

**Yao, Y., Bi, Z., Wu, R., Zhao, Y., Liu, Y., Liu, Q., Wang, Y., Wang, X.**, 2019, « METTL3 inhibits BMSC adipogenic differentiation by targeting the JAK1/STAT5/C/EBP $\beta$  pathway via an m<sup>6</sup>A- YTHDF2–dependent manner », *The FASEB Journal*, 33, 6, p. 7529- 7544, doi: 10.1096/fj.201802644R.

**Yoon, K.J., Ringeling, F.R., Vissers, C., Jacob, F., Pokrass, M., Jimenez-Cyrus, D., Su, Y., Kim, N.S., Zhu, Y., Zheng, L., Kim, S., Wang, X., Doré, L.C., Jin, P., Regot, S., Zhuang, X., Canzar, S., He, C., Ming, G. li, Song, H.**, 2017, « Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m<sup>6</sup>A Methylation », *Cell*, 171, 4, p. 877-889.e17, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.003.

**Youn, J.Y., Dunham, W.H., Hong, S.J., Knight, J.D.R., Bashkurov, M., Chen, G.I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S.W.M., Angers, S., Morris, Q., Fabian, M., Côté, J.F., Gingras, A.C.**, 2018, « High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies », *Molecular Cell*, 69, 3, p. 517-532.e11, doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.020.

**Yu, H., Zhao, X., Li, Q.**, 2016, « Genome-wide identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster », *Scientific Reports*, 6, 1, p. 20796, doi: 10.1038/srep20796.

**Yu, J., Li, Y., Wang, T., Zhong, X.**, 2018, « Modification of N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylation on heat shock protein expression », *PLOS ONE*, 13, 6, p. e0198604, doi: 10.1371/journal.pone.0198604.

**Yue, C., Li, Q.Q., Yu, H.**, 2018a, « Gonad Transcriptome Analysis of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Identifies Potential Genes Regulating the Sex Determination and Differentiation Process », *Marine Biotechnology*, 20, 2, p. 206- 219, doi: 10.1007/s10126-018-9798-4.

**Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X.**,



## Bibliographie

**Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., He, C., Liu, J.**, 2018b, « VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation », *Cell Discovery*, 4, 1, p. 10, doi: 10.1038/s41421-018-0019-0.

-Z-

**Zaccara, S., Jaffrey, S.R.**, 2020, « A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m6A-Modified mRNA », *Cell*, 181, 7, p. 1582-1595.e18, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.012.

**Zaccara, S., Ries, R.J., Jaffrey, S.R.**, 2019, « Reading, writing and erasing mRNA methylation. », *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20, 10, p. 608- 624, doi: 10.1038/s41580-019-0168-5.

**Zeng, M., Dai, X., Liang, Z., Sun, R., Huang, S., Luo, L., Li, Z.**, 2020, « Critical roles of mRNA m6A modification and YTHDC2 expression for meiotic initiation and progression in female germ cells », *Gene*, 753, 613, p. 144810, doi: 10.1016/j.gene.2020.144810.

**Zeng, Y., Wang, S., Gao, S., Soares, F., Ahmed, M., Guo, H., Wang, M., Hua, J.T., Guan, J., Moran, M.F., Tsao, M.S., He, H.H.**, 2018, « Refined RIP-seq protocol for epitranscriptome analysis with low input materials », *PLoS Biology*, 16, 9, p. 1- 20, doi: 10.1371/journal.pbio.2006092.

**Zhang, C., Fu, J., Zhou, Y.**, 2019a, « A Review in Research Progress Concerning m6A Methylation and Immunoregulation », *Frontiers in Immunology*, 10, April, doi: 10.3389/fimmu.2019.00922.

**Zhang, C., Jeong, C.B., Lee, J.S., Wang, D., Wang, M.**, 2019b, « Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics », *Environmental Science and Technology*, 53, 14, p. 8426- 8436, doi: 10.1021/acs.est.9b02525.

**Zhang, C., Jia, G.**, 2018, « Reversible RNA Modification N<sup>1</sup>-methyladenosine (m<sup>1</sup>A) in mRNA and tRNA », *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16, 3, p. 155- 161, doi: 10.1016/j.gpb.2018.03.003.

**Zhang, C., Chen, Y., Sun, B., Wang, L., Yang, Y.G.Y., Ma, D., Lv, J., Heng, J., Ding, Y., Xue, Y., Lu, X., Xiao, W., Yang, Y.G.Y., Liu, F.**, 2017, « M6A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification », *Nature*, 549, 7671, p. 273- 276, doi: 10.1038/nature23883.

**Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J.**, 2012, « The oyster genome reveals stress adaptation

## Bibliographie

and complexity of shell formation », *Nature*, 490, 7418, p. 49- 54, doi: 10.1038/nature11413.

**Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Hou, C., Chen, C., Chen, C., Guo, Y., Guo, Y., Yuan, W., Yin, D., Liu, J., Sun, Z., Sun, Z.**, 2020a, « The role of N6-methyladenosine (m6A) modification in the regulation of circRNAs », *Molecular Cancer*, 19, 1, p. 1- 11, doi: 10.1186/s12943-020-01224-3.

**Zhang, M., Zhai, Y., Zhang, S., Dai, X., Li, Z.**, 2020b, « Roles of N6-Methyladenosine (m6A) in Stem Cell Fate Decisions and Early Embryonic Development in Mammals », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, August, p. 1- 15, doi: 10.3389/fcell.2020.00782.

**Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R.R.**, 2006, « Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis », *Cell*, 126, 6, p. 1189- 1201, doi: 10.1016/j.cell.2006.08.003.

**Zhang, X., Li, Q., Kong, L., Yu, H.**, 2018a, « DNA methylation frequency and epigenetic variability of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenesis », *Fisheries Science*, 84, 5, p. 789- 797, doi: 10.1007/s12562-018-1214-5.

**Zhang, X., Zhang, Y., Dai, K., Liang, Z., Zhu, M., Pan, J., Zhang, M., Yan, B., Zhu, H., Zhang, Z., Dai, Y., Cao, M., Gu, Y., Xue, R., Cao, G., Hu, X., Gong, C.**, 2020c, « N6-Methyladenosine Level in Silkworm Midgut/Ovary Cell Line Is Associated With *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Infection », *Frontiers in Microbiology*, 10, January, p. 1- 13, doi: 10.3389/fmicb.2019.02988.

**Zhang, X., Yao, Y., Han, J., Yang, Y., Chen, Y., Tang, Z., Gao, F.**, 2020d, « Longitudinal epitranscriptome profiling reveals the crucial role of N6-methyladenosine methylation in porcine prenatal skeletal muscle development », *Journal of Genetics and Genomics*, xxxx, doi: 10.1016/j.jgg.2020.07.003.

**Zhang, Y., Gu, X., Li, D., Cai, L., Xu, Q.**, 2020e, « Mettl3 regulates osteoblast differentiation and inflammatory response via smad signaling and mapk signaling », *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1, p. 1- 15, doi: 10.3390/ijms21010199.

**Zhang, Y., Zhou, X., Wan, D., Lin, X., Long, C., Chen, W., Wu, X., Yin, Y.**, 2018b, « Diurnal variations in methionine content and expression of certain genes involved in DNA methylation reaction in pigs », *Biological Rhythm Research*, 49, 6, p. 853- 861, doi: 10.1080/09291016.2018.1424776.

**Zhao, B.S., Wang, X., Beadell, A. V., Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., Ho, R.K., He, C.**, 2017, « M6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition », *Nature*, 542, 7642, p. 475- 478, doi: 10.1038/nature21355.

**Zhao, L., Jones, W. a**, 2012, « Expression of heat shock protein genes in insect stress responses », *Invertebrate Survival Journal*, 9, p. 93-101.

**Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.M., Li, C.J., Vågbø, C.B., Shi, Y., Wang, W.L., Song, S.H., Lu, Z., Bosmans, R.P.G., Dai, Q., Hao, Y.J., Yang, X., Zhao, W.M., Tong, W.M., Wang, X.J., Bogdan, F., Furu, K., Fu, Y., Jia,**

## Bibliographie

- G., Zhao, X., Liu, J., Krokan, H.E., Klungland, A., Yang, Y.G., He, C.,** 2013, « ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility », *Molecular Cell*, 49, 1, p. 18-29, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
- Zhong, X., Yu, J., Frazier, K., Weng, X., Li, Y., Cham, C.M., Dolan, K., Zhu, X., Hubert, N., Tao, Y., Lin, F., Martinez-Guryn, K., Huang, Y., Wang, T., Liu, J., He, C., Chang, E.B., Leone, V.,** 2018, « Circadian Clock Regulation of Hepatic Lipid Metabolism by Modulation of m6A mRNA Methylation », *Cell Reports*, 25, 7, p. 1816-1828, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.068.
- Zhou, C., Molinie, B., Daneshvar, K., Pondick, J. V., Wang, J., Van Wittenberghe, N., Xing, Y., Giallourakis, C.C., Mullen, A.C.,** 2017, « Genome-Wide Maps of m6A circRNAs Identify Widespread and Cell-Type-Specific Methylation Patterns that Are Distinct from mRNAs », *Cell Reports*, 20, 9, p. 2262-2276, doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.027.
- Zhou, H., Rauch, S., Dai, Q., Cui, X., Zhang, Z., Nachtergaele, S., Sepich, C., He, C., Dickinson, B.C.,** 2019a, « Evolution of a reverse transcriptase to map N1-methyladenosine in human messenger RNA », *Nature Methods*, 16, 12, p. 1281-1288, doi: 10.1038/s41592-019-0550-4.
- Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S.R., Qian, S.-B.,** 2015, « Dynamic m6A mRNA methylation directs translational control of heat shock response », *Nature*, 526, 7574, p. 591-594, doi: 10.1038/nature15377.
- Zhou, K.I., Shi, H., Lyu, R., Wylder, A.C., Matuszek, Ż., Pan, J.N., He, C., Parisien, M., Pan, T.,** 2019b, « Regulation of Co-transcriptional Pre-mRNA Splicing by m6A through the Low-Complexity Protein hnRNPG », *Molecular Cell*, 76, 1, p. 70-81.e9, doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.005.
- Zhu, W., Xu, X., Wang, X., Liu, J.,** 2019, « Reprogramming histone modification patterns to coordinate gene expression in early zebrafish embryos », *BMC Genomics*, 20, 1, p. 248, doi: 10.1186/s12864-019-5611-7.
- Zou, H., Niswander, L.,** 1996, « Requirement for BMP Signaling in Interdigital Apoptosis and Scale Formation », *Science*, 272, 5262, p. 738-741, doi: 10.1126/science.272.5262.738.
- Żylicz, J.J., Bousard, A., Žumer, K., Dossin, F., Mohammad, E., da Rocha, S.T., Schwalb, B., Syx, L., Dingli, F., Loew, D., Cramer, P., Heard, E.,** 2019, « The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation », *Cell*, 176, 1-2, p. 182-197.e23, doi: 10.1016/j.cell.2018.11.041.