



HAL
open science

Caractérisation du phénotype associé à la mutation
masculinisante "mal" chez la truite arc-enciel,
Oncorhynchus mykiss

Karina K. Valdivia

► **To cite this version:**

Karina K. Valdivia. Caractérisation du phénotype associé à la mutation masculinisante "mal" chez la truite arc-enciel, *Oncorhynchus mykiss*. Génétique animale. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT : 2012REN1S150 . tel-00808048

HAL Id: tel-00808048

<https://theses.hal.science/tel-00808048>

Submitted on 4 Apr 2013

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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

École doctorale Vie-Agro-Santé

Présentée par

Karina VALDIVIA

Préparée à l'unité de recherche INRA UR1037, LPGP
Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons
U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Caractérisation
du phénotype
associé à la mutation
masculinisante *mal*
chez la truite arc-en-
ciel, *Oncorhynchus*
*mykiss***

**Thèse soutenue à Rennes
le 20 décembre 2012**

devant le jury composé de :

Noureddine BOUJRAD

Professeur à l'Université de Rennes 1
UMR6026 CNRS ICM, Rennes / *examinateur*

Sylvie DUFOUR

Directrice de Recherche CNRS
CNRS UMR7208 BOREA, Paris / *rapporteuse*

Stéphane FLAMENT

Professeur à l'Université de Nancy 1
UPRES EA4421 SIGRETO, Nancy / *rapporteur*

Corinne COTINOT

Directrice de Recherche INRA
INRA UMR1198 BDR, Jouy-en-Josas / *examinatrice*

Edwige QUILLET

Directeur de Recherche INRA
INRA UMR1313 GABI, Jouy-en-Josas / *examinatrice*

Yann GUIGUEN

Directeur de Recherche INRA
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *directeur de thèse*

Alexis FOSTIER

Directeur de Recherche INRA
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *co-directeur de thèse*

RÉSUMÉ

Chez les poissons téléostéens gonochoriques, les déterminismes du sexe sont soit environnementaux, soit génétiques avec une interaction possible entre ces 2 facteurs. La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, présente un déterminisme sexuel strictement génétique de type XX/XY. Cependant des masculinisations spontanées ont été observées chez des femelles génétiques (XX) obtenues par gynogénèse endomitotique. Ce phénotype « femelle masculinisée » n'affecte pas tous les animaux à l'état adulte et serait dû à une mutation appelée « *mal* » non caractérisée à ce jour. Afin d'identifier le gène causal porteur de cette mutation, une meilleure caractérisation de ce phénotype « femelle masculinisée » est nécessaire. Pour cela, nous avons caractérisé le phénotype gonadique de ces animaux porteurs de la mutation « *mal* » (XXmal) en utilisant à la fois des approches histologiques et moléculaires. Nos résultats montrent que l'ensemble des animaux XXmal présente une différenciation sexuelle très perturbée autant sur le plan histologique que sur le plan de leurs profils d'expression génique. Parmi ces perturbations, l'inhibition de l'expression du gène de l'aromatase gonadique, *cyp19a1a*, qui code pour une enzyme de synthèse des œstrogènes pourrait être un facteur explicatif de cette masculinisation des femelles XXmal. Nous avons aussi exploré l'influence de la température d'élevage, et démontré que des températures élevées (18°C) augmentent fortement la masculinisation de ces animaux XXmal. De façon inattendue nous avons aussi mis en évidence que la croissance de ces animaux XXmal était affectée négativement en particulier pour les animaux XXmal qui présentaient un phénotype masculinisé à l'état adulte.

L'ensemble de nos résultats indique que la masculinisation de ces animaux serait le résultat d'une dérégulation profonde en amont de la transcription du gène *cyp19a1a*, avec comme conséquence une instabilité précoce de la différenciation ovarienne suivie par la masculinisation effective d'une partie seulement des animaux XXmal. Cette instabilité de la différenciation ovarienne serait amplifiée par des températures élevées qui affecteraient à la fois le développement global des animaux XXmal et la transcription du gène *cyp19a1a*. Enfin nos résultats suggèrent fortement que le phénotype « *mal* » est plus complexe qu'un simple phénotype « femelle masculinisée ».

ABSTRACT

In gonochoristic teleost fish species, sex determination can be either environmental or genetic with potential interactions between these two sex determination systems. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has a strict genetic XX/XY sex determination system. However spontaneous masculinization has been observed in genetic females (XX) obtained through endomitotic gynogenesis. The “masculinized female” phenotype does not affect all adult animals and would be the consequence of an uncharacterized mutation named « *mal* ». In order to identify the causal gene harboring this mutation, a better characterization of this “masculinized female” phenotype is needed. We then characterized the gonadal phenotype of the animal carrying the « *mal* » mutation (XXmal) using both histological and molecular approaches. Our results show that all these XXmal animals have a highly disturbed sex differentiation based on results from histology and gene expression profiles. Among these perturbations the inhibition of the expression of ovarian form of aromatase gene, *cyp19a1a* encoding the enzyme needed for estrogen synthesis, could be an explanation for this masculinization of XXmal females. We also explored the effect of rearing temperatures and demonstrated that high temperatures (18°C) strongly increase the masculinization of these XXmal animals. Surprisingly we also showed that the growth of these XXmal animals was negatively affected especially for those having an adult masculinized phenotype.

All together these results suggest that the XXmal masculinization is the result of a deep perturbation upstream from the transcription of *cyp19a1a* gene, with as consequence a precocious unstable ovarian differentiation followed by an active masculinization of only some of these XXmal animals. This precocious unstable ovarian differentiation would be amplified by high temperatures that would affect the development of the XXmal animals and the transcription of the *cyp19a1a* gene. Finally our results also suggest that the « *mal* » phenotype is more complex than a simple “masculinized female” phenotype.

REMERCIEMENTS

En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de thèse, Yann Guiguen, et mon co-directeur de thèse, Alexis Fostier, de m'avoir offert cette opportunité. J'ai énormément apprécié d'avoir travaillé en leur compagnie sur un sujet extrêmement intrigant et plein de surprise. Je m'estime très chanceuse d'avoir été encadrée par des personnes à la fois pédagogiques et rigoureuses. Car une thèse n'est pas un long fleuve tranquille, et il est important d'être bien accompagnée.

Je tiens également à remercier les membres du jury Nouredine Boujrad, Stéphane Flament, Sylvie Dufour, Edwige Quillet et Corinne Cotinnot d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Un merci tout particulier aux membres de mon équipe et surtout Brigitte Mourot, Elodie Jouanno et Pascal Bodinier, pour leur aide précieuse.

Merci au personnel de la plateforme histologie.

Merci au personnel des installations expérimentales d'avoir si bien pris soin de mes sexytrout et d'avoir toujours été de bonne volonté ;

Merci aux collaborateurs du projet SEXYTROUT d'avoir participé à la réflexion.

Merci Maryse, ma lumière bibliographique toujours le sourire aux lèvres.

Un merci tout particulier aux non-titulaires et le Journal Club pour leur bonne humeur, leur amitié et leur solidarité. Spécialement Joh l'arnaque, Mister Boulet, Ayakita, Elisa et Louison.

Merci à mon ami « momo » d'avoir été un si bon support technique à ma thèse et de m'avoir appris la patience.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu même quand m'est venu l'idée saugrenue de m'exiler en Bretagne, ainsi qu'à mon cheminot que la distance n'effraie pas.

ABRÉVIATIONS

Termes généraux

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AI : Inhibiteur Aromatase
ANR : Agence Nationale pour la Recherche
ARN : Acide RiboNucléique
CG : Cellules Germinales
CGP : Cellules Germinales Primordiales
ERE ou ARE : Estrogen Response Element
ou Androgene Response Element
ESD : Environmental Sexual Determination
GSD : Genetic Sexual Determination
TSD : Temperature-dependent Sex
Determination

Termes d'élevage

°Cjours : unité de mesure comprenant la
température d'élevage et l'âge
jpf : jours post fécondation
PEIMA : Pisciculture Expérimentale Inra
des Monts D'Arrée
SY : souche synthétique de truite SY
XXmal : truites génétiquement femelles de
la lignée « mal »

Pathologies ou syndromes

AHC : Hypoplasie Congénitale
Surrénalienne
BPES : Syndrome Blepharophimosis Ptosis
Epicantus inversus
BRCA : BREast CAncer 2
DSD : Disorder of Sexual Development
IOP : Insuffisance Ovarienne Prématuration
XO : défaut de chromosomes X
PIS : Polled Intersex Syndrome

Stéroïdes

Δ4 : Androstènedione
E2 : 17β œstradiol
T : Testotérone
11KT : 11 Kéto Testostérone

Liste de gènes couramment cités

amh, AMH : anti-mullerian hormone
AMHRII : Récepteur II à l'AMH
amhY : Y chromosome-specific amh
angptl7 : angiopoietin-like 7
crsp2 : calcitonin receptor-stimulating
peptide-2
cyp11b2 : cytochrome P450, family 11,
subfamily B, polypeptide 2, code pour la 11β
Hydroxylase.
cyp17a1 : cytochrome P450, family 17,
subfamily A, polypeptide 1
cyp19a1a : cytochrome P450, family 19,
subfamily A, polypeptide 1a, code pour
l'aromatase gonadique
cyp19a1b : cytochrome P450, family 19,
subfamily A, polypeptide 1b, code pour
l'aromatase cérébrale
DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical
Region gene 8
dmrt1 : doublesex and mab-3-related
transcription factor 1
dmrt1bY/DMY : Y-chromosome dmrt1
DM-W : Doublesex- and Mab-3-related
transcription factor
ef-1α : elongation factor 1 α
er2b : estrogen receptor 2 b
esr1 : estrogen receptor 1
Fancl : Fanconi anemia, complementation
group I
fasn : fatty acid synthase
foxl2 : forkhead box I2
fshb : folliculo stimulating hormone subunit
béta
fst : follistatin
gja1 : gap junction protein, alpha 1
gsdfY : gonadal soma derived growth
factor on the Y chromosome
hnmt : histamine n-methyltransferase
hsd11b2 : hydroxysteroid 11-beta
dehydrogenase 2
hsd3b : hydroxy-delta-5-steroid
dehydrogenase, 3 beta
lhb : luteinizing hormone subunit beta
lhr : récepteur à LH
nr0b1 (ancien Dax1) : nuclear receptor
subfamily 0, group B, member 1
nr5a1 (ancien SF-1 ou Ad4BP) : nuclear
receptor subfamily 5, group A, member 1

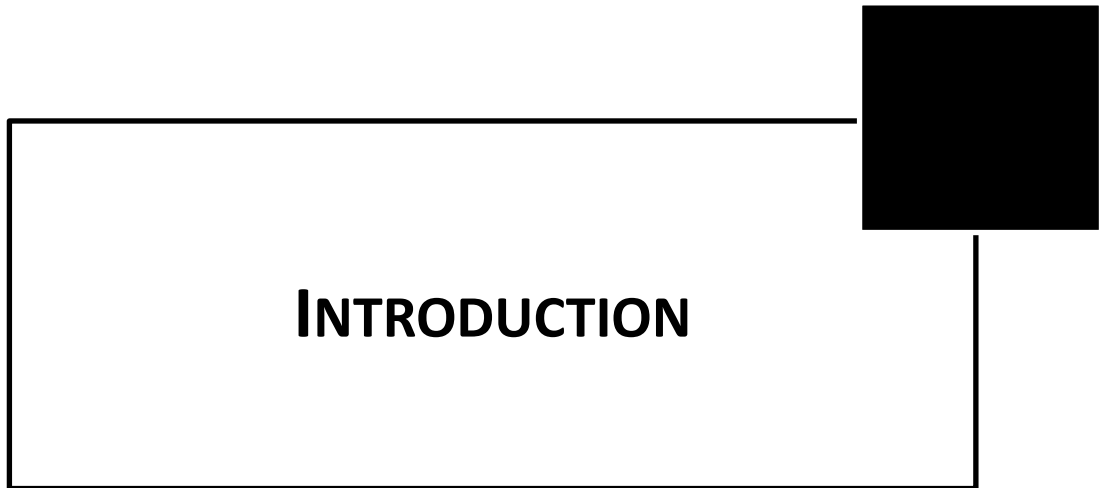
P450c11 : cytochrome P450, family 11
Pfoxic : PIS region transcribed by FOXL2
Pisrt1 : Polled intersex syndrome regulated transcript 1
rsp8 : radial spoke protein 8
rsph3 : radial spoke head 3
RSPO : R-SPONDIN
sdY : sexually dimorphic on the Y chromosome
sox3 : SRY-box containing gene 3
sox9 : SRY-box containing gene 9
Sry : Sex-determining region Y
star : steroidogenic acute regulatory protein
sycp3 : synaptonemal complex protein 3
tbx1 : T-box transcription factors 1
vasa : vasa homolog
whsc2 : Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2
WNT4 : Wntless-type MMTV integration site family, member 4
wt1 : Wilms tumor 1

Termes techniques

AEBSF : 4-(2-AminoEthyl) Benzenesulfonyl Fluoride hydrochloride
ANOVA : Analyse Of Variance
ATD : 1,4,6-Androstatrien-3,17-dione, inhibiteur de l'aromatase
EST : Expressed sequence tag
FDR : False Discovery Rate
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
HIT : Hybridation *in toto*
MCDB : milieu de culture
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
PCR : Polymerase Chain Reaction
qPCR : quantitative PCR
RIA : Dosage Radiolimmunologique
RT-PCR : Reverse Transcription PCR
SAM : Significance Analysis of Microarrays
TCA : Acide TrichloroAcétique

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| Introduction bibliographique | 1 |
| I. Détermination et différenciation sexuelle | 3 |
| A. Déterminisme génétique du sexe | 4 |
| B. Différenciation sexuelle | 6 |
| C. Environnement et différenciation du sexe | 10 |
| II. Sexe et température chez les poissons | 11 |
| A. Aromatase | 12 |
| B. Cortisol, un facteur masculinisant | 14 |
| C. Implication des cellules germinales dans la différenciation de la gonade chez les poissons | 15 |
| III. Mutations affectant le phénotype sexuel | 16 |
| IV. La truite arc-en-ciel | 22 |
| A. Généralités | 22 |
| B. Élevage, conditions et techniques employées | 23 |
| C. Différenciation du sexe | 25 |
| D. Mutation mal | 27 |
| Objectifs et déroulement de la thèse | 29 |
| Chapitre 1. Phénotype gonadique associé à la mutation « mal » | 30 |
| I. Caractérisation histologique et macroscopique du phénotype gonadique de la lignée « mal » - Article n°1 | 31 |
| II. Profils stéroïdiens des adultes de la lignée « mal » | 45 |
| III. Analyses moléculaires de la masculinisation de la lignée «mal» | 48 |
| IV. Conclusion sur le phénotype associé | 67 |
| Chapitre 2. Température et masculinisation de la lignée « mal » | 68 |
| I. Masculinisation des individus XXmal à différentes températures – Article n°2 | 70 |
| II. Effet de la température au niveau moléculaire | 86 |
| III. Conclusion sur l'effet de la température | 103 |
| Discussion générale | 105 |
| Références bibliographiques | 114 |
| Annexes | 125 |
| I. Annexe 1 : Liste des gènes annotés du microarray | 126 |
| II. Annexe 2 : Poster présenté au "9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish" à Cochin, Inde du 9 au 14 août 2011. | 142 |
| III. Annexe 3 : Résumé pour présentation orale au « 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination » à Kona, Hawaii du 23 au 27 avril 2012 | 143 |
| IV. Annexe 4 : | 145 |



Le déterminisme du sexe est le processus qui fixe et oriente le sexe. C'est un processus hautement variable au sein des vertébrés. Chez les mammifères et les oiseaux, ce déterminisme dépend uniquement du matériel génétique apporté par les parents lors de la fécondation. Chez les reptiles et les poissons, il peut également faire intervenir des facteurs externes environnementaux (ESD) [Angelopoulou *et al.*, 2012].

Plus particulièrement chez les poissons, le déterminisme du sexe peut être strictement génétique (GSD) ou à l'opposé, dépendre de facteurs environnementaux. Cependant pour les cas de déterminismes environnementaux, il s'agit le plus souvent d'interactions entre un déterminisme sexuel génétique et une influence de l'environnement et non d'un déterminisme purement environnemental. Le principal déterminisme environnemental connu et étudié chez les vertébrés est le déterminisme dépendant de la température (TSD pour « temperature-dependent sex determination »).

C'est cette détermination première du sexe qui va enclencher les processus de différenciation d'une gonade bipotente vers un testicule ou un ovaire. Les altérations du processus entre le signal primaire de détermination du sexe et les signaux secondaires de différenciation peuvent conduire à l'apparition d'individus « sexuellement inversés » vis-à-vis de leur sexe génétique. Les études de pathologies humaines et d'animaux présentant un phénotype sexuel perturbé ont révélé que, pour la plupart, ces phénotypes étaient associés à une ou plusieurs mutations de certains acteurs moléculaires du processus de détermination et de différenciation du sexe.

Chez la truite arc-en-ciel, un phénotype sexuel perturbé a été mis en évidence il y a quelques années par des généticiens de l'INRA de Jouy-en-Josas [Quillet *et al.*, 2002]. Ce phénotype appelé « *mal* » consiste en une masculinisation de populations génétiquement femelles. Les causes de cette mutation et ses conséquences sur la différenciation de la gonade restaient encore à découvrir.

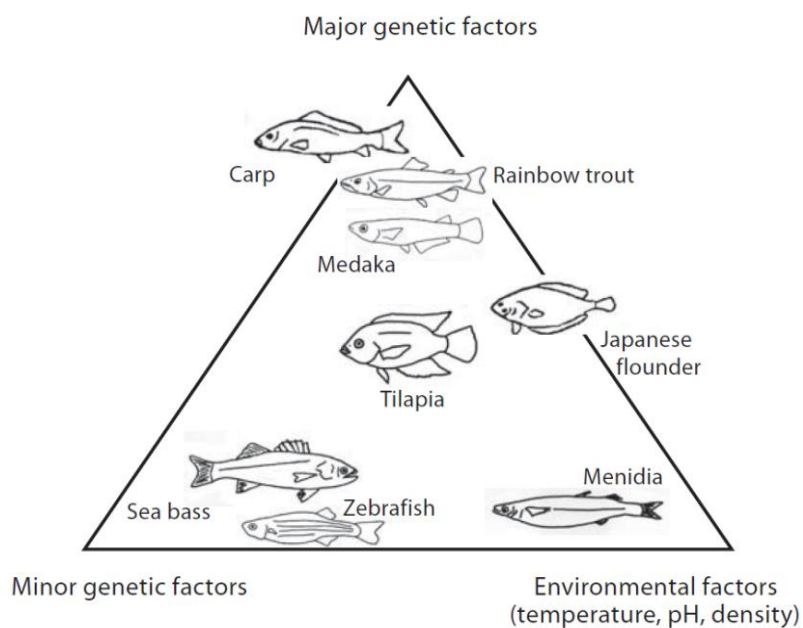


Fig. 1: Les trois types de facteurs pouvant déterminer le sexe chez les poissons : des facteurs génétiques majeurs contrôlés par un gène déterminant majeur (*sdY* pour les salmonidés, *dmrt1bY* chez certaines espèces de médaka), des facteurs génétiques mineurs utilisant la combinaison de plusieurs gènes, ou bien des facteurs environnementaux comme la température. Ce schéma illustre que ces 3 facteurs peuvent se combiner selon les espèces. Le cas du tilapia étant particulièrement intéressant car des déterminants majeur et mineurs ainsi que la température peuvent intervenir pour fixer le sexe phénotypique [Baroiller *et al.*, 2009].

I. DÉTERMINATION ET DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

Avec plus de 28 000 espèces actuellement recensées (FishBase - <http://www.fishbase.org>), le groupe des poissons téléostéens représente la grande majorité des espèces de vertébrés. Leurs mécanismes de détermination et différenciation du sexe sont particulièrement étudiés, car la maîtrise du sexe est un enjeu majeur en pisciculture. Par ailleurs, ce groupe de poissons présente une grande diversité de mode de reproduction [Devlin and Nagahama, 2002] qui peut être :

- Le gonochorisme : une espèce dont les individus se différencient directement en mâle ou femelle et garde ce même sexe tout au long de sa vie, c'est le gonochorisme direct. Mais certaines espèces gonochoriques vont d'abord présenter un stade d'intersexualité transitoire juvénile avant d'atteindre la maturité sexuelle. C'est le gonochorisme indirect, comme c'est le cas chez l'anguille qui développe d'abord une gonade intersexuée puis ensuite un ovaire ou un testicule, ou chez le poisson zèbre qui développe d'abord un ovaire juvénile puis un ovaire ou un testicule.
- L'hermaphrodisme : une espèce dont les individus présentant à la fois des tissus mâles et femelles fonctionnels à l'âge adulte, c'est l'hermaphrodisme synchrone. Il existe également des espèces dont les individus vont séquentiellement changer de sexe à l'âge adulte : hermaphrodisme protandre (mâle puis femelle, ex : Poisson-clown) ou protérogynie (femelle puis mâle, ex : les Mérus). Chez quelques espèces comme le Gobie, *Trimma okinawae*, les réversions sexuelles peuvent être multiples.

NB : Nous faisons ici la distinction entre hermaphrodisme et intersexualité, qui sont respectivement le mode de reproduction d'une espèce et le phénotype d'un individu.

Même si l'hermaphrodisme est très bien représenté chez les poissons téléostéens, la plupart des espèces sont gonochoriques et présentent une grande plasticité de leur système de détermination du sexe [Baroiller *et al.*, 2009; Piferrer *et al.*, 2012]. Cette détermination du sexe peut dépendre de (Fig. 1) :

- Facteurs génétiques majeurs ; on parle alors de déterminisme génétique du sexe ou GSD (pour « genetic sex determination »). Cette GSD est gouvernée par un déterminant génétique majeur du sexe.
- Facteurs génétiques mineurs ; lorsque la détermination du sexe est gouvernée par une combinatoire d'allèles de plusieurs gènes.
- Facteurs environnementaux ; on parle alors de déterminisme environnemental du sexe ou ESD (pour « environmental sexual determination ») lorsque l'environnement va moduler le sex-ratio.

A. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DU SEXE

La détermination génétique du sexe repose principalement sur 2 systèmes monofactoriels simples : une hétérogamétie mâle avec des chromosomes sexuels de type X ou Y (le sexe mâle étant XY), ou une hétérogamétie femelle avec des chromosomes sexuels Z ou W (le sexe femelle étant ZW). C'est le cas, respectivement, des mammifères (XX/XY) et des oiseaux (ZZ/ZW). Le sexe peut être directement identifié par l'analyse d'un caryotype quand ces chromosomes sexuels sont morphologiquement différents. Mais peu d'espèces de poissons présentent des chromosomes sexuels dimorphiques bien que les 2 systèmes d'hétérogamétie mâle ou d'hétérogamétie femelle existent chez les poissons [Devlin and Nagahama, 2002]. Les types de détermination génétique des poissons ont donc souvent été caractérisés par des approches de marquages de chromosome (FISH), d'analyse de sex-ratio après manipulation génétique (gynogénèse) et/ou de croisement avec des individus sexuellement inversés par des traitements hormonaux stéroïdiens [Devlin and Nagahama, 2002; Jalabert *et al.*, 1975; Chourrout, 1982].

GSD monofactoriel et déterminants majeurs du sexe

Chez les mammifères ou certains poissons comme la truite, la différenciation du sexe est sous le contrôle d'un déterminant majeur du sexe qui active une cascade d'expression des gènes de la différenciation gonadique.

Chez des animaux à hétérogamétie mâle (systèmes XX/XY), l'expression d'un déterminant majeur situé sur le Y détermine la différenciation de l'individu en mâle. Ainsi, chez les mammifères, le déterminant majeur du sexe SRY est connu et bien documenté à l'heure actuelle [Sinclair *et al.*, 1990; Zhao and Koopman, 2012]. Ce déterminant majeur commun à tous les mammifères analysés (sauf exception de quelques souris africaines naines) est situé sur le chromosome sexuel Y et aurait évolué à partir d'une duplication ancestrale des gènes autosomaux SOX3 et de DGCR8 [Sato *et al.*, 2010]. Le sexe de l'individu est sous condition de son expression, car une altération de celle-ci conduit à des phénotypes sexuels inversés (voir partie III. **Mutations affectant le phénotype sexuel**).

L'hypothèse inverse chez des animaux à hétérogamétie femelle (ZZ/ZW) serait que l'expression d'un déterminant majeur situé sur le W peut déterminer la différenciation de l'individu en femelle. C'est le cas chez le Xénope, *Xenopus laevis*, avec DM-W, un dominant négatif apparu suite à la duplication du gène autosomal DMRT1 [Yoshimoto and Ito, 2011]. Mais contrairement au mammifère pour SRY, ce facteur majeur n'est pas commun à tous les amphibiens. Avec les progrès biotechnologiques, de nouveaux modèles de détermination du sexe émergent. Ainsi chez les oiseaux qui ont un système de détermination génétique du sexe de type (ZZ/ZW), une des hypothèses actuelles sur la détermination du sexe serait un effet dose de *DMRT1*, la présence de deux copies du gène activerait la différenciation testiculaire chez les mâles [Smith *et al.*, 2009].

En ce qui concerne les poissons téléostéens gonochoriques à GSD, les systèmes de détermination du sexe semblent extrêmement variés [Mank and Avise, 2009]. Un grand nombre de déterminants du sexe a été récemment identifiés parmi ces poissons. Cependant ils ne sont pas conservés d'une famille d'espèces à l'autre et représentent en réalité une faible proportion des espèces de poissons téléostéens. Pour la plupart ils sont issus de duplications de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle au cours de l'évolution, sauf chez les salmonidés.

Le premier déterminant majeur du sexe découvert chez un poisson a été *dmrt1Y*, issu d'une duplication de *dmrt1* spécifique au chromosome Y, chez le médaka, *Oryzias latipes*, [Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda, 2003]. Il est conservé chez une autre espèce du même genre, *O. curvinotus* mais n'est pas le déterminant majeur du sexe chez la plupart des espèces du genre *Oryzias*. Ainsi chez *O. luzonensis*, *gsdfY* (gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome) a remplacé *dmrt1Y* [Myosho *et al.*, 2012]. Une autre évolution de gène de la différenciation sexuelle mâle a récemment été découverte comme étant le déterminant majeur du sexe chez un représentant de la famille des athérines d'Argentine : *amhY*. Il s'agit d'une duplication de l'hormone anti-müllérienne située sur le Y chez l'athérine de Patagonie, *Odontesthes hatcheri* [Hattori *et al.*, 2012]. Le seul déterminant majeur ne correspondant pas à la duplication d'un gène de la différenciation du sexe est *sdY* (sexually dimorphic on the Y chromosome) découvert récemment chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* [Yano *et al.*, 2012a]. Les analyses démontrent que *sdY* est un déterminant majeur du sexe conservé chez la plupart des espèces de salmonidés [Yano *et al.*, 2012b].

Au cours de l'évolution, le groupe des poissons téléostéens a subi une duplication supplémentaire de son génome (3R), pouvant faciliter l'acquisition de nouveaux déterminants du sexe spécialement au vu de la grande diversité de milieux et de niches écologiques colonisés par ces poissons. En plus de cette duplication 3R, les salmonidés ont subi une duplication supplémentaire 4R. En conséquence, pour un même gène chez les mammifères, ils peuvent posséder en théorie 4 réplicats de ce gène. Bien que le locus de détermination du sexe ne soit pas conservé d'une espèce à l'autre [Davidson *et al.*, 2009], les salmonidés ont pour la plupart un déterminisme génétique du sexe de type XX/XY puisque *sdY* n'est présent que chez les mâles. Cette non-conservation des marqueurs génétiques autour de *sdY* et le fait que le locus de détermination du sexe ne soit pas sur les mêmes chromosomes suggèrent que ce locus ait été transposé et conservé au cours de l'évolution de cette famille [Yano *et al.*, 2012b].

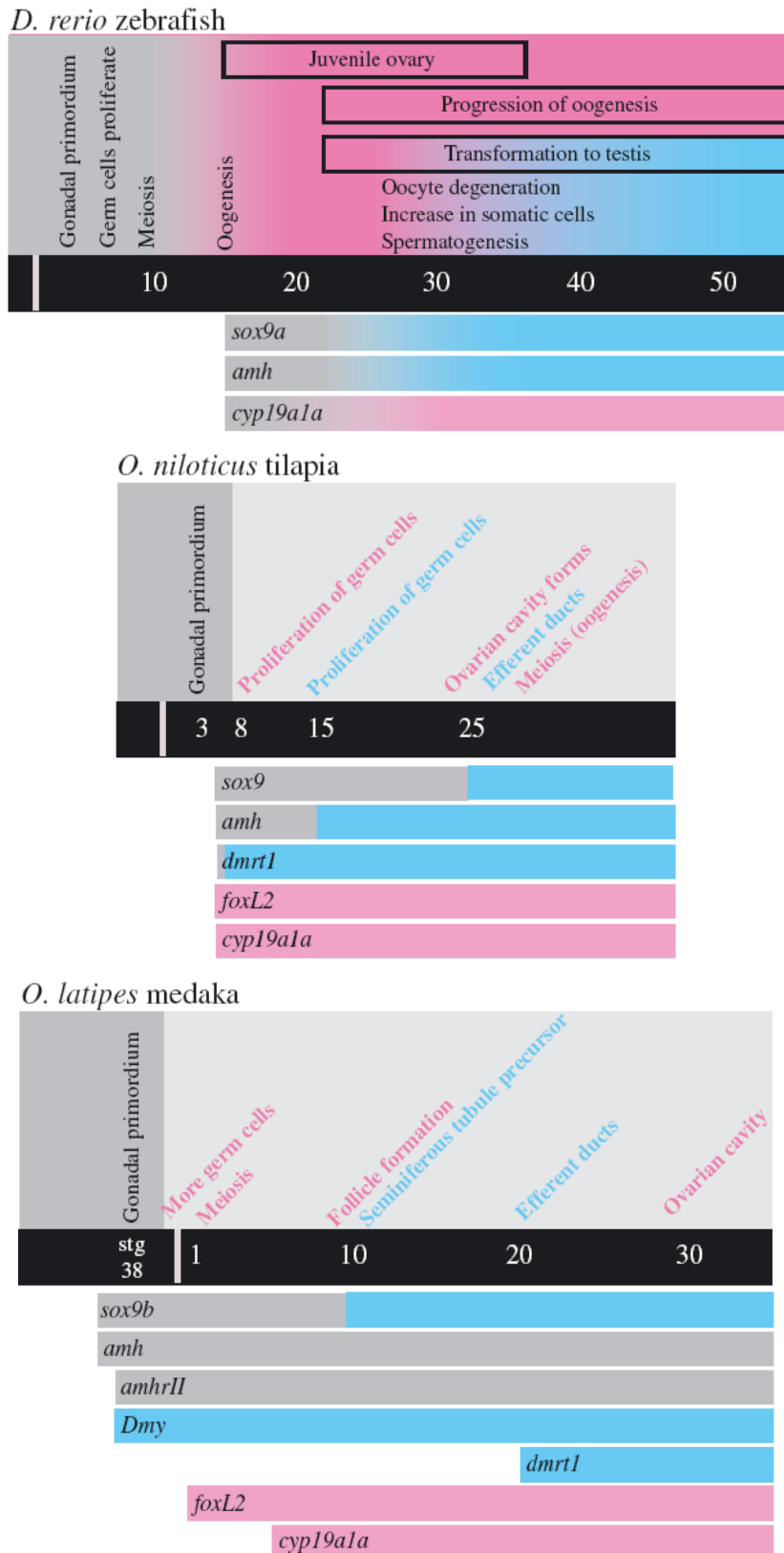


Fig. 2: Comparaison des cinétiques de différenciation sexuelle entre 3 espèces gonochoriques de poissons téléostéens, le poissons zèbre, le tilapia et le médaka [Siegfried *et al.*, 2010]. La formation de la gonade bipotente se fait avant ou après l'écllosion (trait blanc vertical sur la barre noire) et que la cinétique d'expression durant la gonadogenèse varie entre ces 3 modèles. Néanmoins il y a des points invariants : la différenciation morphologique ovarienne débute en premier. *Cyp19a1a* est nécessaire à la différenciation sexuelle ovarienne. Le cas du poisson zèbre est particulier car c'est un poisson gonochorique indirecte formant d'abord un ovaire juvénile.

GSD polygénique

Pour plusieurs espèces de poissons, un déterminisme génétique du sexe de type hétérogamétie simple contrôlé par un unique déterminant majeur du sexe n'a pas pu être trouvé [Devlin and Nagahama, 2002]. Chez certaines de ces espèces, le sex-ratio n'est pas toujours de 50% de femelles et 50% de mâles, indiquant soit que la ségrégation des chromosomes sexuels n'est pas mendélienne, soit que des facteurs autosomaux interviennent dans la détermination du sexe. Cela semble être le cas chez le bar, *Dicentrarchus labrax*, [Vandeputte *et al.*, 2007] et plus particulièrement chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, [Anderson *et al.*, 2012] pour lequel l'apport des techniques modernes de séquençage a permis de montrer que la détermination du sexe était polygénique. Les différents gènes impliqués varient d'une souche à l'autre (par exemple : l'influence variable de *dmrt1*) ou bien ont une influence dépendante des conditions environnementales [Anderson *et al.*, 2012].

B. DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

La différenciation du sexe est l'étape par laquelle des tissus gonadiques bipotents vont se différencier en ovaires ou en testicules selon l'environnement moléculaire mis en place. Chez les vertébrés, elle repose sur l'expression de gènes clefs de la différenciation sexuelle communs aux vertébrés parmi lesquels *SOX9*, *DMRT1*, *AMH* chez le mâle et *FOXL2* chez la femelle. La plupart de ces gènes sont présents chez les poissons potentiellement en 2 copies à cause de la duplication 3R, ainsi par exemple avec *Foxl2* chez les mammifères, 2 paralogues *foxl2a* et *foxl2b* existent chez les poissons [Baron *et al.*, 2004]. Bien que la période d'expression de ces gènes varie au cours de la différenciation sexuelle entre les espèces (**Fig. 2**), ils sont exprimés de façon sexe spécifique (voir pour revue [Siegfried, 2010; Sandra and Norma, 2010]). En plus de ces gènes, chez les poissons, les amphibiens et les reptiles, les stéroïdes sexuels jouent un rôle prépondérant, car il est possible d'inverser totalement le sexe de l'individu en traitant avec une hormone mâle ou femelle [Angelopoulou *et al.*, 2012]. En cas de dysfonctionnement de la différenciation ovarienne suite à ces traitements, l'enzyme stéroïdienne commune entre ces espèces est l'aromatase gonadique.

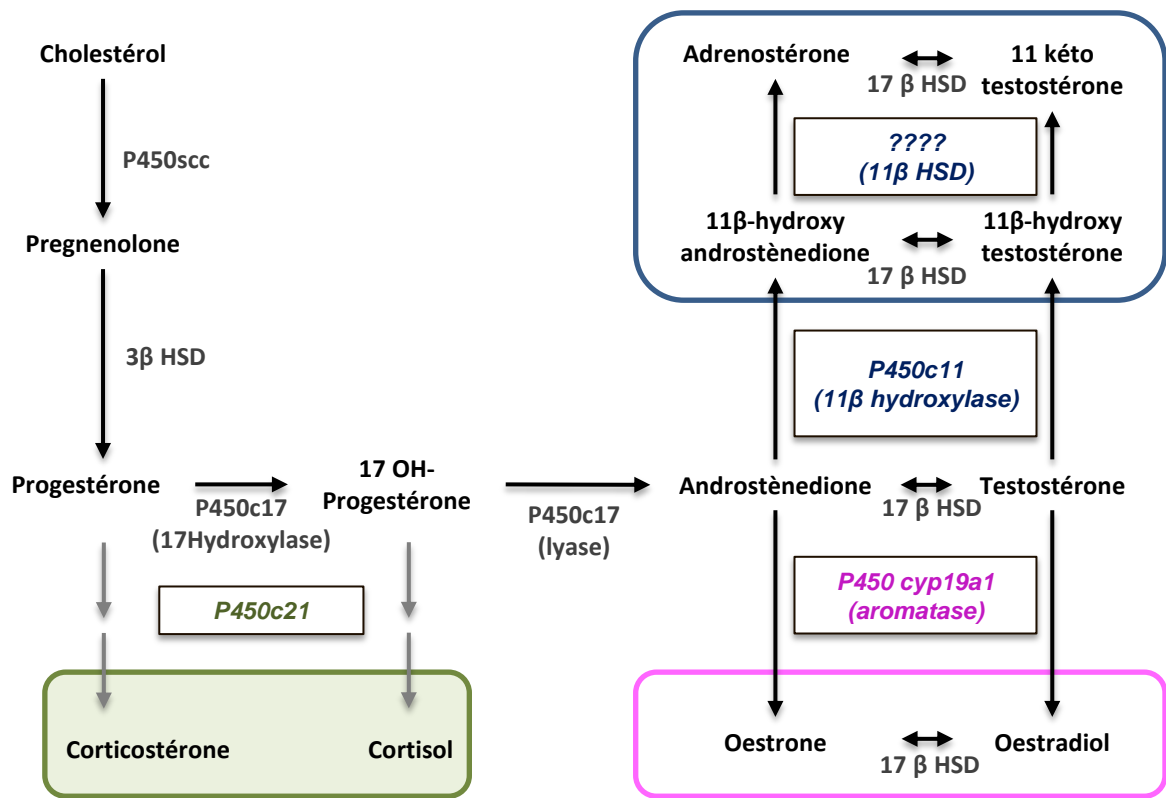


Fig. 3 : Schéma simplifié de la synthèse des stéroïdes sexuels et des corticostéroïdes chez les poissons.

Acteurs de la différenciation sexuelle

a. Stéroïdes sexuels et corticostéroïdes

Les premiers travaux sur l'implication des hormones stéroïdiennes dans la différenciation sexuelle chez le médaka [Yamamoto, 1969] ont montré que ces hormones avaient la capacité d'inverser le sexe des individus traités quand elles étaient administrées pendant la période de différenciation sexuelle. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que ces hormones stéroïdiennes étaient des facteurs déterminants. Les œstrogènes agissent comme des facteurs féminisants et à l'inverse les androgènes comme des facteurs masculinisants. Ceci a été confirmé depuis dans de nombreuses études chez de nombreuses espèces (voir revue [Pandian and Sheela, 1995; Baroiller *et al.*, 1999; Guiguen, 2000; Devlin and Nagahama, 2002; Leet *et al.*, 2011]) et ces protocoles ont été adaptés à la production aquacole pour pouvoir maîtriser le phénotype sexuel comme c'est le cas pour la production des géniteurs en aquaculture chez la truite arc-en-ciel [Jalabert *et al.*, 1975; Chevassus *et al.*, 1979]. Ces petites hormones hydrophobes ont la capacité de traverser la membrane plasmique et de se lier directement sur des récepteurs nucléaires qui peuvent ensuite interagir avec des séquences consensus de type ERE (estrogen response element) ou ARE (androgene response element) présentes dans les séquences promotrices de gènes cibles.

Les stéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol qui entre dans la mitochondrie par l'intermédiaire de protéines de support comme la *star*, où il va subir une série de transformations par les enzymes de la stéroïdogénèse, sur place ou exporté vers d'autres compartiments cellulaires, pour aboutir à la synthèse d'hormones sexuelles (**Fig. 3**). Au niveau des ovaires, les œstrogènes sont produits par l'aromatase des androgènes grâce à l'aromatase *cyp19a1a* dans les cellules de la granulosa. Et contrairement aux mammifères, chez les poissons l'hormone souvent considérée comme la plus masculinisante est la 11 kéto testostérone, produit successivement par la 11 β hydroxylase (P450 *c11*) et la 11 β HSD à partir de la testostérone. La testostérone et ses dérivés possèdent aussi des effets masculinisants [Leet *et al.*, 2011].

Bien qu'ils ne soient pas des hormones sexuelles, les corticostéroïdes (hormones du stress) sont également capables de masculiniser les poissons comme cela a été démontré chez la truite arc-en-ciel et l'Athérine d'Argentine [Van den Hurk and Van Oordt, 1985; Hattori *et al.*, 2009].

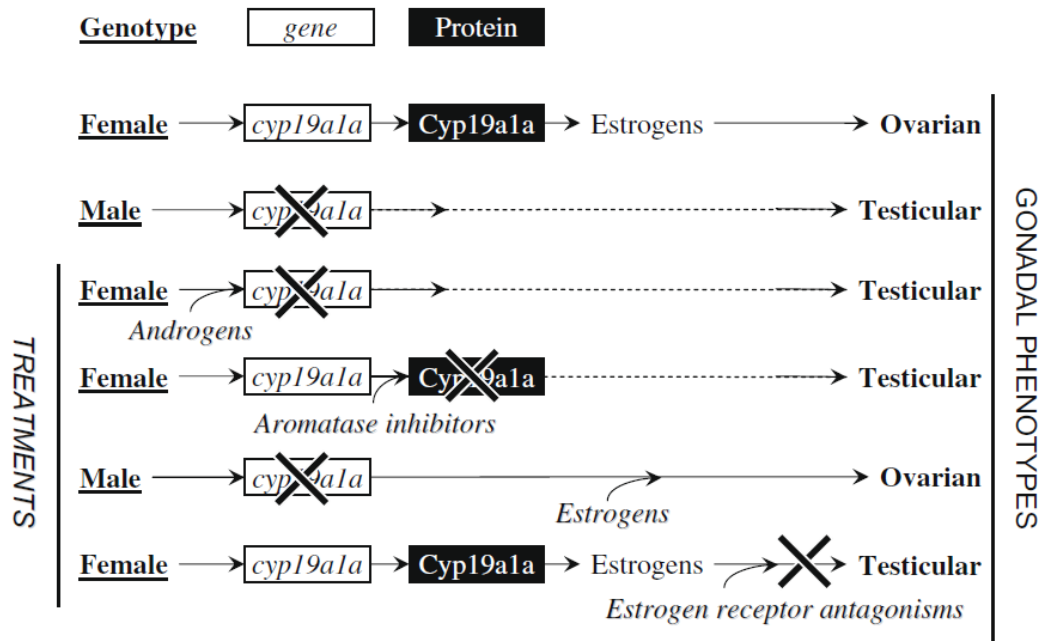


Fig. 4: L'aromatase joue un rôle pivot dans la différenciation sexuelle femelle des poissons. Une inhibition de son expression par des traitements aux androgènes, de son activité enzymatique par un inhibiteur anti aromatase, induit la réversion sexuelle de femelles génétiques en mâles phénotypiques. Son action passe essentiellement par les œstrogènes (E1 ou E2), car un traitement E2 féminise des mâles génétiques et l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur aux œstrogènes au contraire masculinise des femelles génétiques [Guiguen *et al.*, 2010].

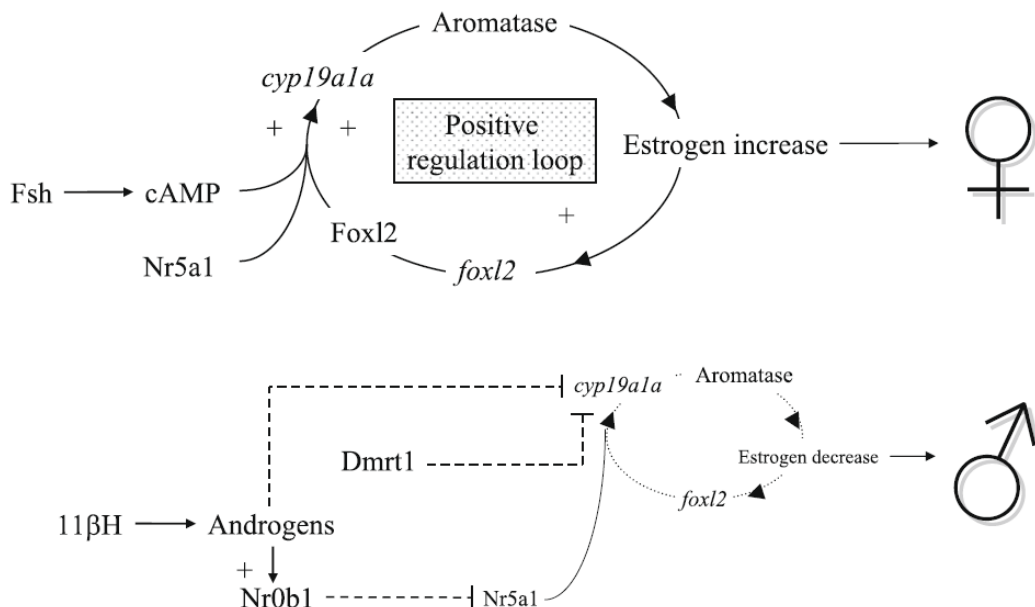


Fig. 5: Mécanismes de régulation de l'expression de l'aromatase. Les mécanismes connus sont représentés par des traits pleins et ceux suggérés par la littérature en pointillés [Guiguen *et al.*, 2010].

b. Gènes de la différenciation sexuelle

i. Aromatase, *cyp19a1a*

L'aromatase (CYP19A ; cytochrome P450, famille 19, sous famille A) est une enzyme clef de la différenciation ovarienne. C'est une enzyme stéroïdogène responsable de l'aromatation des androgènes en œstrogènes, localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules stéroïdogènes. Elle existe sous deux formes chez les téléostéens : *cyp19a1a*, l'aromatase gonadique exprimée principalement dans l'ovaire et *cyp19a1b*, l'aromatase cérébrale exprimée principalement dans le cerveau à la fois chez les mâles et les femelles. L'implication de *cyp19a1a* dans la différenciation sexuelle femelle a été mise en évidence chez les poissons dès 1969 suite à des expériences de traitements *in vivo* conduisant à des féminisations fonctionnelles [Yamamoto, 1969]. Depuis, de nombreuses études ont confirmé ces premiers résultats (voir revue [Pandian and Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Leet *et al.*, 2011]) et cette implication de l'aromatase dans la différenciation ovarienne a fait l'objet de revues récentes [Guiguen *et al.*, 2010; Piferrer and Blázquez, 2005].

Le rôle clef de l'aromatase dans la différenciation sexuelle des poissons [Guiguen *et al.*, 2010], en particulier, est démontré par l'action masculinisante d'inhibiteur de son activité enzymatique et par la répression de son expression lors d'une masculinisation de femelles génétiques par des traitements aux androgènes ou par des traitements thermiques (voir **Fig. 4**). Durant la différenciation ovarienne il a été démontré que le gène de l'aromatase pouvait être régulé positivement par Foxl2 [Wang *et al.*, 2007] et négativement par Dmrt1 [Wang *et al.*, 2010] chez les poissons (**Fig. 5**). L'implication de ces deux acteurs Foxl2 et Dmrt1 dans la régulation de la différenciation gonadique est commune chez les vertébrés, bien que leur cinétique d'expression puisse varier selon les espèces.

C'est également la cible des masculinisations par la température comme cela est discuté dans la partie II-Sexe et température.

ii. Foxl2

Foxl2 (fork-head transcription factor2) exerce un rétrocontrôle positif sur l'expression de l'aromatase chez les femelles (**Fig. 5**). Il s'agit d'un des rares gènes de la différenciation ovarienne retrouvé à travers l'évolution chez les mammifères [Baron *et al.*, 2004; Baron *et al.*, 2005a; Pannetier and Pailhoux, 2010], les oiseaux [Govoroun *et al.*, 2004] et les poissons [Baron *et al.*, 2004]. Il est co-exprimé avec *cyp19a1a* dans les cellules stéroïdogènes dès le début de la différenciation sexuelle femelle chez la truite arc-en-ciel [Nicol *et al.*, soumis] et le Tilapia [Vizziano *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007], et va promouvoir son expression aussi bien chez les mammifères que chez les poissons [Wang *et al.*, 2007; Ijiri *et al.*, 2008; Pannetier and Pailhoux, 2010]. C'est le cas notamment chez le Cardeau Hirame, où ce facteur de transcription se lie directement au promoteur de l'aromatase [Yamaguchi *et al.*, 2007]. Chez la truite arc-en-ciel, l'expression de *foxl2a* et *foxl2b*, des paralogues de Foxl2, est

fortement et rapidement stimulée par les œstrogènes [Baron *et al.*, 2004; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2008] et inhibée par des traitements anti aromatase [Baron *et al.*, 2004]. Ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle de régulation positive entre *cyp19a1a*, sa protéine, les œstrogènes et *foxl2a*. Mais ce facteur de transcription n'est pas suffisant pour restaurer l'expression de *cyp19a1a* en cas d'inhibition de l'aromatase, indiquant l'intervention probable de co-facteurs dans cette boucle comme Sf1 (*Nr5a1*) [Wang *et al.*, 2007].

iii. Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor 1)

DMRT1 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation gonadique mâle chez les invertébrés et vertébrés [Herpin and Schartl, 2011]. Chez la truite arc-en-ciel, Il s'exprime très tôt durant et après la différenciation testiculaire avant la différenciation morphologique testiculaire [Vizziano *et al.*, 2007] puis tout au long de la spermatogénèse [Marchand *et al.*, 2000; Vizziano *et al.*, 2007]. Chez le tilapia, Dmrt1 réprime la transcription de *cyp19a1a* induite par Sf1 et peut à lui seul diminuer l'expression de *cyp19a1a* en se liant à son promoteur [Wang *et al.*, 2010].

iv. cyp11b2, (cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2)

Chez la truite arc-en-ciel, le gène *cyp11b2* code pour la 11 β Hydroxylase. Cette protéine impliquée dans les androgènes 11 oxygénés intervient négativement dans la boucle de régulation de *cyp19a1a*. Il est surexprimé chez le mâle durant la période de différenciation sexuelle [Vizziano *et al.*, 2007]. Paradoxalement lors de traitements masculinisants aux androgènes, son expression est inhibée et, à l'inverse son expression augmente, avec un traitement inhibiteur de l'aromatase [Vizziano *et al.*, 2008], ce qui indique que son action dans la différenciation sexuelle se trouve en aval de l'aromatase.

C. ENVIRONNEMENT ET DIFFÉRENCIATION DU SEXE

Les facteurs extérieurs pouvant affecter la différenciation du sexe chez les poissons téléostéens sont soit des facteurs sociaux, soit des facteurs physico-chimiques selon les espèces [Baroiller *et al.*, 2009]. Parmi les facteurs chimiques, les polluants de type « perturbateurs endocriniens » représentent un cas particulier, car lié à l'activité humaine, mais ils sont de plus en plus évoqués.

Facteurs sociaux

L'influence des facteurs sociaux est surtout décrite chez les espèces hermaphrodites et certaines autres espèces gonochoriques qui passent par une phase d'intersexualité juvénile transitoire (les hermaphrodites juvéniles). Le *sex-ratio* peut également être modulé par des facteurs comme la **densité** comme chez l'anguille où en cas de forte densité les mâles sont surreprésentés [Huertas and Cerdà, 2006], ou le labre à tête bleue (*Thalassoma bifasciatum*) [Shapiro, 1987; Godwin *et al.*, 2003]. Un autre exemple est le **statut social** comme chez le poisson clown qui est une espèce hermaphrodite protandre chez laquelle la présence d'une femelle dominante maintient les autres animaux du groupe au stade mâle [Fricke and Fricke, 1977], ou la **taille des juvéniles** des Midas cichlid (*Amphilophus citrinellus*) [Francis and Barlow, 1993].

Facteurs physiques

Contrairement aux mammifères et aux oiseaux dont le développement embryonnaire se fait dans un environnement stable (tout du moins thermo-régulé), les poissons sont directement exposés à des facteurs physiques extérieurs pouvant altérer leur développement. Parmi les facteurs naturels de l'environnement qui affectent la différenciation du sexe, les plus connus sont :

L'hypoxie qui a été montrée comme pouvant perturber la migration des cellules germinales primordiales pendant le développement embryonnaire [Lo *et al.*, 2011] et affecter le *sex-ratio* de poissons-zèbre [Shang *et al.*, 2006]. En effet, chez cette espèce tous les individus passent par un stade juvénile femelle puis soit l'ovaire dégénère suite à une apoptose massive pour se redifférencier en testicule, soit l'ovaire juvénile continue son développement. L'hypoxie qui par ailleurs a été montrée comme un facteur apoptotique des cellules germinales chez la souris [Paul *et al.*, 2009], pourrait donc agir chez le poisson-zèbre en induisant ce phénomène d'apoptose qui favoriserait le développement testiculaire.

Le pH qui chez le poisson porte-épée, *Xiphophorus hellerii* produit des populations monosexes mâles lorsqu'ils sont élevés dans des eaux acides (pH=6,2) et des populations monosexes femelles dans des eaux basiques (pH=7,8). Au contraire, chez quelques-unes des espèces d'*Apistogramma*, l'augmentation du pH masculinise les populations [Römer and Beisenherz, 1996].

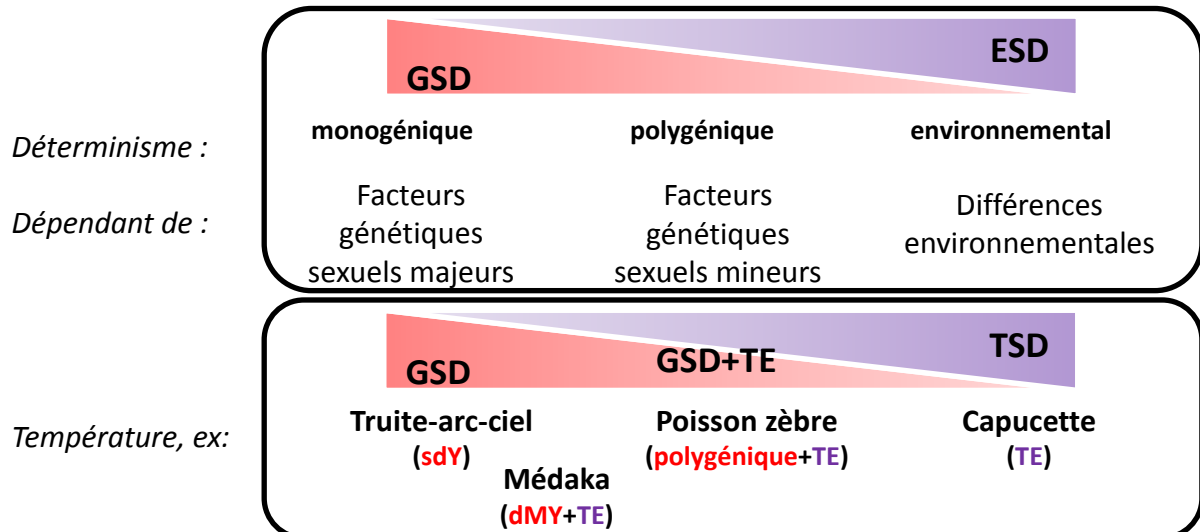


Fig. 6: Déterminisme du sexe dépendant de la température (TSD) ou déterminisme génétique du sexe sous influence de la température (GSD+TE)? La plupart des poissons considérés comme étant TSD, sont en réalité des espèces à déterminisme sexuel génétique dont la différenciation du sexe peut être secondairement affectée par la température de l'eau [Piferrer *et al.*, 2012].

Enfin, la **température** est le facteur physique affectant la différenciation sexuelle le mieux documenté et le plus commun parmi les poissons, les reptiles et les amphibiens [Angelopoulou *et al.*, 2012]. Du fait de leur importance pour mon sujet de thèse les mécanismes d'action de la température sur la différenciation sexuelle seront détaillés dans la partie suivante.

II. SEXE ET TEMPÉRATURE CHEZ LES POISSONS

Une variation de la température peut influencer le sexe phénotypique final lorsqu'elle est appliquée pendant la période de différenciation sexuelle chez les poissons gonochoriques directs [Devlin and Nagahama, 2002; Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008; Baroiller *et al.*, 2009] et/ou la période de transition sexuelle chez les poissons gonochoriques indirect (ex poissons zèbres [Abozaid *et al.*, 2012; Abozaid *et al.*, 2011]).

Depuis la revue récente d'Ospina-Alvarez *et al.* [2008], une distinction importante est faite entre les espèces peu nombreuses de poissons dont le sexe est strictement modulé par la température qui sont dit TSD pour « Temperature-dependent Sex Determination » strict, et les espèces plus nombreuses où la température peut moduler un déterminisme génétique (GSD+TE) (voir **Fig. 6**). Les espèces dites « TSD » remplissent 3 conditions : (1) ce sont des poissons sans chromosomes sexuels apparents ni déterminisme génétique identifié, (2) présentant une déviation du *sex-ratio* sous influence de la température et ceci (3) dans une gamme de température similaire à celle que l'animal peut rencontrer dans la nature pendant son développement embryonnaire. Si une de ces conditions n'est pas remplie, l'espèce étudiée est classée comme étant « GSD+TE », c'est-à-dire dépendant de facteurs génétiques pouvant être modulés par l'action de la température.

La plupart des études montrent un effet masculinisant de la température [Baroiller *et al.*, 1999; Devlin and Nagahama, 2002; Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008], avec des effets féminisants dans quelques cas [Craig *et al.*, 1996]. La distinction entre TSD et GSD+TE faite par Ospina-Alvarez *et al.* (2008) révèle que les espèces à TSD stricte sont toutes masculinisées par une hausse de la température. Quelques études ont tenté de comprendre les mécanismes d'action impliqués dans la masculinisation par la température, bien qu'il y ait des divergences entre espèces à ce sujet, il semblerait qu'un mécanisme commun soit une inhibition de l'expression de l'aromatase (voir **tableau n°1**).

Tableau 1 : Résumé des expériences de traitements à température élevée chez quelques poissons gonochoriques.

| Espèces | Détermination sexuelle | | Effet d'une hausse de la température | | | | | |
|---|------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|--|----------------------|---|--|
| | TSD ou GSD+TE | Chr. Sex. | Population testée | Expression de <i>cyp19a1a</i> | Expression d'autres gènes | Cortisol plasmatique | Cellules germinales | Autres |
| Capucette (<i>Menidia menidia</i>) | TSD | - | mix | ↘ | - | - | - | - |
| Athérine d'Argentine (<i>Odonthesthes bonariensis</i>) | TSD | - | mix | ↘ | ↗ <i>amh</i> , <i>cyp11b2</i> , <i>dmrt1</i> ↗ <i>FSHb</i> et <i>LHb</i> ↘ <i>fshr</i> ↗ <i>Hsd11b2</i> | ↗ | ↘ | Dégénération des gonades, ↗11KT circulant |
| Cardeau hirame (<i>Paralichthys olivaceus</i>) | GSD+TE | XX/XY | XX | ↘ | ↗ <i>amh</i> | ↗ | Retard méiose (↗ <i>cyp26b1</i> , ↘ <i>sycp3</i>) | - |
| Bar européen (<i>Dicentrarchus labrax</i>) | GSD+TE | - | mix | ↘ | = <i>erb1</i> = <i>arb</i> ↗ <i>cyp11b</i> | - | - | ↗%CpG |
| Tilapia du nil (<i>Oreochromis niloticus</i>) | GSD+TE | ? | XX et mix | ↘ | ↗ <i>cyp11b2</i> | - | - | QTL-T°C |
| Médaka (<i>Oryzias latipes</i>) | GSD+TE | XX/XY | XX | HT ou Cortisol ↘ | ↗ <i>dmrt1</i> ↗ <i>gsdf</i> | ↗ | ↘ | - |
| Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>) | GSD+TE | - | mix | Activité protéine ↘ | - | - | ↘ | Apoptose des ovocytes |

Effets associés à la hausse de la température : expression des gènes mâles et femelles, taux de cortisol circulant, nombre de cellules germinales (CG) et autres effets (apoptose, méthylation (%CpG), détection de QTL spécifique)

A. AROMATASE

Plusieurs études chez différentes espèces résumées dans le **tableau 1** ont démontré que la température induisait une masculinisation par inhibition de l'expression de l'aromatase principalement [Kitano *et al.*, 1999; D'Cotta *et al.*, 2001; Kitano *et al.*, 2007; D'Cotta *et al.*, 2001; Navarro-Martín *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2010] et/ou de son activité [Uchida *et al.*, 2004] soulignant à nouveau l'importance de cette enzyme pour la différenciation sexuelle ovarienne.

La capucette, *M. menidia*, est la première espèce de poisson à TSD strict décrite dans la littérature [Conover and Kynard, 1981]. Dans leur milieu naturel qui couvre une large gamme de latitudes [Lagomarsino and Conover, 1993], les poissons prélevés en Caroline du Sud sont clairement dépendants d'un TSD contrairement à ceux prélevés plus au Nord en Nouvelle-Écosse (uniquement GSD). Cela se reflète également sur l'expression de l'aromatase, inhibée seulement chez les Capucettes de Caroline du Sud par une exposition à de hautes températures ce qui aboutit à la masculinisation [Duffy *et al.*, 2010].

L'athérine d'Argentine, *O. bonariensis*, est un modèle intéressant de TSD strict. Lors d'un traitement pendant la période de sensibilité à la température, les populations d'athérine produisent 100% de femelles à faible température et 100% de mâles à forte température [Strüssmann *et al.*, 1997; Strüssmann *et al.*, 1996]. En parallèle, l'expression de *cyp19a1a* est au niveau le plus bas à forte température avec 100% de mâles et, à l'inverse, au niveau le plus haut à faible température avec 100% de femelles. À une température intermédiaire permettant le développement de mâles et de femelles (sex-ratio 1 :1), l'expression de l'aromatase est bimodale (faible ou forte) reflétant une population mixte [Karube *et al.*, 2007]. Cette diminution de l'aromatase est également associée à une baisse de l'expression des gènes *foxl2* et *fhsr*, le récepteur à l'hormone folliculo-stimulante [Yamaguchi *et al.*, 2007]. L'absence d'individus intersexués à des températures intermédiaires s'explique par cette expression bimodale de l'aromatase, au sein du même lot les femelles expriment fortement le gène *cyp19a1a*, à l'opposé des mâles [Ito *et al.*, 2005]. Ceci a été confirmé par la suite avec l'utilisation d'un inhibiteur de l'aromatase ou par un traitement E2 [Fernandino *et al.*, 2008]. Chez l'athérine d'Argentine, la modulation de l'expression de l'aromatase, et par conséquent son activité enzymatique, est la principale voie de masculinisation.

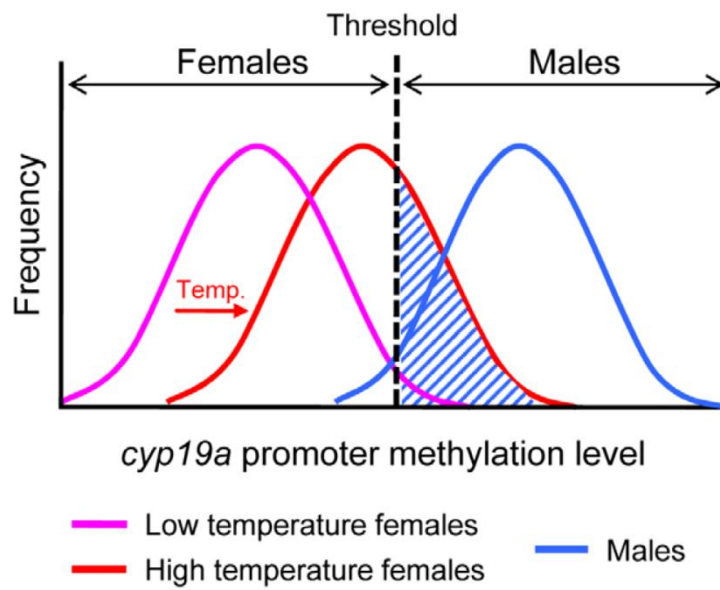


Fig. 7: Taux de méthylation du promoteur *cyp19a1* en fonction de la température chez le Bar [Navarro-Martin *et al.*, 2011]. En augmentant la température, le taux de méthylation augmente et provoque la masculinisation des femelles (la partie hachurée correspond aux femelles masculinisée).

Chez plusieurs espèces de poissons, dont le tilapia du Nil (GSD+TE) et la truite arc-en-ciel (GSD), l'inhibition de l'activité enzymatique de l'aromatase induit une masculinisation d'individus XX [Piferrer *et al.*, 1994; Guiguen *et al.*, 1999; Kitano *et al.*, 2000; Kwon, 2002; Uchida *et al.*, 2004; Singh, 2013]. Chez le poisson zèbre, l'effet de la température est similaire à l'utilisation d'un inhibiteur enzymatique de l'aromatase, avec une apoptose des ovocytes conduisant à la différenciation de l'ovaire juvénile en testicule comme chez les mâles témoins [Uchida *et al.*, 2004]. Chez le tilapia et le bar européen, l'expression de certains gènes importants de la différenciation sexuelle reflètent le phénomène de masculinisation par la température avec une baisse de l'expression de l'aromatase et une augmentation de l'expression de la 11beta-hydroxylase [D'cotta *et al.*, 2001; D'Cotta *et al.*, 2001].

Le seul effet direct pouvant expliquer la masculinisation par l'augmentation de la température a été découvert chez le Bar européen, *D. labrax*, à déterminisme GSD+TE. En comparant les taux de méthylation du promoteur de l'aromatase gonadique, Navarro *et al.*, [2011] ont observé que le taux de méthylation du promoteur de *cyp19a1a* était faible chez la femelle contrairement au mâle (**Fig. 7**). La méthylation réprimant l'expression des gènes, un faible taux de méthylation du promoteur est nécessaire pour permettre une forte expression de l'aromatase. En augmentant la température, ce taux de méthylation augmente induisant la répression de l'expression de *cyp19a1a* dans la gonade et donc l'apparition de mâles. De façon intéressante, cela n'a pas d'effet sur le promoteur de *cyp19a1a* dans le cerveau indiquant que l'effet de la température sur la méthylation n'est pas global. Cette méthylation empêche l'action positive des co-facteurs SF-1 et Foxl2 sur l'expression de l'aromatase *in vitro*.

Que ce soit directement ou indirectement l'expression de *cyp19a1a* est au cœur des mécanismes de masculinisation par la température.

B. CORTISOL, UN FACTEUR MASCULINISANT

Depuis peu la relation entre la température et le taux de cortisol circulant a été associée à la masculinisation de certaines espèces de poissons. Aussi bien chez une espèce à TSD strict comme l'athérine d'Argentine [Hattori *et al.*, 2009] ou des espèces à GSD+TE comme le cardeau hirame [Yamaguchi *et al.*, 2010] et le médaka [Hayashi *et al.*, 2010], la hausse de la température en condition masculinisante s'accompagnent d'une hausse du cortisol circulant.

Chez le médaka par exemple, l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse des corticostéroïdes inhibe complètement la masculinisation à haute température renforçant cette hypothèse d'un rôle majeur du cortisol dans la masculinisation induite par la température [Hayashi *et al.*, 2010]. De plus cet effet masculinisant du cortisol ou de la température peut être contré par un traitement E2, ce qui indique que le cortisol induit la masculinisation en inhibant l'aromatase [Kitano *et al.*, 2012]. Finalement il a été démontré que le cortisol inhibe directement l'expression de *cyp19a1a* par le récepteur aux glucocorticoïdes ; celui-ci se lie uniquement au promoteur aromatase d'alevins XX exposés à température élevée [Yamaguchi *et al.*, 2010].

Une récente étude combinant une exposition *in vivo* et *in vitro* à des températures masculinisantes chez l'athérine d'Argentine associe la hausse de cortisol circulant en température masculinisante à une hausse de 11KT en favorisant l'expression de *hsd11b2*, enzyme responsable de la synthèse de la 11KT [Fernandino *et al.*, 2012].

C. IMPLICATION DES CELLULES GERMINALES DANS LA DIFFÉRENCIATION DE LA GONADE CHEZ LES POISSONS

La plupart de ces études, citées précédemment, sur l'impact de la température ont été réalisées en laboratoire dans des conditions peu similaires à l'environnement des poissons lors leur différenciation sexuelle. La hausse de température peut se traduire par une mortalité plus élevée chez le Tilapia [Craig *et al.*, 1996; Kwon, 2002], une dégénération des cellules germinales plus importante chez les femelles de l'Athérine d'Argentine [Ito *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2008], ou bien l'apoptose des ovocytes comme chez le poisson zèbre [Uchida *et al.*, 2004]. Cette diminution du nombre des cellules germinales peut entraîner la masculinisation chez des espèces comme le médaka et le poisson zèbre [Kurokawa *et al.*, 2007; Rodríguez-Marí *et al.*, 2010].

Chez le Fugu, *Takifugu rubripes*, une espèce dont la température n'affecte pas la différenciation ovarienne, la hausse de température induit également une dégénération gonadique par la dégénérescence des cellules germinales (expression de *vasa* non détectée). Bien qu'il n'y ait pas une masculinisation dans ces ovaires dégénérés sans CG, *dmrt1* est exprimé dans les cellules somatiques [Lee *et al.*, 2009].

Chez le poisson zèbre, la lignée mutante *fanc1*^{-/-} [Rodríguez-Marí and Postlethwait, 2011] est caractérisée par une apoptose anormale des cellules germinales qui aurait pour conséquence la masculinisation de ces mutants. L'apoptose des ovocytes a également été observée chez des lignées non mutantes exposées à forte température induisant la masculinisation de ces poissons [Uchida *et al.*, 2004]. De même chez l'athérine d'Argentine, la hausse de température induit l'apoptose et une perte des cellules germinales plus importante chez les femelles que chez les mâles [Ito *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2008]. Chez le Cardeau, la température induit l'expression d'un inhibiteur de la méiose *cyp26b1* (inhibiteur de la voie de l'acide rétinolique) et retarde son initiation par une augmentation du cortisol pendant la période de différenciation sexuelle [Yamaguchi and Kitano, 2012]. De façon similaire chez le médaka, une forte température et le cortisol inhibent la prolifération des cellules germinales [Hayashi *et al.*, 2010].

III. MUTATIONS AFFECTANT LE PHÉNOTYPE SEXUEL

De nombreux gènes impliqués dans la détermination et la différenciation du sexe ont été découverts grâce à l'étude de patients présentant une inversion du sexe ou des troubles de la reproduction chez l'humain, et également par l'étude de mutants chez d'autres mammifères [Vaiman and Pailhoux, 2000; Veitia *et al.*, 2001; Morrish and Sinclair, 2002; Jiménez *et al.*, 2013]. C'est par exemple par ce biais que *SRY* qui est le déterminant majeur du sexe chez les mammifères a été découvert chez des patients hommes XX [Sinclair *et al.*, 1990]. Ces mutations conduisent à un développement sexuel anormal appelé DSD pour « Disorder of Sexual Development » en pathologie humaine. Ces mutations peuvent altérer le phénotype sexuel à 2 niveaux : la détermination du sexe induisant une inversion totale du sexe (femmes XY et hommes XX) ou une altération des caractères sexuels secondaires (DSD à degrés variables, par ex : femme XX avec testicules et homme XY avec ovaires, hypospadias, défaut de développement des organes sexuels). L'étude de ces pathologies apporte une notion supplémentaire à la connaissance de la différenciation gonadique qui est celle du dosage des gènes de la différenciation sexuelle puisque certaines de ces pathologies DSD sont décelées chez des patients porteurs de mutations soit à l'état hétérozygote, soit à l'état homozygote. Cela est notamment le cas de mutations touchant *DMRT1*, *SF1*, *DAX1* et *WNT4*.

***SRY* (Sex-determining Region on the Y chromosome): (mammifères et marsupiaux uniquement)**

L'analyse de patients de type hommes XX, femmes XY et de cas plus complexe de DSD a permis de cartographier et d'identifier le déterminant majeur du sexe chez l'humain [Jager *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990]. Ce gène appelé *SRY* a ensuite été démontré comme étant suffisant pour l'initiation de la différenciation testiculaire par des expériences de surexpression par transgénèse chez des souris XX [Gubbay *et al.*, 1990; Zhao and Koopman, 2012]. Ce gène *SRY* est exprimé dans les cellules de Sertoli et va déterminer le sexe de l'individu en initiant la cascade de différenciation par l'intermédiaire de *sox9* [Kent *et al.*, 1996; De Santa *et al.*, 1998]. Selon le type de mutation portée par ces patients sur le gène *SRY* (altérant un domaine conservé ou non), le phénotype associé peut aller d'une inversion totale du sexe à une altération des fonctions de reproduction comme une dysgénésie gonadique ou le syndrome de Turner (XO), avec une pénétrance incomplète suggérant l'implication d'autres gènes dans ces phénotypes [Zhao and Koopman, 2012].

Sox9 (SRY (sex determining region Y)-box 9):

Sox9 est un facteur de transcription indispensable à la différenciation testiculaire, c'est un des premiers marqueurs des cellules de Sertoli et la première cible de la protéine SRY. Chez les humains et les souris, la féminisation des patients XY atteints de dysplasie campomélique est causée par des mutations dans et autour du gène *Sox9* [Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994]. Parallèlement, les patients XX atteints de dysplasie campomélique présentent un développement ovarien normal [Foster *et al.*, 1994]. L'explication de cette pathologie serait due à une haplo insuffisance de *SOX9* plutôt qu'à un effet dominant négatif chez les humains [Olney *et al.*, 1999]. A l'opposé, la masculinisation partielle du sexe chez un patient XX a été attribuée à la duplication de *SOX9* [Huang *et al.*, 1999]. Comme pour *Sry*, l'utilisation de souris transgéniques surexprimant *Sox9* ou inactivées pour *Sox9* a démontré que ce gène était suffisant et nécessaire à la différenciation testiculaire.

WT1 (Wilms' tumor):

WT1 est requis pour l'établissement de la gonade bipotente puis dans le développement testiculaire chez les mammifères. Chez les humains, la mutation de ce gène est associée à 2 pathologies : le syndrome de Denys-Drash et le syndrome de Frasier. Ces patients présentent une néphropathie, des tumeurs de Wilms (néphroblastome), des troubles du développement urogénital, et parfois des inversions sexuelles XY confirmant le rôle de WT1 dans le développement gonadique et le développement du testicule [Barbaux *et al.*, 1997; Little *et al.*, 1993; Klamt *et al.*, 1998].

AMH (anti müllerian hormone):

L'hormone antimüllérienne (*Amh*), est une glycoprotéine de la famille des TGF β sécrétée par les cellules de Sertoli. Elle est exprimée dans les futures cellules de Sertoli sous action de Sox9 [Sekido and Lovell-Badge, 2008]. Elle est impliquée dans la régression des canaux de Müller chez les mâles, et va participer à la différenciation sexuelle du tractus génital secondaire chez les mammifères. Chez l'humain et la souris, les mutations de l'*AMH* ou de ses récepteurs n'induisent pas d'inversion sexuelle mais une persistance des canaux de Müller parfois associée à des cas de cryptorchidies [Josso *et al.*, 2005]. Bien que le début d'expression de l'*amh* varie entre les espèces, il est associé à la masculinisation car il est exprimé de façon sexuellement dimorphique en faveur des mâles [Siegfried, 2010].

Mutation Hotei chez le médaka

Récemment, l'analyse systématique de mutations spontanées après mutagenèse chez le Médaka a permis de découvrir des cas d'inversion sexuelle chez une lignée particulière appelée hotei ; cette lignée étant caractérisée par une mutation du récepteur de type II de l'*Amh* [Morinaga *et al.*, 2007]. Le défaut de signalisation d'*AMH/AMHRII* induit une prolifération anormale des cellules germinales qui aboutit à la féminisation d'individus XY. De plus une étude récente a démontré que la voie *AMH/AMHRII* stimule la prolifération des cellules germinales sans recruter les cellules quiescentes [Nakamura *et al.*, 2012], ceci confortant le rôle important de cette voie de signalisation sur la prolifération des cellules germinales.

Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor 1)

Dmrt1 est un facteur de transcription dont l'implication dans la différenciation testiculaire est conservée à travers l'évolution [Herpin and Scharf, 2011]. Il aurait un rôle dans l'inversion sexuelle de patients XY avec une délétion de la région SRA 9p, mais cela n'a jamais été formellement démontré évoquant plutôt qu'une dose seuil de *dmrt1* serait nécessaire à la masculinisation [Veitia *et al.*, 2001]. Mais un cas récent associe une mutation de *Dmrt1* à une dysgénésie gonadique partielle chez un patient XY [Mello *et al.*, 2010]. Cette notion d'effet dose de *Dmrt1* a par ailleurs été suggérée comme pouvant expliquer le système de détermination sexuelle chez le poulet, car *Dmrt1* est porté par le chromosome Z chez cette espèce [Smith *et al.*, 2009].

Chez le médaka dont le sexe mâle est déterminé par *dmrt1-Y*, les analyses des phénotypes associés à des mutations du gène autosomal *dmrt1* a situé l'action de celui-ci après le début de la différenciation gonadique. Dans cette lignée mutante pour *dmrt1*, les poissons XY développent d'abord des testicules qui vont se différencier par la suite en ovaires, indiquant que *dmrt1* a un rôle primordial dans le maintien de la différenciation testiculaire [Masuyama *et al.*, 2012].

Mutation Fancl chez le poisson zèbre

Des gènes de la différenciation sexuelle ont également été découverts par l'analyse de mutants chez les poissons, comme par exemple la mutation de *Fancl* chez le poisson zèbre [Rodríguez-Marí *et al.*, 2010]. *Fancl* est un membre de la famille de voie de signalisation de réparation de l'ADN Fanconi Anemia/BRCA. La lignée mutée produit exclusivement des mâles par induction de l'apoptose des cellules germinales [Rodríguez-Marí and Postlethwait, 2011]. Ce phénomène révèle un mécanisme connu pour le moment chez certains poissons uniquement, où le nombre de cellules germinales va influencer le devenir du sexe car les femelles présentent naturellement une prolifération des cellules germinales plus importante.

SF1 (SF1, NR5A1, Ad4BP) Steroidogenic Factor 1 :

Le gène SF-1 (Steroidogenic Factor 1) code pour un récepteur nucléaire orphelin, NR5A1 ou Ad4BP selon la nomenclature [Lala *et al.*, 1992]. C'est un facteur de transcription pléiotrope régulant l'expression de gènes de l'axe corticotrope, gonadotrope et du système nerveux central [Martinierie *et al.*, 2009]. Vingt-deux mutations sont connues chez l'homme et la gravité des pathologies associées à ces mutations varient en fonction du domaine de la protéine qui est affecté. La plupart du temps ces mutations sont associées à des DSD, c'est-à-dire soit des cas de femmes XY avec ou sans dysgénésie gonadique et insuffisance surrénalienne [Achermann *et al.*, 1999], soit des cas de femmes XX présentant une dysgénésie gonadique, une insuffisance surrénalienne et une insuffisance ovarienne prématurée (IOP).

FOXL2 (forkhead box L2)

Parmi les gènes de la différenciation sexuelle femelle, FOXL2 est un facteur de transcription spécifique de la différenciation ovarienne. C'est un des rares gènes commun à plusieurs espèces de vertébrés dont la truite [Baron *et al.*, 2004]. Chez les patients avec une mutation de FOXL2, la pathologie clinique la mieux décrite est le syndrome Blepharophimosis Ptosis Epicantus inversus (BPES) de type I. Il est associé à une malformation des paupières et à une infertilité due à une IOP chez les femmes XX. Chez les chèvres XX porteuses du syndrome PIS (Polled intersex syndrome) une mutation de FOXL2 a été associée à une inversion du sexe [Pailhoux *et al.*, 2001]. Ces chèvres XX PIS^{-/-} sont des mâles phénotypiques sans corne et les PIS^{+/-} sont intersexués. Ce phénotype est associé à la délétion de la région chromosomique PIS qui contient les gènes codants pour FOXL2, PISRT1 and PFOXIC. Même si FOXL2 était fortement suspecté d'être le gène causal associé à ce phénotype d'inversion sexuelle, la preuve formelle n'avait pas été apportée chez la chèvre. Cette preuve a récemment été générée par la production d'une chèvre XX dont le gène FOXL2 a été inactivé spécifiquement par Knock down (Pailhoux, communication personnelle, 6^{ième} congrès de la détermination du sexe chez les vertébrés, Avril 2012).

Wnt4 (Wingless-type MMTV integration site family, member 4):

Wnt4 est un membre de la famille des facteurs de croissance Wnt. Une duplication de Wnt4 a été trouvée chez une femme XY ; Wnt4 agirait donc avec un effet dose sur la différenciation ovarienne [Jordan *et al.*, 2001]. Des recherches d'inactivations de gènes chez la souris ont abouti à une masculinisation partielle d'individus XX [Vainio *et al.*, 1999] indiquant que ce gène jouerait un rôle clefs précocement dans la différenciation femelle

Par la suite, d'autres gènes de la différenciation ovarienne ont été bien documentés, notamment par la voie Wnt/ β caténine, (voir pour revue [Quinn and Koopman, 2012]).

RSPO1 (R-spondine 1) :

Les inversions sexuelles XX sont extrêmement rares chez l'humain et sont surtout associées à une translocation de SRY. L'étude d'une fratrie d'hommes XX sans copie du gène SRY n'a révélé qu'une seule et unique mutation : une délétion sur le gène codant pour RSPO1 associée à une hyperkératose palmo-plantaire et parfois des carcinomes épithéliaux [Parma *et al.*, 2006]. Ce facteur de croissance de la famille des R-spondine agit sur la voie de signalisation des Wnt/ β caténine, en réprimant *SOX9* dans la différenciation ovarienne.

DAX1 (dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region of the X chromosome, gene 1):

DAX1 est un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Ce facteur de transcription, lié au chromosome X, est capable d'inhiber l'expression de SF1. Il est d'abord apparu comme un facteur anti-testiculaire du fait des premières pathologies associées découvertes. Les patients XY avec une duplication de DAX1 sont partiellement féminisés, tandis que ceux portant une mutation/délétion sur la même région du gène présentent des dysfonctionnements de l'axe stéroïdogène, comme l'hypoplasie congénitale surrénalienne (AHC), et ainsi que des troubles de la reproduction comme l'hypogonadisme [Muscatelli *et al.*, 1994; Bardoni *et al.*, 1994]. Ceci indique un rôle certain de DAX1 dans la différenciation ovarienne, mais paradoxalement il est également requis pour la différenciation testiculaire [Meeks *et al.*, 2003a; Meeks *et al.*, 2003b]. En effet, l'inactivation de DAX1 chez les souris Y^{pos} (souche portant un allèle déficient de SRY exprimé en retard dans la différenciation du sexe, et présentant parfois des ovotestis) induit également un trouble de la différenciation testiculaire, ce qui indique que l'action de DAX1 varie en fonction de la fenêtre d'expression et de son dosage au cours de la différenciation sexuelle [Ludbrook and Harley, 2004].

Selon le fond génétique des patients, la pathologie associée aux mutations de gènes de la différenciation sexuelle présente divers degrés de sévérité. Cela peut être uniquement une inversion totale du sexe sans danger pour la santé, mais majoritairement il s'agit de troubles de la reproduction associés à des tumeurs lorsque ces mutations atteignent des gènes pléiotropes comme SF1. C'est d'ailleurs de cette façon que la plupart des pathologies a été découverte.

La mutation *mas* chez la carpe, *Cyprinus carpio*.

Chez la carpe commune qui est une espèce de poisson à GSD, la mutation récessive *mas* induisant une masculinisation de femelles génétiques, a été découverte dans la descendance de clones gynogénétiques XX supposés être tous femelles [Komen *et al.*, 1992a]. D'un point de vue génétique, ce phénotype serait dû à une mutation causale unique récessive, avec des femelles hétérozygotes $XX_{mas-1}/mas+$ et des animaux masculinisés (mâles ou intersexués) $XX_{mas-1}/mas-1$. Mais la variabilité du taux de masculinisation (apparition de mâles ou d'intersexués) entre les croisements semble dépendre en grande partie du fond génétique de la femelle utilisée. De plus, l'apparition récurrente de quelques animaux intersexués chez les carpes $XX_{mas-1}/mas+$ suggère l'implication éventuelle de facteurs externes, comme la densité en poissons ou la quantité de nourriture [Komen *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2002].

Le développement des gonades des carpes $XX_{mas-1}/mas-1$ de cette lignée masculinisée peut être subdivisé en 2 catégories [Komen *et al.*, 1992b]: (1) des mâles avec un raccourcissement du délai d'entrée en méiose par rapport aux XY témoins avec un développement d'un testicule normal ou (2) des intersexués qui développeront des ovotestis caractérisés par une entrée en méiose précoce surtout dans la partie antérieure de la gonade, simultanée à celle observée chez des femelles contrôles. Pour expliquer ce phénotype, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une mutation sur un seul locus, *mas*, dont la conséquence principale serait une expression retardée ou avancée d'un acteur de la différenciation sexuelle.

Les animaux homozygotes XX pour *mas* présentent un hypocorticisme associé à une hyperplasie du tissu interrénal, qui est un des sites majeurs de synthèse des hormones corticostéroïdes [Ruane *et al.*, 2005]. Même si cela n'a pu être directement relié à la masculinisation de ces animaux, ces résultats peuvent suggérer un dysfonctionnement de la production des hormones stéroïdiennes comme c'est le cas pour beaucoup de pathologies humaines présentant des symptômes similaires. Étant donnée l'importance majeure de ces hormones sur le processus de différenciation gonadique (voir **Introduction I-B**), cette hypothèse pourrait expliquer de façon simple le phénomène de masculinisation observé chez ces animaux.

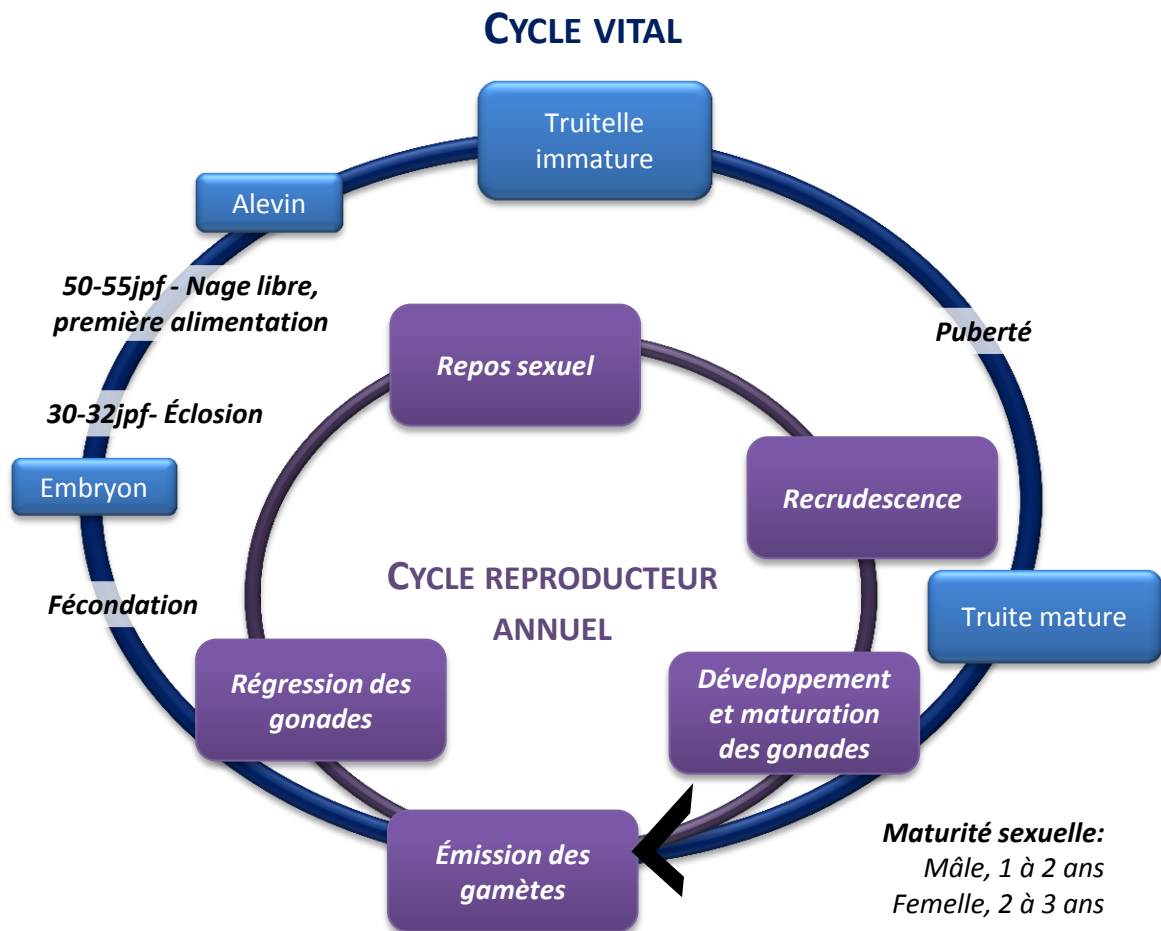


Fig. 8: Cycle de vie et cycle de reproduction de la truite arc-en-ciel [Jalabert *et al.*, 2010].

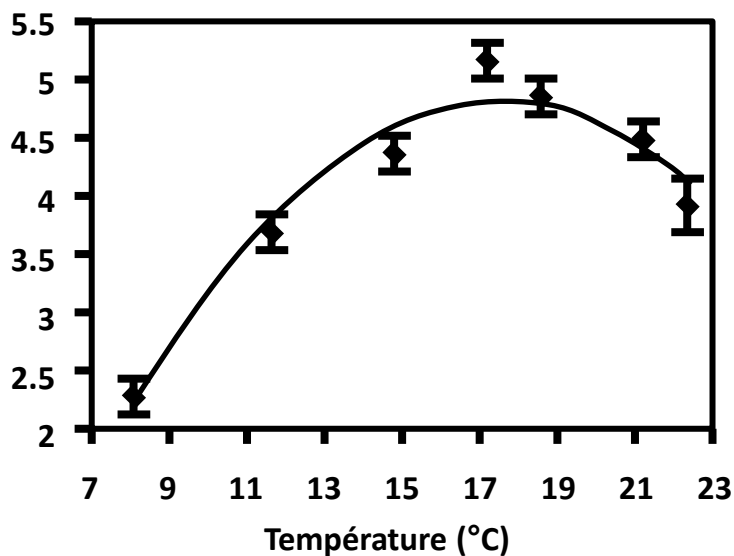


Fig. 9: Relation entre la température et le taux de croissance chez la truite arc-en-ciel nourrie *ad libitum* d'après Brett *et al.*, [1979]. La température stimule la croissance dans une gamme de tolérance thermique située entre 6 et 17°C .

IV. LA TRUITE ARC-EN-CIEL

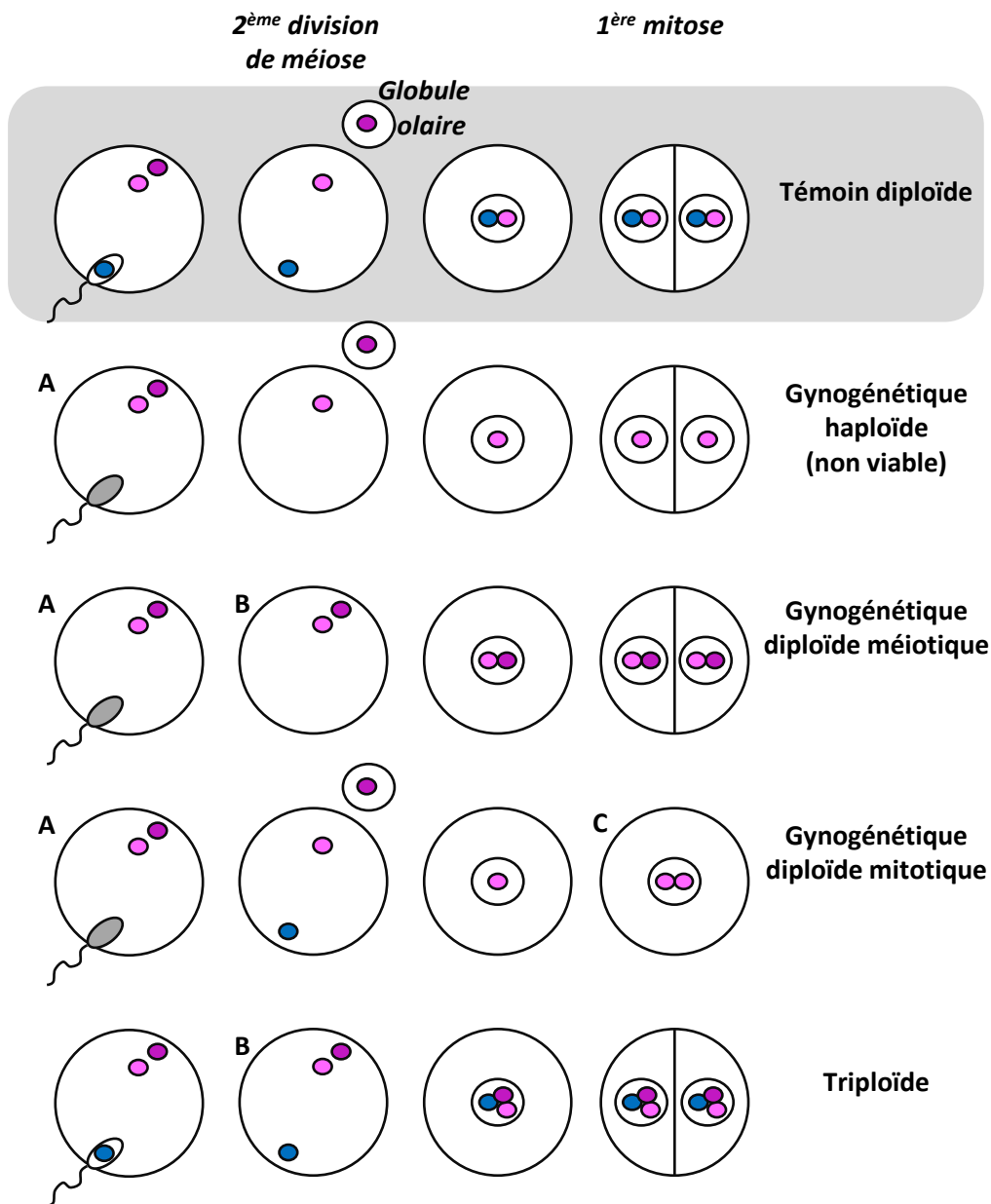
A. GÉNÉRALITÉS

Les salmonidés, dont fait partie la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), sont des poissons gonochoriques avec un système de détermination sexuel génétique à hétérogamétie mâle [Davidson *et al.*, 2009] gouverné par un déterminant majeurs du sexe appelé, *sdY* pour « Sexually Dimorphic on the Y chromosome » [Yano *et al.*, 2012a].

La truite arc-en-ciel est un carnivore d'eau douce ayant la particularité d'avoir un cycle vital long (**Fig. 8**): dans nos conditions d'élevage, élevé à 10°C, l'embryon éclot environ 30 jours après la fécondation (30 jpf), se développe à 11-12°C (conditions optimales du laboratoire) et épuise ses réserves vitellines entre 50 et 55 jpf. Dès lors l'alevin va s'alimenter, croître et devenir une truitelle immature qui entrera en puberté à 1-2 ans chez le mâle et 2-3 chez la femelle ; le plus souvent respectivement à 1 et 2ans pour les souches utilisées au laboratoire.

À partir de leur première période de reproduction, les truites adultes présentent un dimorphisme sexuel externe caractéristique avec, entre autres, la présence d'une excroissance de la mâchoire inférieure appelée bécard chez le mâle, une couleur du corps gris/vert avec une bande latérale orangée chez le mâle, et gris/bleu avec une bande latérale rose chez la femelle, et une différence de poids en faveur du mâle. Le cycle de reproduction des animaux matures dure une année au cours de laquelle les gonades vont successivement se développer pour produire, de façon synchrone, des gamètes et régresser après l'émission de ceux-ci. La domestication de la truite ayant entraîné la perte du comportement reproducteur, l'émission de gamètes se fait artificiellement par pression abdominale.

En plus de son intérêt piscicole, la truite arc-en-ciel est aussi un excellent modèle pour l'étude de la différenciation sexuelle. Chez cette espèce, nous disposons d'une forte production de gamètes (environ 3000 ovocytes pour une femelle de 3 ans) qui peut être étalée sur une grande partie de l'année grâce à l'utilisation combinée de souches génétiques à reproduction différée et d'un contrôle photopériodique de la saison de reproduction. De plus, ces dernières années, les outils disponibles sont une ressource génomique importante dont une banque de cDNA séquencés et assemblés ; enfin, le séquençage du génome sera bientôt assemblé. Le développement embryonnaire de la truite est relativement lent, ce qui facilite également les études chronologiques sur cette période embryonnaire particulièrement importante pour l'étude des mécanismes de différenciation de la gonade. Enfin, nous disposons pour cette espèce de populations monosexes génétiques mâles (XY) ou femelles (XX) qui sont des modèles d'étude intéressant pour l'analyse de la différenciation du sexe. Par contre, la durée relativement longue de son cycle de reproduction ne fait pas de la truite un modèle de choix pour les études génétiques incluant la construction de lignées transgéniques ou mutées.



- A - Destruction du génome paternel
- B - Inhibition de la 2^{ème} division de méiose par rétention du second globule polaire
- C - Blocage de la 1^{ère} mitose embryonnaire

Fig. 10: Manipulation génétique chez le poisson : Gynogénèse et Triploïdie [Breton *et al.*, 1996].

La fécondation aboutit à la production d'un individu diploïde ayant reçu un exemplaire de chaque paire de chromosomes provenant de la mère et du père. Chez certaines espèces aquacoles comme les salmonidés, il est possible de produire des individus avec un stock génétique provenant exclusivement de la mère par gynogénèse : (A) fécondation d'un ovocyte avec du sperme inactivé par traitement aux UV. La méiose de l'ovocyte s'achève avec l'expulsion du 2^{ème} globule polaire lors de la fécondation. L'utilisation du sperme inactivé aboutit à un zygote haploïde qui n'est pas viable. Il faut rétablir la diploïdie après une gynogénèse soit (B) par rétention du 2^{ème} globule polaire (gynogénèse méiotique), soit (C) par inhibition de la 1^{ère} mitose embryonnaire (gynogénèse mitotique). Les individus issus de gynogénèse seront tous femelles XX.

B. ÉLEVAGE, CONDITIONS ET TECHNIQUES EMPLOYÉES

Avec une production mondiale de 730 000 tonnes en 2010 (source FAO ©), l'élevage de la truite arc-en-ciel représente également la première production piscicole en France. Ce poisson vit dans des eaux froides et peut supporter de grandes variations de température (0-21°C), mais les conditions optimum d'élevage se trouvent environ à 10°C avant et entre 15-17°C après l'éclosion. Le cycle reproducteur de la truite est majoritairement dépendant de la photopériode, mais il est aussi sensible aux variations saisonnières de la température de l'eau [Jalabert and Fostier, 2010].

Température d'élevage.

La truite étant un animal poïkilotherme, la température influe sur le développement précoce [Garside, 1966a; Kwain, 1975], la croissance [Brett, 1979; Gabillard *et al.*, 2003] et les étapes précoces du cycle de reproduction [Billard and Breton, 1977].

Ainsi l'éclosion peut être retardée de plusieurs jours voire plusieurs semaines en abaissant la température de l'eau (93 jpf à 2,5°C contre 31 jpf à 10°C [Garside, 1966a]). C'est la raison pour laquelle la notion de degrés x jours (°Cj), unité combinant la température de l'eau d'élevage au nombre de jours écoulés depuis la fécondation, est souvent prise en compte dans les piscicultures pour prévoir les dates d'éclosion. La température d'incubation des œufs est cruciale et doit être comprise entre 7°C et 10°C pour avoir le meilleur taux de survie à l'éclosion [Kwain, 1975].

À partir de l'éclosion, la croissance est stimulée de manière linéaire dès 3°C jusqu'à 15°C [Kwain, 1975], avec un optimum situé entre 12 et 17°C (**Fig. 9**). Mais il ne faut pas négliger le zéro physiologique qui n'est pas de 0°C car la croissance est quasi-nulle en dessous de 3°C.

Au cours des différentes saisons, la température et la photopériode varient et influencent le cycle reproducteur [Breton *et al.*, 1980]. L'entrée en gamétogénèse a lieu en période « froide » janvier-avril, puis le développement et la maturation des gonades dans des eaux chaudes entre juin-juillet et septembre-octobre ; au contraire la fécondation et le développement embryonnaire ont lieu en hiver dans des eaux froides. Une température élevée constante (13-18°C) appliquée pendant la gamétogénèse améliore l'efficacité de la spermatogénèse et avance l'ovogénèse chez des animaux adultes (2-3ans) [Billard and Breton, 1977]. Au contraire, en fin de cycle, cette température élevée inhibe la spermiation, la maturation ovocytaire et l'ovulation.

Pour conclure, l'élévation de température, dans les limites physiologiques, a une action favorable sur la croissance et la gamétogénèse, période de plus forte croissance de la gonade. Il est à noter toutefois que pendant la maturation finale des géniteurs et l'incubation des œufs, la température doit se situer entre 10 et 12°C.

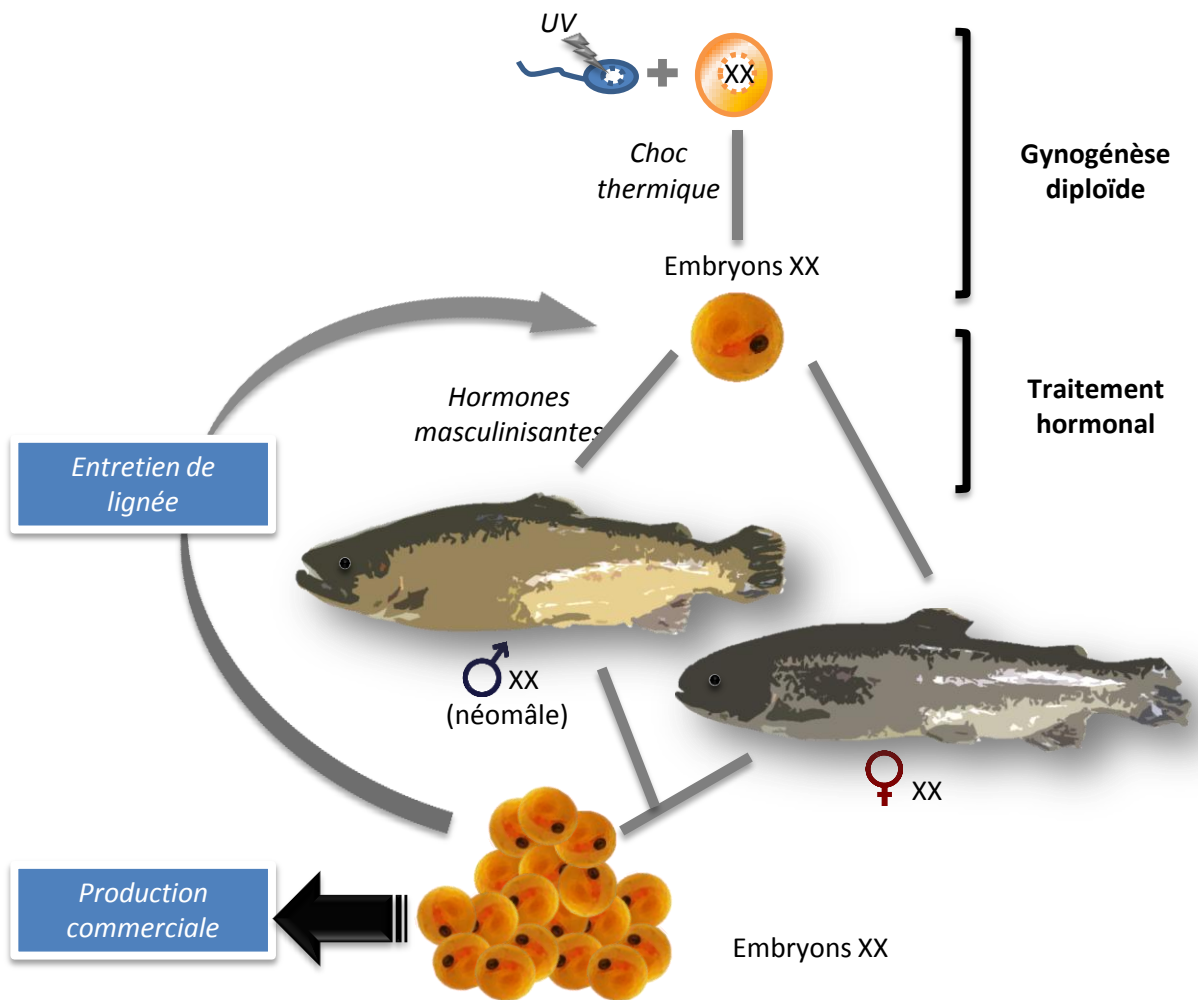


Fig. 11: Production de population monosex femelle [Chevassus *et al.*, 1979]. Le système repose sur la production d'animaux XX par gynogénèse suivie de la production « néomâles » XX (femelles génétiques inversées par des hormones masculinisantes : 11 β hydroxy androsténédione) qui serviront de géniteurs et seront croisés avec des femelles XX pour aboutir à une descendance exclusivement femelle. Les embryons XX destinés à la production commerciale peuvent être triploïdisés par application d'un traitement complémentaire juste après la fécondation.

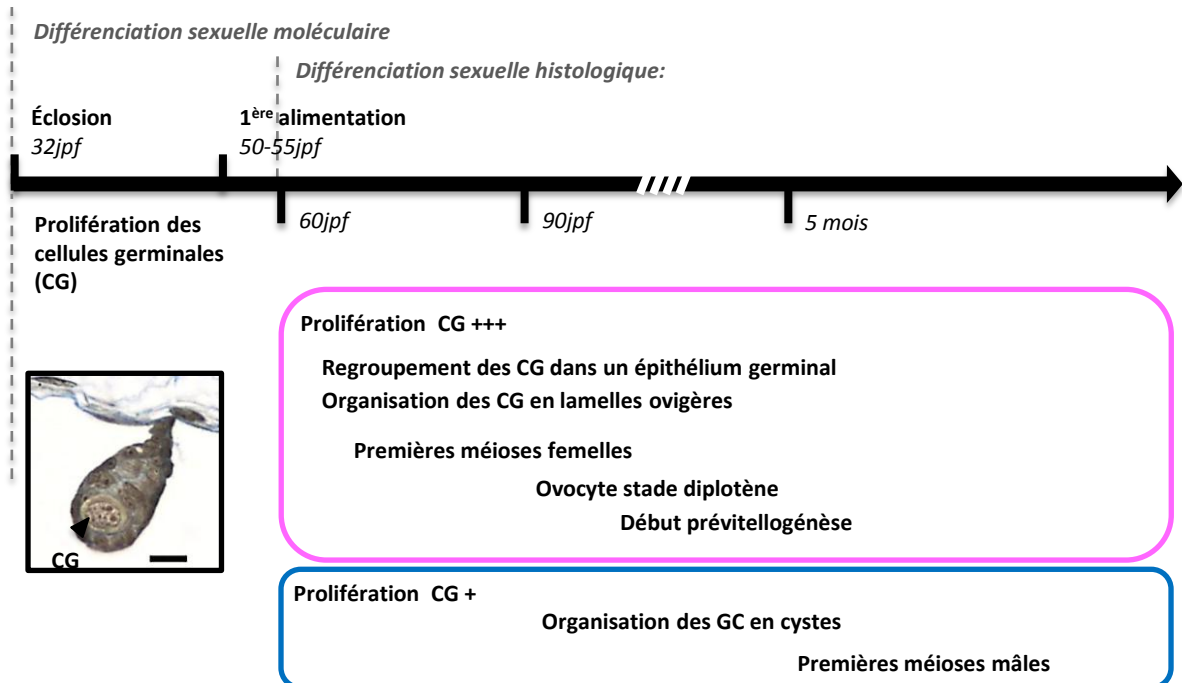
Manipulations génétiques

Plusieurs caractéristiques de la biologie de la truite en font une espèce à fort intérêt agronomique : production simultanée de milliers d'œufs (1000-1500 ovocytes/kg de truites), des conditions d'élevage relativement faciles et un contrôle du sexe possible grâce au GSD. Parmi les différentes manipulations génétiques possibles, il y a la gynogénèse diploïde et l'induction de la triploïdie (**Fig. 10**). Bien que la gestion des géniteurs dépende de la stratégie d'élevage, les animaux destinés à la croissance sont majoritairement en France des femelles gynogénétiques triploïdes.

Les animaux triploïdes sont obtenus par rétention du 2^{ème} globule polaire. Cette triploïdie va perturber le développement des gonades, notamment en bloquant la méiose. En conséquence les animaux triploïdes XXX seront stériles et ne développeront pas de gonades contrairement aux XXY. La triploïdisation est avantageuse chez les femelles car le développement des gonades peut représenter jusqu'à 20% de la masse corporelle totale.

Pour des raisons économiques, les pisciculteurs privilégient donc l'élevage de populations monosexes femelles à partir de géniteurs femelles XX et néomâles XX (**Fig. 11**). Selon la réglementation européenne, seuls les géniteurs sont exposés à des traitements hormonaux et non la descendance destinée à la consommation. Néanmoins, l'utilisation de stéroïdes sexuels, même seulement pour produire des néomâles qui ne seront pas commercialisés, mériterait d'être remplacée par une technique non hormonale pour différentes raisons : limitation des risques sanitaires lors de la manipulation des stéroïdes, limitation des risques d'impacts environnementaux, amélioration de l'image de la filière piscicole. Dans un contexte de mise en place d'une aquaculture favorisant le développement durable, il serait intéressant de trouver des alternatives à l'utilisation de stéroïdes pour la maîtrise du sexe.

Pour l'expérimentation, des populations monosexes mâles peuvent être produites par croisement de femelles XX et de supermâles YY. Ceux-ci sont produits à partir de truites XY féminisées avec de l'œstrone et croisées avec des mâles XY pour obtenir des œufs XY et YY. Le tri des supermâles YY est fait à partir de l'analyse de leurs descendance composée uniquement de mâles XY.



Gènes de la différenciation sexuelle :

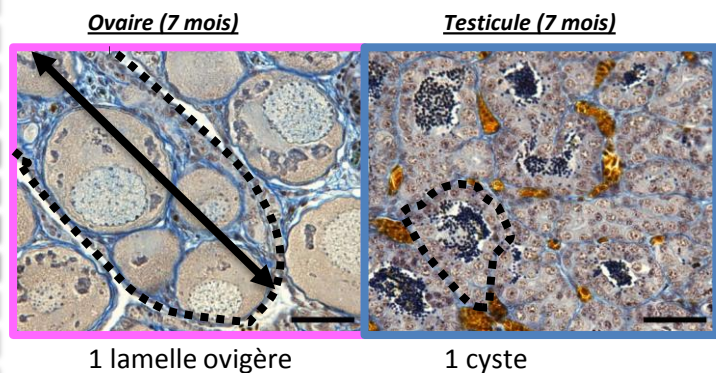
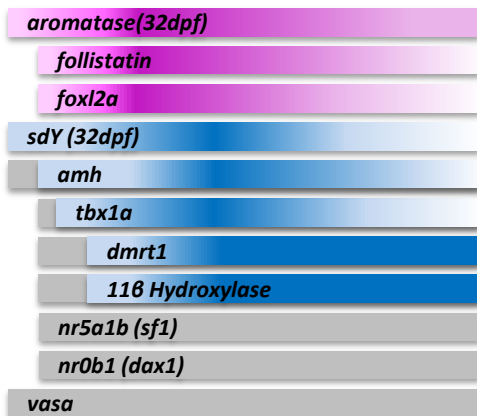


Fig. 12: Cinétique de la différenciation sexuelle. Les évènements précoces spécifique du sexe de la gonade sont uniquement détectables au niveau moléculaire. Les premiers signes de différences histologiques apparaissent quelques jours après la 1^{ère} alimentation chez la femelle

C. DIFFÉRENCIATION DU SEXE

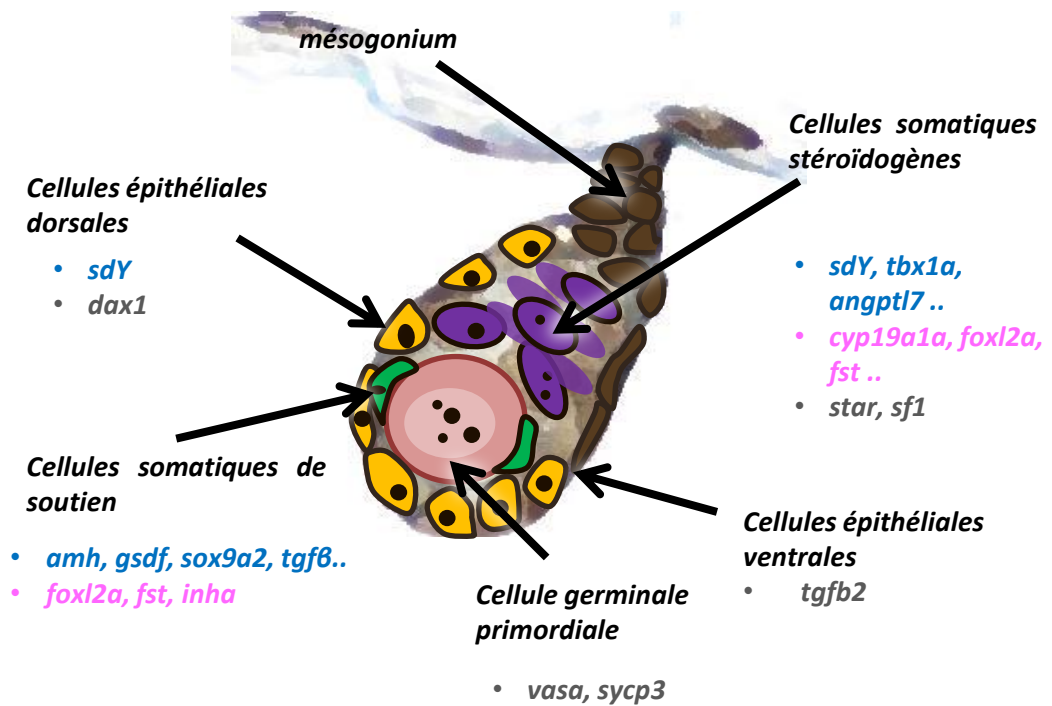
Les truites juvéniles ne présentent pas de dimorphisme sexuel morphologique ou lié au poids. La différence entre sexe est d'abord détectable au niveau de l'expression de gènes dans la gonade embryonnaire (période dite de différenciation moléculaire) avant de présenter une morphologie particulière observable en histologie (période dite de différenciation histologique de la gonade) (Fig. 12).

Cinétique histologique de la formation de la gonade et différenciation sexuelle

Durant les premières étapes de développement des gonades, celles-ci sont histologiquement indifférenciées. À partir de l'éclosion, les cellules germinales primordiales (CGP) vont coloniser la crête génitale [Brusle and Brusle, 1983] et proliférer selon un gradient antéropostérieur au sein d'un tissu de soutien composé de cellules somatiques. Ce tissu de soutien est finement organisé et composé à *a priori* d'au moins 4 types cellulaires: des cellules somatiques stéroïdogènes situées à la base de la gonade (plutôt sur sa face interne), des cellules somatiques de soutien entourant les CGP, des cellules épithéliales dorsales cuboïdes et des cellules épithéliales ventrales allongées (Fig. 13). La gonade est alors un long filament attaché par le mésogonium le long de la paroi dorsale de la cavité coelomique. Les CGP bipotentes, qui dépendent de leur environnement cellulaire pour se différencier [Yoshizaki *et al.*, 2010a], vont proliférer sans différence entre mâles et femelles avant 700°Cj (60 jpf à 10-12°C) [Nagler *et al.*, 2011], puis cette prolifération va s'intensifier chez ces dernières [Lebrun *et al.*, 1982].

Les premiers critères sexuels observables en histologie dans ces gonades en cours de différenciation sont uniquement des critères visibles chez les femelles, dont la gonade développe une morphologie particulière au moment de la 1^{ère} alimentation (55-60 jpf) [Takashima *et al.*, 1980; Van den Hurk and Slof, 1981; Lebrun *et al.*, 1982]. On peut observer le regroupement des cellules germinales dans la partie dorsale de la gonade au sein d'un épithélium germinal délimité par une lame basale (formée par un dépôt de protéines extracellulaires, laminines, collagènes ...), puis l'entrée asynchrone en méiose des ovogonies qui resteront bloquées en prophase I (observable dès 69 jpf)[Lebrun *et al.*, 1982]. Par la suite l'épithélium germinal va s'invaginer pour former les lamelles ovigères contenant des ovocytes primaires en croissance (prévitellogenèse).

Au contraire chez le mâle, les caractéristiques testiculaires n'apparaissent que tardivement (~90 jpf) avec des spermatogonies qui s'organisent en cystes entourés de cellules de Sertoli. À partir de 5 mois, ou l'année suivante selon l'âge de la puberté des individus (1 ou 2 ans), ces unités fonctionnelles (cystes) entrent de façon synchrone en méiose avec une réduction du volume cytoplasmique des cellules germinales mâles à chaque division de méiose.



Localisation de l'expression de :

- **Gènes ovariens**
- **Gènes testiculaires**
- **Gènes non sexuellement dimorphiques**

Fig. 13: La gonade indifférenciée, un organe complexe. Les tissus somatiques entourant les cellules germinales s'organisent très tôt selon leurs fonctions : les cellules épithéliales, les cellules somatiques stéroïdogènes et les cellules somatiques de soutien des CGP.

Différenciation moléculaire précoce

L'étude des populations monosexes a permis de situer le début de la différenciation sexuelle au niveau moléculaire un mois avant les premiers signes visibles en histologie [Vizziano *et al.*, 2007]. Le territoire d'expression des gènes permet de définir différents tissus reflétant la complexité de la gonade, comme par exemple l'épithélium qui exprime différents gènes de la différenciation sexuelle selon la polarité de la gonade (**Fig. 13**). Ce type de régionalisation précoce met en évidence, au niveau moléculaire, une polarisation de la gonade visible ultérieurement dans l'ovaire, telle que la formation de l'épithélium germinale contenant les CG dans la partie dorsale.

Ainsi, une phase de sexualisation précoce de la gonade débute autour de l'éclosion (28-30 jpf). Cette phase est tout d'abord caractérisée par l'expression de *sdY*, le déterminant majeur du sexe de la truite, qui est localisé dans des cellules somatiques internes et des cellules épithéliales dorsales autour de 30 jpf [Yano *et al.*, 2012a]. Ensuite, *cyp19a1a* et *fst* sont détectées dans les mêmes cellules somatiques stéroïdogènes dès 32 jpf [Vizziano *et al.*, 2007; Nicol *et al.*, 2011]. *foxl2a* est lui localisé à la fois dans ces cellules et les cellules somatiques de soutien. Puis à 40-45 jpf, plusieurs gènes, d'abord détectés dans les 2 sexes, vont présenter une expression sexuellement dimorphique surtout chez le mâle: *amh*, *tbx1a*, *dmrt1*, *cyp11b2.1* (*11 β hydroxylase*)...

Les territoires d'expression de ces gènes définissent l'environnement dans lequel les cellules germinales vont proliférer et se différencier, soit en spermatogonies soit en ovogonies. C'est cet environnement somatique qui va influencer la différenciation de ces cellules germinales comme le démontrent les expériences de transplantations de cellules germinales [Yoshizaki *et al.*, 2010b] dans lesquelles des gonies, purifiées à partir de tissus ovariens et transplantées dans un embryon mâle, vont se développer en spermatozoïdes. Ces cellules somatiques ont donc un rôle clef puisqu'il existe un dialogue paracrine avec les cellules germinales. Parmi ces cellules somatiques, les cellules de soutien qui deviendront les futures cellules de granulosa ou de Sertoli jouent probablement un rôle particulier dans ce dialogue avec les cellules germinales. Chez les poissons, les expériences d'inversion du sexe par des stéroïdes démontrent que le contrôle endocrine peut passer outre le déterminisme génétique du sexe, relevant ainsi l'importance de cellules somatiques stéroïdogènes dans la différenciation du sexe.

D. MUTATION *MAL*

Malgré un système de détermination du sexe purement génétique, des déviations du *sex-ratio* ont été observées chez la truite arc-en-ciel : par exemple avec la présence de mâles dans une descendance XX obtenue après une gynogénèse mitotique [Quillet *et al.*, 2002], mais aussi par la présence de femelles dans la descendance XY issue de supermâles YY [Chevassus *et al.*, 1988].

À la suite de la découverte de cette masculinisation spontanée d'individus XX, une étude sur 3 générations a été réalisée amenant 3 informations essentielles (**Fig.14**) :

(1) Un facteur masculinisant est présent naturellement chez des femelles de la souche synthétique ou SY (mélange de souche américaine et européenne de truites).

(2) Le caractère est récessif : absence de masculinisation lors d'un croisement avec une souche externe et un taux de masculinisation plus important après une gynogénèse mitotique (individus homozygotes à tous les *loci*) que méiotique (individus avec plus de variabilité allélique).

(3) La pénétrance est incomplète pour le phénotype masculinisé : la transmission du caractère masculinisé n'est pas mendélienne et varie d'un croisement à l'autre. Des individus supposés homozygotes pour le facteur « *mal* » ne sont pas forcément masculinisés.

Pour expliquer la plupart des résultats, l'hypothèse d'une mutation causale sur un locus mineur du déterminisme sexuel nommé *mal* a été émise. Mais du fait de la pénétrance incomplète du phénotype associé, les auteurs n'excluent pas la possibilité d'implications d'autres gènes et aussi de facteurs externes comme l'environnement.

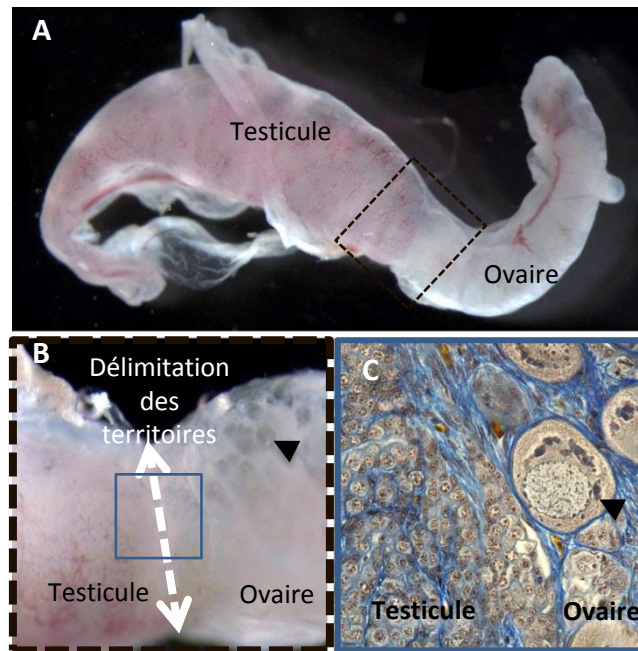


Fig. 15: Illustration macroscopique et microscopique d'un ovotestis XXmal à 7 mois.

Les gonades XXmal masculinisées sont le plus souvent des ovotestis présentant à la fois un territoire testiculaire et un territoire ovarien délimités par un tissu conjonctif. (A) et (B), observation macroscopique ; (C) coupe transversale histologique ; Ovocyte primaire en previtellogenèse (flèche noire).

À partir de ces expériences, la souche XX mal porteuse de la mutation masculinisante a été produite et maintenue dans une pisciculture expérimentale de l'INRA : la PEIMA, située à Sizun en Bretagne. Cette souche hivernale est dérivée des mâles EM1_{G2} croisés avec les filles de la femelle SY1 à l'origine de la mutation, ceci pour diminuer la consanguinité de la lignée.

Bien que fonctionnelle avec une production d'animaux fertiles, le phénotype gonadique associé est variable allant d'une masculinisation partielle avec présence d'ovotestis (**Fig. 15**) jusqu'à une masculinisation complète avec le développement de 2 testicules fonctionnels. Les truites intersexués possédant à la fois des gonades mâles et femelles, présentent également une asymétrie gauche-droite au niveau des gonades : les gonades droites sont en effet deux fois plus fréquemment masculinisées [Quillet *et al.*, 2004].

Le modèle XXmal présente plusieurs aspects intéressants pour la compréhension des mécanismes de la différenciation sexuelle : une inversion spontanée du sexe vers le mâle, un développement simultané de gonades mâles et femelles malgré des mécanismes *a priori* antagonistes et une pénétrance incomplète du phénotype masculinisé laissant supposer l'implication de facteurs externes.

En contrepartie il présente également des inconvénients expérimentaux, tels que :

- l'impossibilité de prévoir le taux de masculinisation des familles XXmal utilisées, ce qui nécessite une estimation *a posteriori* systématique du sex-ratio à des âges où la différenciation de la gonade est achevée.
- une fécondation annuelle unique contrebalancée par une importante production d'œufs (nous avons utilisés environ 1500 œufs par familles).

OBJECTIFS ET DÉROULEMENT DE LA THÈSE

Comprendre la mise en place de cette masculinisation dans une population génétiquement femelle permet de mieux cerner le ou les gènes impliqués dans le syndrome « *mal* », et peut aider à découvrir un nouvel acteur important de la cascade de différenciation sexuelle de la gonade. Pour identifier cette mutation encore inconnue à l'heure actuelle, le projet SEXYTROUT financé par l'ANR a été mis en place avec la collaboration de plusieurs équipes : l'équipe « Différenciation du Sexe et Ovogénèse » du Laboratoire de physiologie et génomique des poissons (INRA LPGP) à Rennes, l'équipe « Génétique en Aquaculture » de l'Unité Mixte de Recherche en Génétique Animale et Biologie Intégrative (INRA UMR 1313 GABI) à Jouy-en-Josas et l'équipe de « Génomique évolutive des Poissons » de l'institut de génomique fonctionnelle à Lyon.

Mon travail de thèse s'inscrit dans les premières étapes de ce projet car l'étude d'une mutation nécessite au préalable de bien caractériser le phénotype qui lui est associé. Certaines caractéristiques, telles que la pénétrance incomplète du phénotype masculinisant et l'asymétrie gauche-droite, avaient déjà fait l'objet de travaux publiés. Néanmoins il restait encore à explorer le syndrome « *mal* » pendant la période de différenciation sexuelle et ses conséquences sur la formation des gonades.

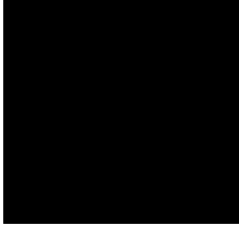
Dans un premier temps, l'objectif de cette étude a donc été de caractériser le phénotype masculinisé, dans ses aspects histologiques et moléculaires pendant la période de différenciation sexuelle à 12°C (condition optimum d'élevage). D'une part, l'analyse histologique a permis de définir la topologie de la gonade XXmal pour pouvoir caractériser avec précision la nature sexuelle des gonades de ces animaux. D'autre part, une analyse moléculaire a été réalisée sur des gènes candidats importants pour la différenciation sexuelle et la stéroïdogénèse qui y est associée. Cette dernière approche a aussi été complétée par une analyse globale sans *a priori* utilisant des puces à ADN.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré l'effet de la température sur cette masculinisation car des résultats préliminaires de l'impact de la température d'élevage sur ce phénotype permettaient de supposer que cette masculinisation pouvait être modulée par un facteur externe comme la température. Pour analyser cet effet et ses conséquences, des animaux de différentes familles mélangées ont été élevés à des températures croissantes et sexés par histologie à un âge où la différenciation et la morphogénèse de la gonade sont clairement achevées. Une fois l'influence positive de la température sur le taux de masculinisation montrée, des expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées pour analyser l'impact de ce traitement au niveau moléculaire.

Les résultats sont présentés sous forme d'articles et de chapitres de thèse avec un premier volet axé sur la caractérisation du phénotype suivi d'un deuxième volet portant sur l'effet de la température.

Chapitre 1.

PHÉNOTYPE GONADIQUE ASSOCIÉ À
LA MUTATION « MAL »



Au commencement de cette thèse, peu d'informations sur la morphologie des gonades et encore moins sur leur développement dans la lignée « *mal* » étaient connues, à part des données macroscopiques montrant, par exemple, l'existence d'une asymétrie gauche-droite de masculinisation entre les gonades des animaux « *mal* » intersexués adultes. Dans un premier temps nous avons donc cherché à mieux caractériser ce phénotype associé à la mutation « *mal* » masculinisante des femelles XX. Pour cela nous avons réalisé une étude histologique et macroscopique des gonades des animaux de la lignée « *mal* » au cours de la différenciation sexuelle et de la gamétogénèse. Ces travaux sont synthétisés dans l'article n°1 accepté pour publication dans le journal « Sexual Development ». Enfin nous avons complété cette étude par l'analyse des profils stéroïdiens des animaux XX*mal* adultes de 2 ans. Par la suite, une approche moléculaire a été privilégiée. Nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes durant la différenciation gonadique pouvant expliquer l'apparition de cette masculinisation.

I. CARACTÉRISATION HISTOLOGIQUE ET MACROSCOPIQUE DU PHÉNOTYPE GONADIQUE DE LA LIGNÉE « MAL » - ARTICLE N°1.

Nous avons réalisé une étude histologique des gonades pendant les étapes de la différenciation sexuelle afin de comprendre comment la masculinisation se mettait en place dans une population génétiquement femelle XX porteuse de la mutation « *mal* » et les conséquences sur le phénotype gonadique final au stade adulte.

Nous avons tout d'abord comparé des populations monosexes témoins, mâle et femelle, à des populations « *mal* » pendant la différenciation sexuelle. Nous avons observé un retard dans la mise en place de la gamétogénèse femelle (entre 53 à 99 jpf) suggérant une dérégulation des événements précoces de la gonadogenèse de tous les individus XX*mal* masculinisés ou femelles phénotypiques. Le sexage effectué sur les gonades avant un an a révélé 4 phénotypes majeurs: des ovaires en prévitellogenèse, des ovaires avec une perturbation de l'ovogénèse («ovogénèse retardée»), des testicules immatures et des ovotestis avec des territoires ovariens et testiculaires clairement compartimentés. Une expérience complémentaire réalisée avant (43 jpf) et après (90 jpf) la différenciation sexuelle histologique a révélé que non seulement ces gonades avaient un retard de développement, mais comportaient également un nombre de cellules germinales inférieur aux témoins du même âge. Ces données ont été confirmées par la quantification en PCR en temps réel de l'expression de deux gènes marqueurs des cellules germinales, *vasa* et *sycp3*, à 60 jpf.

En conclusion de cette première partie, nous montrons que le phénotype masculinisé observé tardivement sur les gonades d'une partie des animaux n'est pas corrélé avec le phénotype précoce, qui lui montre une perturbation du développement gonadique sur l'ensemble des animaux porteurs. Cela suggère que la pénétrance incomplète du phénotype masculinisé tardif est la résultante d'un phénotype précoce qui serait, lui, à pénétrance complète.

Article n°1 : Sex differentiation in an all-female (XX) rainbow trout population with a genetically governed masculinization phenotype

Karina Valdivia¹, Brigitte Mourot¹, Elodie Jouanno¹, Jean-Nicolas Volff², Delphine Galiana-Arnoux², René Guyomard², Chantal Cauty¹, Béatrice Collin¹, Pablo Rault¹, Louise Helary¹, Alexis Fostier¹, Edwige Quillet² and Yann Guiguen¹

¹INRA, UR1037 LPGP Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France.

²IGFL, UMR5242 CNRS/INRA/Université Claude Bernard Lyon I / ENS, Lyon Cedex 07, France.

³INRA, UMR1313, GABI, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Correspondence to: Yann Guiguen, INRA LPGP, Bâtiment 16A, Campus de Beaulieu 35042, Rennes Cedex, France. Email: yann.guiguen@rennes.inra.fr

Keywords: mutation, sex differentiation, sex determination, gametogenesis, sex inversion, histology, salmonids.

Grant Sponsor: French National Research Agency (ANR) project ANR Genanimal Sexytrout.

Abstract

Sex determination is known to be male heterogametic in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, however scattered observations that deviate from this rather strict genetic control have been reported. Here, we provide a detailed morphological and histological characterization of the gonadal differentiation and development (from 43 days post-fertilization to 11 months of age) in an all-female (XX) population with a genetically governed masculinization phenotype. In comparison with control males and females, the gonadal differentiation in these animals was characterized by many perturbations, including significantly fewer germ cells. This decrease in germ cells was confirmed by the significantly decreased expression of two germ cell maker genes (*vasa* and *sycp3*) in the masculinized XX populations as compared with the control females and control males. Although only a proportion of the total adult population was partially or fully masculinized, this early differentiating phenotype affected nearly all the sampled animals. This suggests that the adult masculinization phenotype is the consequence of an early functional imbalance in ovarian differentiation in the entire population. We hypothesize that the lower number of germ cells that we observed in this population could be one cause of their masculinization.

Introduction

Like the other salmonids studied to date, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) has been characterized as a gonochoristic species with a simple monofactorial XX/XY sex determination system [Davidson *et al.*, 2009] and the master sex-determining gene of this species has recently been characterized [Yano *et al.*, 2012]. Based on this simple genetic sex-determination system, straightforward sex-control procedures have been implemented in rainbow trout to produce the all-female populations that are most suitable for aquaculture production [Chevassus *et al.*, 1979; Donaldson and Hunter, 1983]. However, observations that deviate from the strict XX-XY system have been reported in the literature [Quillet *et al.*, 2002], including the presence of males among the offspring of assumed XX-males or in gynogenetic offspring, as well as unexpected females among the progeny of assumed YY super-males [Chevassus *et al.*, 1988]. Interestingly, in a three-generation pedigree analysis of spontaneous males that had appeared among mitogynogenetic progeny, Quillet *et al.* [2002] found multiple phenotypes that ranged from intersex to fully masculinized females producing functional sperm. This study also provided evidence that the masculinization phenotype was governed by genetic factors and suggested that a mutation in at least one putative minor sex-determination factor (named *mal*), which was probably associated with other sex modifier loci, was responsible for the masculinization of XX individuals [Quillet *et al.*, 2002; Quillet *et al.*, 2004]. An experimental

population of *mal*-carrying animals was derived from the pedigree described in the before mentioned studies.

Studies examining spontaneous sex inversion in animals with a strict genetic sex-determination system have revealed novel factors in the sex-differentiation cascade in vertebrates, such as the *Foxl2* gene in goats [Pailhoux *et al.*, 2001], the *Sox9* [Kent *et al.*, 1996] and *Sf1 (Nr5a1)* genes in mice [Koopman, 2010] and the anti-mullerian hormone receptor (*amhrII*) in the hotei strain of the medaka fish, *Oryzias latipes* [Morinaga *et al.*, 2007]. Thus, investigating spontaneously masculinized XX trout may lead to a better understanding of the molecular mechanisms underlying gonadal differentiation in this species.

The histology of gonads undergoing normal sex differentiation in the rainbow trout has been well described [Lebrun *et al.*, 1982; Nagler *et al.*, 2011; Takashima *et al.*, 1980; Vizziano *et al.*, 2007]. At a rearing temperature of approximately 11°C, the morphological features of ovarian differentiation are not detectable until 4–5 weeks after hatching and clear testis differentiation with cystic organization does not appear until approximately 3 months after fertilization, at which time sex can be unambiguously assigned by histological observation. In the present work, we characterized the gonadal phenotypes of masculinized XX rainbow trout females during and after the sex differentiation period as a basis for subsequent molecular studies. We then characterized the early steps of gonad

differentiation in XX *mal*-carrying progeny using histology and assessed the differentiation of germ cells using gene-expression profiling of certain germ cell markers. We also investigated the masculinization phenotype in *mal*-carrying adults. Taken together, these analyses revealed that gonadal differentiation in the *mal*-carrying animals is greatly perturbed and that the number of germ cells is remarkably low. As several studies have implicated germ cells in the regulation of sex differentiation in fish [Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008; Slanchev *et al.*, 2005; Kurokawa *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008], we therefore hypothesize that this lower number of germ cells could be one cause of the masculinization of these *mal*-carrying animals.

Experimental procedures

Experimental groups

Experiments involving animals complied with French and European regulations regarding the use and care of laboratory animals. All the experimental groups were derived from the winter-spawning INRA-SY (females used to produce all-male and all-female control populations and the *mal*-carrying line) and INRA-autumn (XX and YY males used for producing all-male and all-female control populations) strains of rainbow trout (*O. mykiss*), which are maintained at the INRA experimental fish facilities (PEIMA, Sizun, France). The experimental *mal*-carrying line was established from a single *mal*-carrying female, namely the D12 daughter of the SY1 female initially described in Quillet *et al.* (2002) as giving some

male offspring after gynogenesis. A first generation of XX doubled haploids males was obtained by gynogenetic reproduction of the D12 female. Those males were then mated with standard females from the original SY strain in order to limit inbreeding. Because those males were all homozygous, progeny were expected to be heterozygous for the *mal* mutation. For producing the next generation, females were mated with the spontaneous males detected in the crosses (plus one doubled haploid progeny derived from D12). The *mal*-carrying line was further maintained by subsequent crosses between females and spontaneous phenotypic males. The eggs were fertilized and the embryos were incubated for approximately 15 days at 11°C in the PEIMA experimental facilities until they reached the eyed-stage, at which point they could be safely transported. Eyed-stage embryos were then transferred to experimental recirculating water systems at the Fish Physiology and Genomics laboratory (INRA LPGP, Rennes). Initially, the fish were reared at 10±1°C. Subsequently, when the fish started to feed, they were reared at 12±1°C.

For the histology of embryonic and juvenile gonads, five full-sib XX *mal*-carrying progeny (identified as mal1 to mal5) were produced by mating spontaneous males and phenotypic females from the *mal*-carrying line described above. The mal1 and mal2 offspring were obtained from the mating of a single male and two females and the mal3, mal4 and mal5 offspring were obtained from a single-pair mating of 3 males and 3 females. Genetically all-

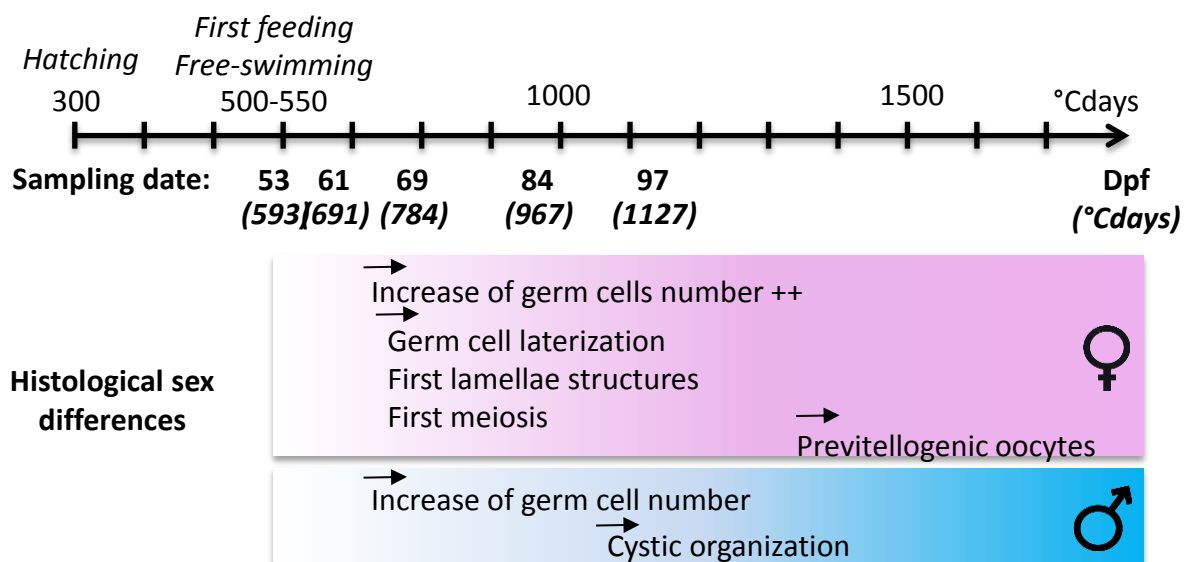


Fig. 1 : Schematic representation of early gonadal development in the rainbow trout. dpf: days post fertilization; °Cdays: degrees x days. See text for details.

male (XY) and all-female (XX) control groups were produced mating YY or XX males with normal females [Chevassus *et al.*, 1979; Chevassus *et al.*, 1988; Jalabert *et al.*, 1975].

For the characterization of the adult gonadal phenotype we analyzed 144 3-year-old *mal*-carrying animals [Quillet *et al.*, 2002]. These animals were taken from a population that was enriched for masculinized animals based on their external male phenotype during the reproductive period.

Sampling schedule

The gonads of the *mal1* and *mal2* offspring and of the all-male and all-female controls were studied throughout gonad sex differentiation. The trunks of five fish per group were examined at different time points from the onset of the first feeding i.e., from 53 days post-fertilization (dpf) and up to 97 dpf. The sampling time points (**Fig. 1**) were chosen according to the following known developmental landmarks [Lebrun *et al.*, 1982; Nagler *et al.*, 2011; Takashima *et al.*, 1980; Vizziano *et al.*, 2007]: the increase in the primordial germ cells in both sexes between 35 to 61dpf (i.e. 350-691 °Cdays in the present experiment), the earlier (from 69 dpf; 784 °Cdays) increase in the number of germ cells in the differentiating ovary than in the future testis and the earlier (at around approximately 69 dpf) meiotic entry of female germ cells concomitant with the beginning of ovarian lamellae organization and germinal epithelium lateralization of the ovary. After 69 dpf, oogenesis proceeds quickly in females and is characterized by clear ovarian lamellae

organization between 84 and 97 dpf (967 and 1127 °Cdays). By contrast, the first testis specific features appear in males around 97 dpf (1127°Cdays) when the germ cells organize into cyst structures. The experimental progeny were last examined at 11 months of age to examine the first steps of gametogenesis and to determine the *sex-ratio* of *mal1* and *mal2* progeny (84 and 96 fish, respectively).

In view of the histological data obtained with the *mal1* and *mal2* progeny, a complementary analysis was performed on the *mal3* to *mal5* progeny to further characterize the gonadal phenotype in a larger cohort and to link this histological information to the gene expression of certain germ cell markers. For the histological analysis, 15 fish were sampled prior to histological sex differentiation at 43 dpf and 10 fish were sampled when clear histological sex differences between control males and control females were detectable at 90 dpf. A final time point was analyzed seven months post-fertilization (N = 64 for *mal3*, N = 49 for *mal4* and N = 53 for *mal5*) to determine the *sex-ratio* within these three *mal*-carrying progeny. Gene-expression analysis of the gonads was performed at 61 dpf during molecular sex differentiation and before the first clear histological sex differences arose. The gonads of 75 fish were sampled and pooled in quadruplicates per family, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

Histological analysis of gonads

For histological analysis, trunks with the peritoneal cavity that has been opened (from 43 dpf to 97 dpf) or gonads (from 7- and 11-month-old fish) were fixed for at least 48 hr in Bouin-Holland fluid and were dehydrated in aqueous 70% and 95% ethanol, ethanol/butanol (5:95) and butanol. Tissues were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with Regaud's hematoxylin [Gabe, 1968].

Real-time RT-PCR to measure expression of germ cell markers

The expression of two known germ cell markers [Nakamura *et al.*, 2010; Ozaki *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2009], dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (*ddx4* or *vasa*) and synaptonemal complex protein 3 (*sycp3*) were analyzed relative to the geometrical mean of 18S ribosomal (*18S*), elongation factor-1 alpha (*ef1a*) and actin beta (*actb*) RNA expression. Total RNA extraction was performed as previously described [Govoroun *et al.*, 2001]. Reverse transcription (RT) was performed on 500ng of total RNA at 37°C for 1 hr 30 using random hexamer primers (3.6 µg) in a 25 µl reaction mixture containing 0.5 mM each of dNTP, 1X first strand buffer, 1 U/µl Rnasin ribonuclease inhibitor and 8 U/µl M-MLV reverse transcriptase (Promega). The PCRs were performed using the Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reverse transcription products were diluted 20 times and used for PCR with a real-time PCR kit containing SYBR Green fluorophore (Fast SYBR Green Master Mix; Applied Biosystems). The following

primers were used: *vasa* (Fw: 5'-GGCGTGGCAGCTAGTCAGTTCA-3' and Rv: 5'-GCACACAAGTCCCATGGGCAAA-3'), *sycp3* (Fw: 5'-AATCAGAAACTGGAGCAGCTGTG-3' and Rv: 5'-TTTCTGTGCATCAATCTCCATT-3'), *18S* (Fw: 5'-CGGAGGTTCTGAAGACGATCA-3' and Rv: 5'-CGCTAGTTGGCATCGTTTATG-3'), *ef1a* (Fw: 5'-GCTGGACAAGCTGAAGGCTGAG-3' and Rv: 5'-AGCGCAATCAGCCTGAGAGGTA-3') and *actb* (Fw: 5'-CCAGCCACGTGGCCAGCAT-3' and Rv: 5'-CGTACCCGTGATGCGGTAG-3'). Duplicates were run for each RT product. The hot start enzyme was activated for 20 s at 95°C and then the amplification was carried out according to the following program: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec and 60 or 65°C for 1 min. After amplification, a melt curve was obtained according to the following protocol: a 10 s incubation followed by a 0.05°C increase, repeated 80 times and starting at 55°C. The *vasa* and *sycp3* genes were normalized relatively to the geometric mean of the expression of three internal control genes (*18S*, *ef1a*, *actb*) according to [Vandesompele *et al.*, 2002]. Results were statistically analyzed by a Kruskal-Wallis rank sum non-parametric test followed by a pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test. Significant result are represented by letters indicating significant differences between samples at p<0.05.

Determination of sex-ratios

The sex-ratios of the *mal*-carrying progeny were determined from histological analyses of gonads at 11 months and 7 months of age for *mal*1-2 and *mal*3-to-5 progeny, respectively.

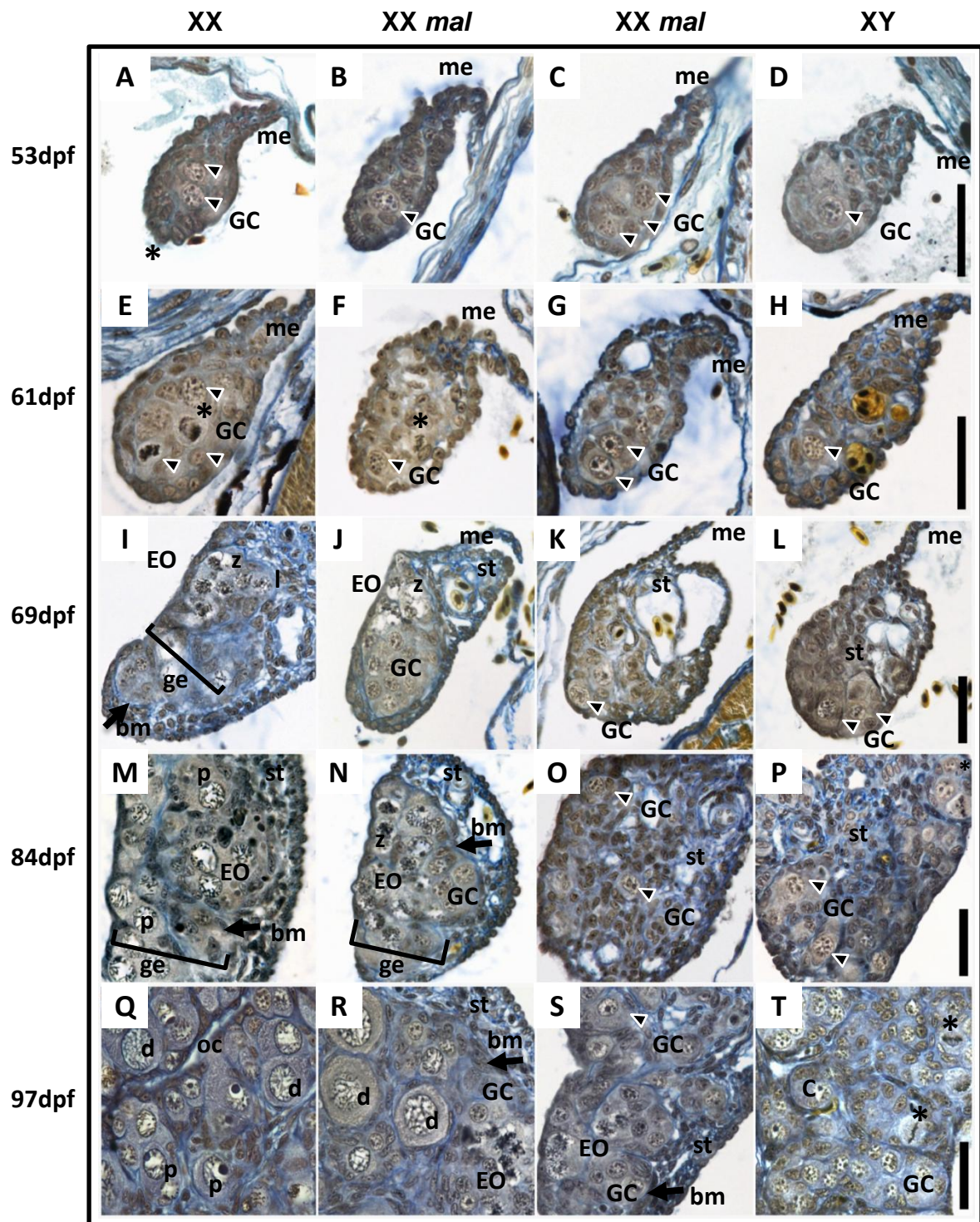


Fig. 2 : Early gonadal sex differentiation (53 to 99 dpf) in XX *mal*-carrying rainbow trout. Comparison of gonadal differentiation by histology between control female (XX, panels A, E, I, M, Q) control male (XY, panels D, H, L, P, T) and families of XX *mal*-carrying rainbow trout (XX *mal*, panels B, C, F, G, J, K, N, O, R, S) at different days post-fertilizations (dpf) (53, 60, 69, 84, 99). See the Results section for details. me, mesogonium; st, stroma; bm, basement membrane; ge, germinal epithelium; EO, early meiotic oocyte (l: leptoten; z: zygoten; p: pachyten; d: diploten); GC, germ cell; C, cysts; *, mitosis. Scale bar=30 μ m.

Every fish was classified according to its gonadal phenotype. Fish were scored as “normal female” when no sign of masculinization could be detected by histology on any gonad and when no delay in gametogenesis could be observed in comparison with control females (XX all-female population). Females with delayed ovarian development were scored as “delayed oogenesis females.” All other phenotypes exhibiting masculinization features were classified as either “normal males” or “intersex animals.” The animals that received intersex scores had at least one masculinized gonad. The masculinization rates (percentage of “intersex animals” plus “normal males”) were statistically analyzed using either the χ^2 test or the Fisher's exact test when the total number of animals per group was less than 5.

Results

Histological characterization of gonad masculinization in *mal*-carrying XX rainbow trout during sex differentiation

At 53 dpf, the gonads were located within the peritoneal cavity and attached to the dorsal peritoneal epithelium by a mesogonium. At that stage, the germ cells were clearly distinguishable in the gonads of both the normal males and females (Fig. 2A and 2D) and the *mal1* and *mal2* fish (Fig. 2B and 2C). By 61 dpf, germ cells were more often detected in the gonads of the normal females (Fig. 2E) than that in the normal males (Fig. 2D) and the *mal*-carrying fish (Fig. 2F and 2G). At 69 dpf, the first signs of an ovarian lamellae structure could be observed in normal females (Fig. 2I). These ovarian lamellae were

well delineated by a basement membrane and contained germ cells and early meiotic oocytes within a germinal epithelium (Fig. 2I). The embryonic ovaries of the control females were also characterized by well-organized ovarian lamellae on one side of the gonad. The germ cells exhibited different chromatin compaction stages and some of them, the early meiotic oocytes, were already engaged into meiosis, mostly at the zygoten stage. At the same age (69 dpf), the gonads of the control males remained undifferentiated, possessed quiescent germ cells and had no remarkable morphological organization (Fig. 2L). In comparison to the gonad histology of either control males or females, the gonads of *mal*-carrying XX fish resembled either testes (Fig. 2K) or potential ovaries or intersex gonads (Fig. 2J) when they contained both a germinal epithelium filled with early meiotic oocytes and a few quiescent germ cells. At 84 dpf, the early ovarian lamellae in control female gonads were well developed and contained numerous oocytes at a more advanced stage of meiosis (*i.e.*, pachyten stage; see Fig. 2M). In control males of the same age, the gonads increased in size and the germ cells started to organize into cysts (Fig. 2P). At that stage, the gonads of *mal*-carrying XX animals with female-like features were smaller than those of genetically female (XX) controls *mal* and the oocytes were at less advanced stages of meiosis (Fig. 2N). Conversely, the gonads of other *mal*-carrying XX animals showed male-like features without clear cystic organization (Fig. 2O). At 97 dpf, the

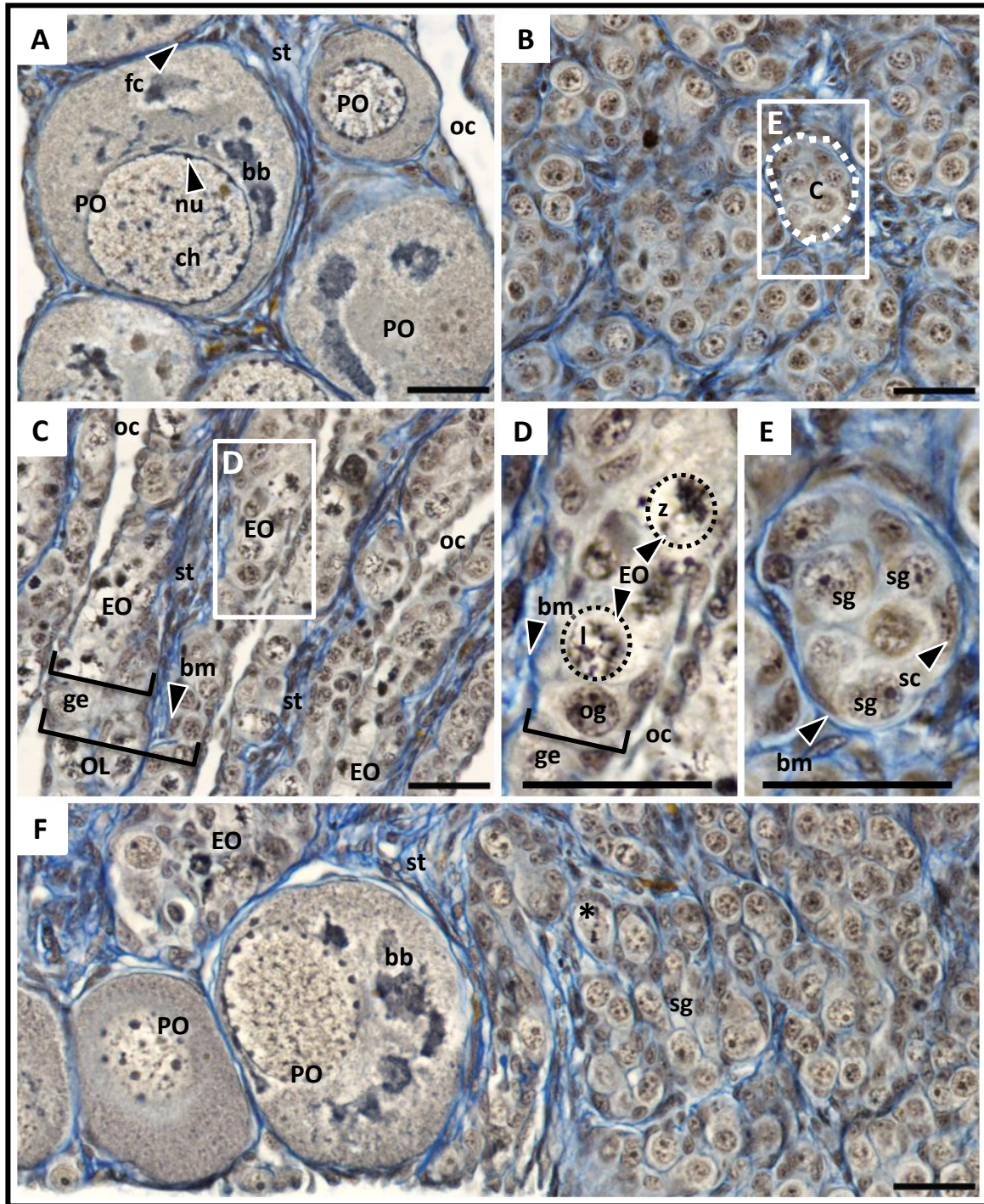


Fig. 3 : Gonadal phenotypes of 11-month-old XX *mal*-carrying rainbow trout. Female phenotypes (A, C) were classified as (A) ovaries with primary growth oocytes or (C) ovaries with delayed oogenesis. (D) Enlargement of (C) exhibiting early zygoten and leptoten meiotic oocytes. Masculinized phenotypes (B, F) were classified (B and E) as normal testis with cysts of spermatogonias or (F) ovotestis with an ovarian territory separated from the testicular territory by a dense conjunctive tissue. See the Results section for details. PO, primary growth oocytes; fc, follicle cell; nu, nucleoli; ch, chromosomes; bb, Balbiani's body; oc, ovarian cavity; st, stroma; bm, basement membrane; ge, germinal epithelium; EO, early meiotic oocytes (z: zygoten, l: leptoten); og, oogonia; C, cysts; ic, interstitial cell; sc, Sertoli cell; *, mitosis. Scale bar=30 μ m

control animals of either sex had completed sex differentiation, as assessed by histology. The ovaries had a clear lamellae structure filled with many young oocytes at the diploten stage of meiosis (Fig. 2Q) and the testes showed a clear cystic organization, with cysts of germ cells showing active mitosis (Fig. 2T). At the same age (97 dpf), the gonads of *mal*-carrying XX animals with female-like characteristics could be classified as either normal females (Fig. 2R) or normal females with delayed oogenesis (Fig. 2S), showed a clear delay in the meiotic entry of germ cells and did not contain the numerous young oocytes that the control females did.

Histological characterization of gonad masculinization in immature (11-month-old) *mal*-carrying XX rainbow trout

Eleven-month-old *mal*-carrying XX rainbow trout (*mal1* and *mal2*) could be grouped into one of four main phenotypes using histology: fish that possessed ovaries with primary growth oocytes (Fig. 3A), fish that possessed ovaries with delayed gametogenesis (Fig. 3C), fish that possessed normal testes (Fig. 3B) and fish that possessed ovotestes (Fig. 3F). The ovaries with primary-growth oocytes were organized in ovarian lamellae in which the germinal epithelium was separated from the stroma by a basement membrane and contained mostly primary-growth oocytes with perinuclear nucleoli surrounded by follicle cells (Fig. 3A). The ovaries with delayed gametogenesis were composed mostly of nests of germ cells without primary-growth oocytes (Fig. 3C). Within these gonads, oogonia were found in ovarian lamellae

along with oocytes at one of two meiotic stages: either the leptoten stage or the zygoten stage of meiotic prophase I (Fig. 3D). The normal testes contained cysts of germ cells surrounded by Sertoli cells and delineated by a basement membrane (Fig. 3B and 3E). In the ovotestes, the ovarian part contained mostly primary oocytes (at the diploten stage) and primary-growth oocytes (Fig. 3F) and was clearly separated from the testicular part, as is observed in the gonads of 3-year-old mature fish.

The examination of a large number of individuals in the two *mal*-carrying progenies (*mal1* and *mal2*) revealed that at 11 months of age, most of the masculinized fish were intersexual and possessed ovotestes and few females presented a delayed gametogenesis phenotype (Table 1). When considering masculinization as the sum of the number of animals with normal testes and that of the animals with ovotestes, the *mal1* progeny were significantly more masculinized (15% versus 5%, $p < 0.05$) than were the *mal2* progeny (see Table 1); the latter also presented the highest rate of “normal female” phenotypes (83% versus 68%, $p < 0.05$).

Germ cell detection in the undifferentiated gonads of *mal*-carrying animals

The three XX *mal*-carrying additional progenies (*mal3*, *mal4* and *mal5*) that were used to better characterize early histological differentiation were all highly masculinized as assessed by the following masculinization rate at seven months: 70% for *mal3* (N = 64), 82% for

Table 1 : Classification of various gonadal phenotypes in two XX *mal*-carrying progenies (mal1 and mal2) at 11 months of age.

| Gonadal phenotypes | mal1 | mal2 | P value (χ^2 test) | χ^2 value (Df=1) |
|---|------------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Ovaries with primary growth oocytes (normal females) | 67,9% (57) | 83,3% (80) | 0.02 | 5.08 |
| Ovaries with delayed gametogenesis | 16,6% (14) | 11,5% (11) | 0.42 | 0.63 |
| Intersex animals, predominantly with ovotestes | 13,1% (11) | 5,2% (5) | 0.11 | 2.54 |
| Testis with cystic organization (normal males) | 2,4% (2) | 0% (0) | 0.22 | na ^(a) |
| Total | 100% (84) | 100% (96) | | |
| <i>% of masculinization (intersex + normal males)</i> | <i>15%</i> | <i>5 %</i> | 0.04 | |

(^a)No χ^2 value (Fisher's Exact Test)

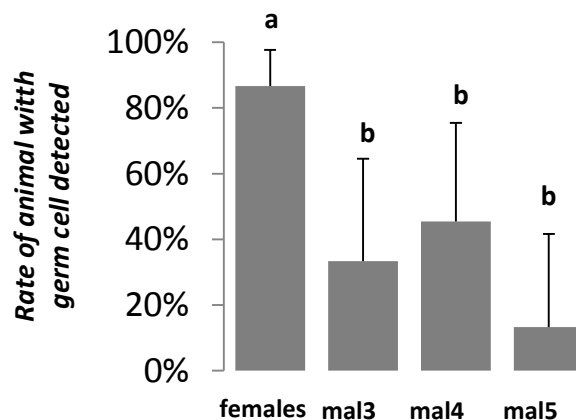


Fig. 4 : Number of XX *mal*-carrying rainbow trout individuals showing clearly detectable germs in cross sections of gonads at 43 dpf. Comparison between progeny χ^2 test (Df=1) and Fisher's exact test are represented by letters indicating significant difference between proportions at $p < 0.05$.

mal4 (N = 49) and 68% for mal5 (N= 53). At 43 dpf, the histological sections of the gonads in these progeny were scored for the presence and the number of germ cells within 5 successive histological cross-sections per fish. Germ cells were found in section of almost all control females but more rarely in *mal*-carrying animals (see Fig. 4). At 90 dpf, five main categories of gonad phenotypes could be distinguished based on the presence and numbers of germ cells, their stages of development (meiotic stages) and the organization of the gonad. Category 1 includes gonads that are not histologically differentiated with lacuna and have very few, if any, germ cells (see Fig. 5A). Category 2 includes gonads with more germ cells but no obvious testicular structure (Fig. 5B). The other categories are characterized by a classic gonad structure with sex-specific meiotic germ cell features and sex-specific organization. Type 3M gonads have defined testes with numerous germ cells organized in cysts (Fig. 5C) and type 3F and 4F gonads have ovaries containing early meiotic oocytes and oocytes at late diploten stages, respectively (Fig. 5D). The frequencies of these different categories of gonads are shown in Table 2. As compared with male and female control animals, the XX *mal*-carrying animals clearly show delayed development.

Expression of germ cell markers (*mal3*, *mal4* and *mal5*)

The gene expression of *vasa* and *sycp3* was analyzed at 61 dpf in mal3 to mal5 progenies in order to confirm the lower number of germ cells observed at early developmental stages in *mal*-

carrying fish. For both *vasa* and *sycp3*, the expression was 6.3 and 9 times lower, respectively, in the *mal*-carrying animals in comparison with the control females (Fig. 6). These *vasa* and *sycp3* gene expressions were also significantly lower in *mal*-carrying animals compared with control males.

Phenotypic characterization of gonad masculinization in adult *mal*-carrying XX rainbow trout.

Among the 144 3-year-old *mal*-carrying fish observed during their spawning season, 83 fish were masculinized and exhibited various gonadal phenotypes, ranging from an ovary paired with an ovotestis to a pair of fully developed testes (Table 3 and Fig. 7). Left–right gonadal asymmetry was often observed with an ovary paired with an ovotestis (Fig. 7A), an ovary paired with a testis, or two ovotestes (Fig. 7B). The ovarian and testicular areas were clearly separated within the ovotestes. The testicular area was more often located in the anterior part of the gonad (58.7% of all ovotestis as in Fig. 7B) than the ovarian area (9.3% of ovotestis; see the example of the right gonad in Fig. 7A). When the testicular part was located in the caudal region of the gonad, sperm could be emitted normally through the sperm ducts and the testis was functional. Fully masculinized gonads had an abnormal testicular shape with several constriction points (left gonad in Fig. 7D) that are not normally seen in control males.

Table 2 : Percentages and numbers of differentiated and undifferentiated gonads in genetic female, genetic male, and XX *mal-mal*-carrying families of rainbow trout. See text for detail on the classification of the gonad types.

| | Control females | mal3 | mal4 | mal5 | Control males |
|---|-----------------|----------|-----------|-----------|---------------|
| <i>Undifferentiated gonads (type 1 and 2)</i> | 0% | 100% | 100% | 80% | 0% |
| Lacunar gonads with no or very few germ cells (type1) | | 2 | 4 | 4 | |
| Gonads with germ cells (type 2) | | 6 | 6 | 4 | |
| <i>Differentiated gonads (type 3 and 4)</i> | 100% | 0% | 0% | 20% | 100% |
| Testis with cystic organization (type 3T) | | | | | 7 |
| Ovaries with early oocyte meiosis (type 3F) | 4 | | | 2 | |
| Ovaries with diplotene oocytes (type 4F) | 6 | | | | |
| n= | 10 | 8 | 10 | 10 | 7 |

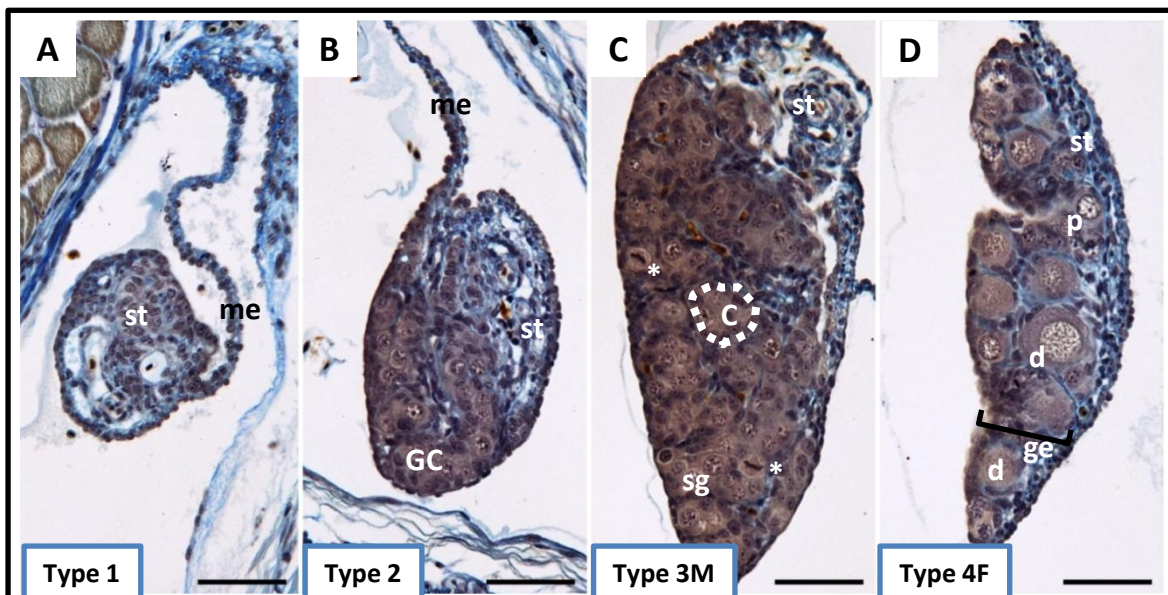


Fig. 5 : Gonadal phenotypes observed in three XX *mal*-carrying families of rainbow trout at 90 dpf. The gonads were classified based on the presence and the numbers of germ cells, their development (meiotic stages) and the gonad organization. Type 1: undifferentiated gonads (A). Type 2: gonads with no obvious testicular structure (B). Type 3M: normal testis structure (C). Type 4F: gonads with normal ovarian structure (D). See the Results section for details. st, stroma; ge, germinal epithelium; d, diploten; p, pachyten; C, cysts; *, mitosis. Scale bar=50 μ m

Discussion

In XX *mal*-carrying rainbow trout, it was previously shown [Quillet *et al.*, 2002] that the masculinization phenotype may not be expressed by all the progeny and that animals can exhibit different degrees of masculinization. The masculinization rate also depends on parental effects, which suggests that additional sex-modifier loci may be involved in the genetic control of this phenotype [Quillet *et al.*, 2002]. We performed the present study using fish of the same genetic background and confirmed that the gonadal masculinization of XX *mal*-carrying fish remains incomplete in certain individuals and results in a majority of intersexual animals with ovotestes. The testicular and ovarian territories within the ovotestes were always separated by a dense conjunctive tissue. This separation was also observed after female masculinization by androgen treatments [Jalabert *et al.*, 1975] and in the intersexual animals in some wild salmonid species [Kinnison *et al.*, 2000]. From a functional standpoint, this compartmentalization of male and female territories may allow local sex-specific physiological regulation and successful spermatogenesis and oogenesis, as is the case in synchronous hermaphrodite species or in male trout following estrogen treatment during the sex-differentiation period [Chevassus *et al.*, 1988]. Intersex individuals may be fertile [Quillet *et al.*, 2004] and can produce functional sperm and/or oocytes during the reproductive season. Depending on their gonad topologies, *i.e.*, whether a testicular region is proximal to the

efferent duct, a portion of the masculinized adult fish are able to emit sperm, as observed at the time points during the winter reproductive season.

Differentiation of the gonads in rainbow trout has been well described [Lebrun *et al.*, 1982; Takashima *et al.*, 1980; Vizziano *et al.*, 2007]. Ovarian differentiation is usually detectable histologically between 60 and 80 dpf with the first observation of early meiotic oocytes and the organization of the first primary oocytes (within germinal epithelium) in the developing ovarian lamellae. In XX *mal*-carrying rainbow trout, we found that ovarian differentiation was greatly perturbed and the number of germ cells was significantly lower. In normal rainbow trout populations, germ cell proliferation is sexually dimorphic and favors females approximately 5 weeks post-hatching [Lebrun *et al.*, 1982], as confirmed in a transgenic line overexpressing green fluorescent protein under the control of the *vasa* gene promoter [Nagler *et al.*, 2011]. We found lower expression of two germ cells markers—*vasa* and *sycp3*—in the gonads of XX *mal*-carrying animals than in control females and males, which was in agreement with the histological data. These results are interesting because many studies have implicated germ cells in the regulation of sex differentiation in fish. For instance, the experimental depletion of germ cells from embryonic zebrafish gonads [Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008; Slanchev *et al.*, 2005] and medaka [Kurokawa *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008] induced testicular

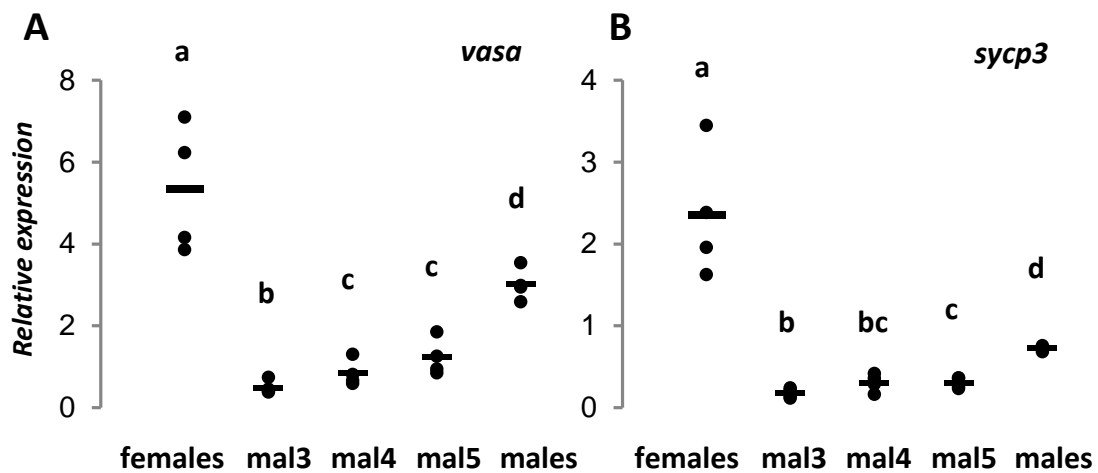


Fig. 6 : Gene expression of two germ cell markers, *vasa* and *sycp3*, in XX *mal*-carrying families of rainbow trout and corresponding controls at 61 days post-fertilization *mal*⁻. Results are represented by the values (circles) of 4 replicate samples per population (female and male controls and mal3, mal4 and mal5 XX *mal*-carrying populations) with their mean expression represented by a horizontal line. Gene expressions of *vasa* and *sycp3* were normalized by the geometric mean of three references genes and represented with an arbitrary scale. Significant differences between groups are indicated by lowercase letters (Kruskall-Wallis sum rank test; $p < 0.05$). The results that did not differ significantly are represented with the same letter.

differentiation of somatic tissue. By contrast, the inhibition of the male pathway is associated with an increase in the number of germ cells in medaka [Herpin *et al.*, 2007; Morinaga *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008]. However, the link between germ cells and sex differentiation is probably not conserved among all fish as exceptions have recently been reported in which germ cell ablation did not impair the feminization of the gonads [Fujimoto *et al.*, 2010; Goto *et al.*, 2012]. In the rainbow trout, the role of germ cells in sex differentiation has not been studied using germ cell ablation, but our results suggest that the masculinization observed in these XX *mal*-carrying animals could be related to the smaller number of germ cells detected in their gonads around the sex-differentiation period.

After the sex-differentiation period, the XX *mal*-carrying animals continued to exhibit a gonadal phenotype different from that of controls and gonadal development was clearly delayed. Many unusual male or female gonadal features were also detected by histology, such as gonads with lacunae, with no or a small number of germ cells and with no clear development of the ovarian lamellae. Certain of these characteristics may be related to the masculinization phenotype, although there were no clear histological testicular features at this stage. It is difficult to assign a male phenotype at early stages of development because masculinization at these stages is often deduced from the absence of female-like histological characteristics. Furthermore, in our study, we did

not examine the entire gonad by histology and early intersexuality signs could have been missed. However, despite these difficulties in determining with certainty the sex of the differentiating gonads in XX *mal*-carrying families, all the fish in this study seemed to exhibit either a delayed meiotic entry of germ cells or an absence of clear ovarian differentiation. A delay in ovarian development was also detected in older animals (7 and 11 months old). We detected a disturbance in the early gonadal phenotype of all the observed animals that was independent of the masculinization rate of the different progenies (low masculinization rates in mal1 and mal2 and high masculinization rates in mal3 to mal5), despite the masculinization phenotype affecting only a proportion of the adult population. This apparent contradiction probably reflects a functional imbalance in early ovarian differentiation in all XX *mal*-carrying animals, which leads to efficient masculinization in only a limited proportion of adult animals. Spontaneous masculinization of XX individuals has also been characterized in the common carp, *Cyprinus carpio* [Komen *et al.*, 1992a; Ruane *et al.*, 2005]. The phenotype of these masculinized female carp is very different from the one that we describe for trout since XX masculinization in carp is associated with an earlier meiotic entry of spermatogonia [Komen *et al.*, 1992b]. By contrast, we observed a delayed female meiotic entry but no sign of early meiosis in XX masculinized female rainbow trouts.

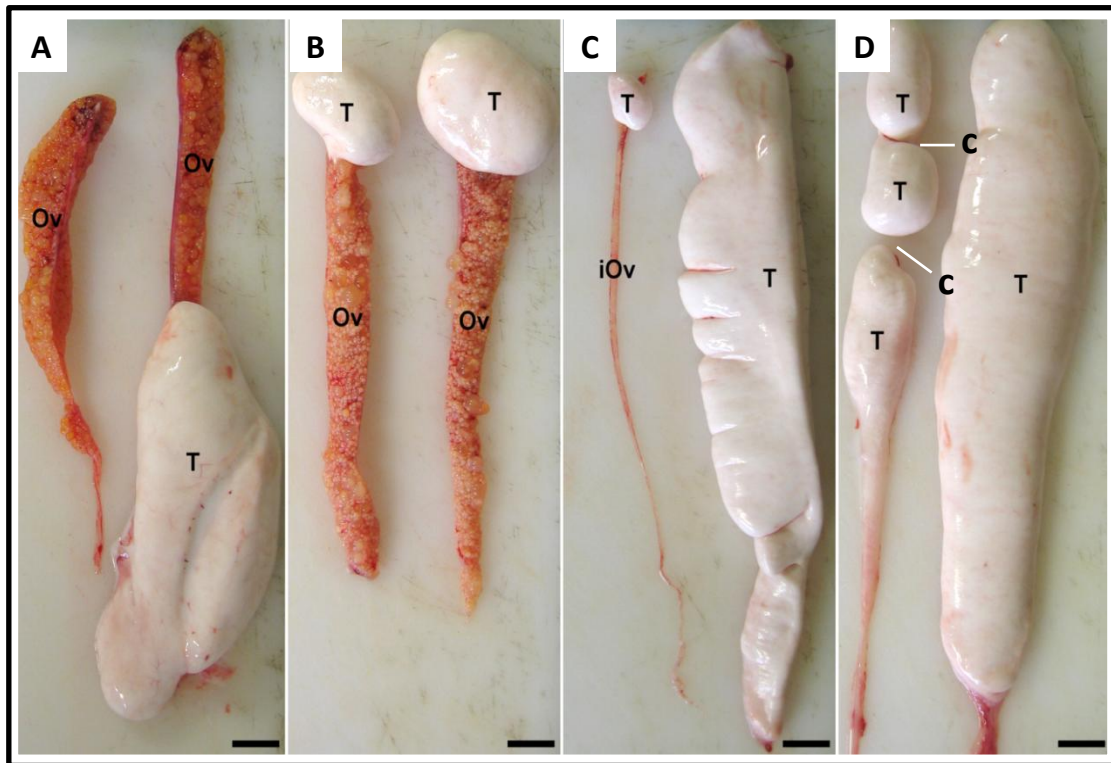


Fig. 7 : Gradients of masculinization phenotypes in adult XX *mal*-carrying rainbow trout (A) Intersex phenotype with a left ovary and a right ovotestis. (B) Intersex phenotype with two ovotestes. (C) Intersex phenotype with an immature ovarian region located within a left ovotestis. (D) Complete masculinization phenotype with two testes. Ov, Ovary; iOv, immature ovary; T, testis; C, constriction (Scale bar = 5 cm).

Table 3 : Macroscopic observations of the gonads in adult *mal*-carrying rainbow trout.

| Gonad phenotype (left gonad/right gonad) | Fish | Sex |
|---|-------------|------------|
| Testis/testis | 28 | males |
| Testis/ovary | 1 | |
| Testis/ovotestis | 5 | intersex |
| Ovotestis/ovotestis | 21 | |
| Ovotestis/ovary | 28 | |

A remarkable feature of these XX *mal*-carrying animals is the asymmetrical response of the gonads to masculinization, as previously noted [Quillet *et al.*, 2004]. In teleosts, the left gonad of the Argentine silverside, *Odontesthes bonariensis* [Strüssmann and Ito, 2005], was found to be the first to differentiate and the size of the right ovary was often smaller than the left one in adult brown trout, *Salmo trutta* [Ashby, 1957] and rainbow trout [Mrsic, 1923]. Moreover, methyltestosterone treatment in trout can induce both a morphological and a molecular asymmetry of masculinization [Chevassus and Krieg, 1992; Guillevic and Guiguen, 2008]. These observations suggested that trout gonads may have an underlying asymmetrical differentiation program that is normally obscure but could be revealed under imbalanced physiological conditions. This gonadal asymmetry in the XX *mal*-carrying animals could result from an asymmetrical differentiation program that favors masculinization under certain genetic conditions. Another characteristic of the masculinized gonads of XX *mal*-carrying individuals is an anteroposterior masculinization gradient with the testicular territory being more often detected in the anterior part of the ovotestis gonad. In fish, gonadal development often begins in the anterior part of the gonads [Brusle and Brusle, 1983; Strüssmann and Ito, 2005]. Because the ovarian histological differentiation precedes the testicular differentiation in trout [Lebrun *et al.*, 1982], the fact that the anterior part of the ovotestes was the most frequently

masculinized region of the gonad may reflect an early dysregulation of ovarian differentiation that leads to partial and local masculinization of the gonads.

In conclusion, our results suggest that XX *mal*-carrying rainbow trouts are characterized by a perturbation of the early development of the gonads, which can then interfere with normal female differentiation and lead to partial masculinization. Interestingly, this masculinization could be a consequence of the smaller number of germ cells detected in the gonads of XX *mal*-carrying rainbow trout during the sex-differentiation period.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the INRA Fish Physiology and Genomics Laboratory and of the INRA PEIMA experimental facilities as well as to Nicolas Dechamp (INRA GABI) for maintaining the various fish lines and producing the experimental groups. The work was supported by the French National Research Agency ("Sexytrout" project, ANR-2008-GENM-031). K.V. received a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

- Ashby KR: The Effect of Steroid Hormones on the Brown Trout (*Salmo trutta* L.) during the Period of Gonadal Differentiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 5:225-249 (1957).
- Brusle J, Brusle S: Gonadogenesis in Fish. *Reprod Nutr Dev* 23:453-491 (1983).
- Chevassus B, Chourrout D, Jalabert B: Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I. Les populations "monosexes". *Bull Fr Piscic* 274:18-31 (1979).

- Chevassus B, Devaux A, Chourrout D, Jalabert B: Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J Heredity* 79:89-92 (1988).
- Chevassus B, Krieg F: Effect of the concentration and duration of methyltestosterone treatment on masculinization rate in the brown trout (*Salmo trutta*). *Aquatic Living Resources* 5:325-328 (1992).
- Davidson WS, Huang TK, Fujiki K, von Schalburg KR, Koop BF: The Sex Determining Loci and Sex Chromosomes in the Family Salmonidae. *Sexual Development* 3:78-87 (2009).
- Donaldson EM, Hunter GA: 7 Induced Final Maturation, Ovulation and Spermiation in Cultured Fish. Volume 9, Part 2:351-403 (1983).
- Fujimoto T, Nishimura T, Goto-Kazeto R, Kawakami Y, Yamaha E, Arai K: Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:17211-17216 (2010).
- Gabe M (eds): *Techniques histologiques* (Masson, Paris : 1968).
- Goto R, Saito T, Takeda T, Fujimoto T, Takagi M, Arai K, Yamaha E: Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Developmental Biology* (2012).
- Govoroun M, McMeel OM, D'Cotta H, Ricordel MJ, Smith T, Fostier A, Guiguen Y: Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Zool* 290:558-566 (2001).
- Guillevic M, Guiguen Y: Left-right gene expression asymmetry in gonads of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following masculinization treatments with androgens. *Cybio* 32:99-(2008).
- Herpin A, Schindler D, Kraiss A, Hornung U, Winkler C, Schartl M: Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene *Dmrt1bY*. *BMC Developmental Biology* 7:99-(2007).
- Jalabert B, Billard R, Chevassus B: Preliminary experiments on : production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 15 :19-28 (1975).
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P: A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813-2822 (1996).
- Kinnison MT, Unwin MJ, Jara F: Macroscopic intersexuality in salmonid fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34:125-134 (2000).
- Komen J, Deboer P, Richter CJJ: Male Sex Reversal in Gynogenetic Xx Females of Common Carp (*Cyprinus-Carpio* L) by A Recessive Mutation in A Sex-Determining Gene. *Journal of Heredity* 83:431-434 (1992a).
- Komen J, Yamashita M, Nagahama Y: Testicular Development Induced by A Recessive Mutation During Gonadal Differentiation of Female Common Carp (*Cyprinus-Carpio*, L). *Development Growth & Differentiation* 34:535-544 (1992b).
- Koopman P: The delicate balance between male and female sex determining pathways: potential for disruption of early steps in sexual development. *International Journal of Andrology* 33:252-258 (2010).
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi Ki, Tanaka M: Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:16958-16963 (2007).
- Lebrun C, Billard R, Jalabert B: Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *Reprod Nutr Dev* 22:405-412 (1982).
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, Kondoh H: The *hotei* mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:9691-9696 (2007).
- Mrsic W: Die Spätbefruchtung und deren Einfluß auf Entwicklung und Geschlechtsbildung, experimentell nachgeprüft an der Regenbogenforelle. *Development Genes and Evolution* 98:129-209 (1923).
- Nagler JJ, Cavileer T, Hunter S, Drew R, Okutsu T, Sakamoto T, Yoshizaki G: Non-sex specific genes associated with the secondary mitotic period of primordial germ cell proliferation in the gonads of embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* (2011).
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, Tanaka M: Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* 328:1561-1563 (2010).

- Ozaki Y, Saito K, Shinya M, Kawasaki T, Sakai N: Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 11:309-315 (2011).
- Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Crihiu EP, Cotinot C, Vaiman D: A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* 29:453-458 (2001).
- Quillet E, Aubard G, Queau I: Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: detection and genetic analysis. *J Hered* 93:91-99 (2002).
- Quillet E, Labbe L, Queau I: Asymmetry in sexual development of gonads in intersex rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 64:1147-1151 (2004).
- Ruane NM, Lambert JG, Goos HJ, Komen J: Hypocorticism and interrenal hyperplasia are not directly related to masculinization in XX mas(-1)/mas(-1) carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology* 143:66-74 (2005).
- Siegfried KR, Nüsslein-Volhard C: Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology* 324:277-287 (2008).
- Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Méndez G, Raz E: Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4074-4079 (2005).
- Strüssmann CA, Ito LS: Where does gonadal sex differentiation begin? Gradient of histological sex differentiation in the gonads of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). *J Morphol* 265:190-196 (2005).
- Takashima F, Patino R, Nomura M: Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46:1317-1322 (1980).
- Tanaka M, Saito D, Morinaga C, Kurokawa H: Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Development, Growth & Differentiation* 50:273-278 (2008).
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:RESEARCH0034 1-11 (2002).
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y: Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental dynamics* 236:2198-2206 (2007).
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A, Guiguen Y: An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* (2012).
- Yano A, von SK, Cooper G, Koop BF, Yoshizaki G: Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* 76:246-254 (2009).

Tableau 4 : Classification des animaux adultes XXmal

| Critères morphologiques externes | Combinaison de gonades |
|--|--|
| Mâle : peau lisse et présence de bécard, coloration de la robe (vert/jaune et orangé) | 2 ovaires immatures 2 ovaires post ovulés |
| Femelle : coloration de la robe (grise et rose), ovulation | 2 ovotestis |
| Femelles immatures : critères femelles mais pas d'ovules récoltés | Ovotestis/ovaire Ovotestis/testicule |
| Sexe indéterminé : pas de critères mâles ou femelles sûrs. | 2 testicules |

II. PROFILS STÉROÏDIENS DES ADULTES DE LA LIGNÉE « MAL »

Les données acquises depuis plusieurs années nous indiquent que cette masculinisation « *mal* » est une masculinisation fonctionnelle car cette lignée est entretenue depuis plusieurs générations et les animaux de cette lignée de phénotypes mâles comme femelles sont tout à fait fertiles à l'état adulte. Les données de l'analyse histologique (**article n°1**), nous ont montré qu'il existe une dérégulation précoce de la différenciation de la gonade qui va se répercuter sur le phénotype gonadique tardif par une masculinisation partielle de ces populations XXmal. La coexistence de tissus ovarien et testiculaire au sein du même animal, avec la production de stéroïdes sexuels associés, a forcément un impact sur le phénotype externe de l'animal puisque l'expression des caractères sexuels secondaires est sous la dépendance des stéroïdes. Nous avons voulu compléter la caractérisation du phénotype associé à « *mal* » par une analyse des profils stéroïdiens de ces animaux adultes.

Matériels et méthodes

La difficulté du suivi de ces animaux intersexués est de déterminer correctement leur sexe, spécialement dans une analyse de suivi de cohorte où il est exclu de sacrifier l'animal pour identifier son sexe gonadique. Des truites XXmal de 2 ans provenant de la ferme expérimentale INRA du Drennec (France) ont été sélectionnées, sur la base de critères morphologiques externes, en janvier juste après leur période de reproduction pour établir un profil stéroïdien type. À cette période, la plupart des femelles ont ovulé et les mâles sont encore spermiantes dans la souche synthétique dont est dérivée la lignée « *mal* ». Sur la base du phénotype externe, les animaux masculinisés devaient être plus facilement identifiables que les femelles, les mâles étant plus colorés que celles-ci et présentant une mâchoire inférieure développée (le « bécard »). Cependant un certain nombre d'animaux présentaient un phénotype externe ambigu au niveau de la coloration de la robe et de la morphologie de la tête, avec une absence de production de gamètes par pression abdominale.

Nous avons classé les animaux en 4 catégories selon leur morphologie externe (**tableau n°4**) : « Mâle », « Femelle », « Femelle immature » ou bien « Indéterminé ». Par la suite, ces animaux ont été sacrifiés pour établir leur profil type selon la morphologie externe, les gonades et le profil stéroïdien.

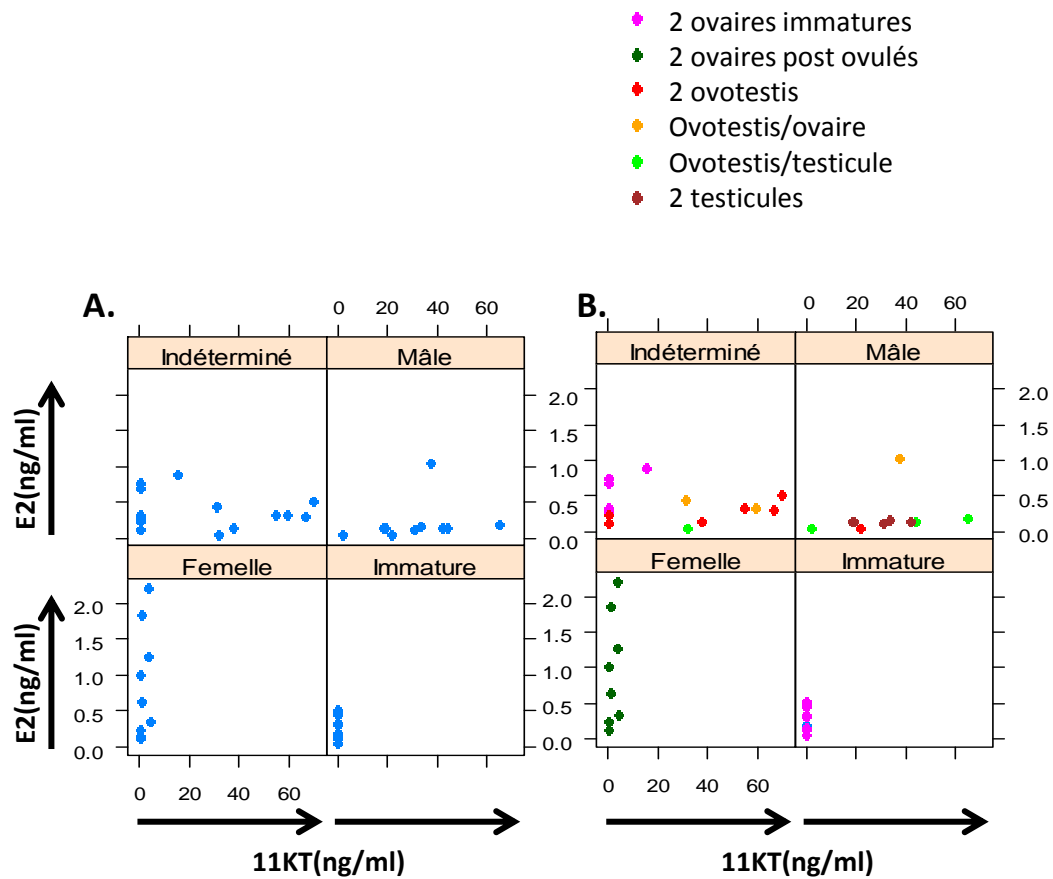


Fig. 8 : Profils stéroïdiens d'animaux à 2 ans. (A.) Le dosage (11KT et E2) des animaux classés selon des critères morphologiques externes en tant que mâle, femelle, immature ou indéterminé montrent des disparités surtout dans le groupe des animaux dont le sexe est indéterminé. **(B.)** L'analyse des profils stéroïdiens par l'association des types gonadique expliquent cette disparité selon le degré de masculinisation des gonades.

Bien qu'à cette période les femelles ont un faible taux d'oestradiol-17 β (E2) circulant [Fostier *et al.*, 1978; Espinosa *et al.*, 2013], c'est également la période avec les plus fort taux de 11KT (11-kéto-testosterone) plasmatique chez les mâles [Fostier *et al.*, 1982; Fostier *et al.*, 1984; Espinosa *et al.*, 2011]. Nous avons donc dosé les taux plasmatiques d'E2 et 11KT des truites par radioimmunologie (RIA) après avoir classé les animaux selon leur phénotype externe. Sur la **Fig. 8** sont représentés les taux circulants en ng/ml de 11KT (en abscisse) et d'E2 (en ordonnée) en fonction des phénotypes sexuels externes. Le dosage RIA des stéroïdes sexuels circulants est réalisé après extraction sur du plasma sanguin (récupéré après centrifugation de 0,5 ml de sang ponctionné au niveau de la nageoire caudale) selon les techniques mises au point pour la 11KT [Fostier *et al.*, 1982] et l'E2 [Fostier *et al.*, 1978].

Résultats & Discussion

En accord avec la littérature pour cette période, le taux plasmatique d'E2 des animaux classés sur la base de leur phénotype externe comme « femelles » est faible [Fostier *et al.*, 1978; Fostier and Jalabert, 1986] mais détectable contrairement aux animaux classés comme des mâles phénotypiques. Par ailleurs la 11KT est détectée à des niveaux élevés chez ces animaux classés comme des mâles phénotypiques. De tels profils sont similaires à ceux observés chez des témoins mâles XY et des néomâles XX durant leur cycle de reproduction [Espinosa *et al.*, 2011; Espinosa *et al.*, 2013], bien que dans cette étude récente les taux d'androgènes ne varient pas entre les mâles spermants et les non spermants.

Les animaux identifiés comme « femelles » sur leur phénotype externe (**Fig. 8A**) produisent beaucoup d'E2 et pas de 11KT, avec des variations inter-individuelles pour les mesures d'E2. Les animaux classés comme « femelles immatures » ne produisent pas de 11KT et extrêmement peu d'E2. Les animaux classés comme « mâles » ont des taux variables de 11KT et ne produisent pas d'E2 sauf un animal qui présente un taux moyen d'E2 et de 11KT. Parmi les poissons dont le phénotype a été classé comme « indéterminé », les taux d'E2 et 11KT sont variables selon les individus. Ces variations peuvent s'expliquer par le phénotype gonadique (la combinaison du type de gonades de chaque animal) de ces animaux classés comme « indéterminés » comme le montre la répartition proposée des sous-groupes dans la **Fig. 8B**.

La comparaison des combinaisons des différents types de gonades confirment la sélection que nous avons réalisée basée à partir de critères morphologiques externes pour les « femelles » et les « femelles immatures ». Le taux variable d'E2 des femelles post ovulantes dépend de la reprise ou non de la gamétogénèse (1989) [Fostier *et al.*, 1978]. De même les « femelles immatures » ont des ovaires immatures produisant très peu d'E2, ce phénotype est possible car les femelles de la souche étudiée développent un premier cycle sexuel (« puberté ») soit dans leur deuxième année, soit dans

Tableau 5 : Phénotype des poissons à sexe indéterminé triés par le ratio 11KT/E2.

| 11KT (ng/ml) | E2 (ng/ml) | 11KT/E2 | phénotype externe | gonades | phénotype détaillé |
|--------------|------------|---------|-----------------------------------|---------|---|
| 32,1 | 0,0 | 802 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | T-T | Testicules |
| 37,6 | 0,1 | 290 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | OT-OT | ovotestis |
| 66,6 | 0,3 | 225 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | OT-OT | ovotestis |
| 59,4 | 0,3 | 188 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | O-OT | ovaire immature/ovotestis |
| 54,8 | 0,3 | 175 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | OT-OT | ovotestis |
| 70,0 | 0,5 | 136 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | OT-OT | ovotestis |
| 31,5 | 0,4 | 71 | mâle (peau lisse, <i>bécard</i>) | O-OT | ovaire/ovotestis |
| 15,2 | 0,9 | 17 | femelle | O-O | ovaire immature |
| 0,2 | 0,1 | 2 | femelle | OT-OT | ovotestis |
| 0,2 | 0,2 | 1 | femelle | OT-OT | ovotestis avec petit nodules testiculaire |
| 0,2 | 0,3 | 1 | femelle | O-O | ovaire immature |
| 0,2 | 0,3 | 1 | femelle | O-O | ovaire immature |
| 0,2 | 0,3 | 1 | femelle (ovulante) | O-O | ovaire post ovulatoire |
| 0,2 | 0,7 | 0 | femelle | O-O | ovaire immature |
| 0,2 | 0,8 | 0 | femelle | O-O | ovaire immature |

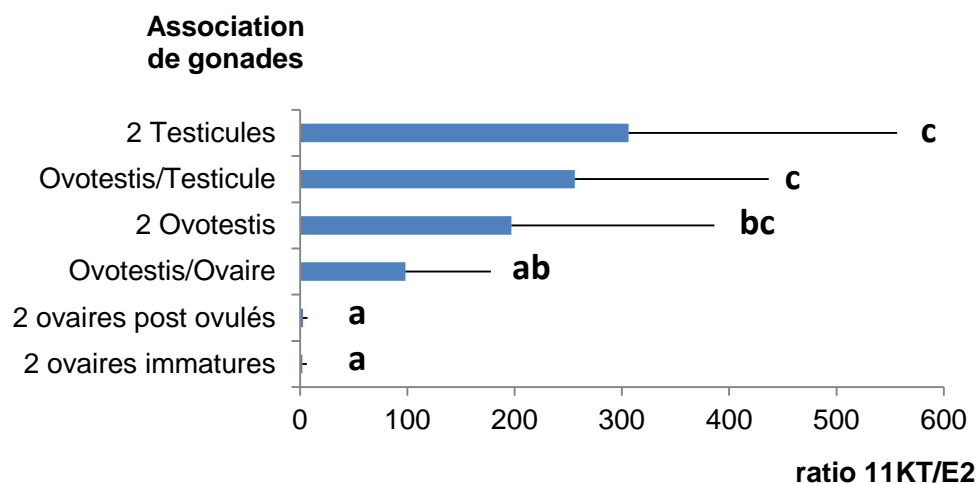


Fig. 9 : Ratio 11KT/E2 selon le type gonadique à 2ans quelque soit le sexe (étude sur les animaux sexés en janvier 2010). Le ratio 11KT/E2 semble être le meilleur critère pour classer les animaux car il reflète le degré de masculinisation des gonades. (ANOVA simple, $p < 7,6.10^{-6}$, ddl=6, classification des données par intervalle de confiance : Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

leur troisième. L'individu « mâle » observé avec un taux d'E2 circulant plus fort s'avère posséder un ovotestis et un ovaire qui peuvent expliquer ce taux plasmatique. Parmi les animaux classés comme mâles, beaucoup possèdent en réalité des ovotestis et sont donc des intersexués comme nous l'avons vu précédemment (**article n°1**).

Les poissons identifiés par critères morphologiques externes dans la catégorie des « indéterminés » sont, après observation des gonades, des femelles immatures et des animaux intersexués qui peuvent être distingués par leur production d'E2 et de 11KT. Dans le **tableau n°5**, ces poissons sont classés selon leur ratio 11KT/E2, ce qui nous permet de trier les individus par le taux de masculinisation. Le ratio 11KT/E2 semble être un bon indicateur de la masculinisation des individus XXmal en janvier (**Fig. 9**). Les animaux XXmal ont des niveaux circulants de stéroïdes sexuels qui sont globalement en accord avec leur phénotype sexuel externe. Bien que cette production de stéroïdes dépende du degré de masculinisation des gonades, un ovotestis peut produire à la fois de l'œstradiol (E2) et de la 11 kéto testostérone (11KT), ces deux stéroïdes étant requis, respectivement, pour le développement complet de la gamétogénèse mâle et femelle chez la truite arc-en-ciel. Néanmoins 2 catégories d'animaux présentent des profils divergents : les femelles immatures qui n'ont pas ovulé à 2 ans d'âge ont des taux de 11KT et E2 quasi indétectables et le lot d'animaux à sexe indéterminé présente des taux variables selon les individus.

Après le sacrifice des poissons, le reclassement selon la combinaison des gonades observée (ex : 2 testicules ou un ovotestis et un testicule) explique les variations observées (voir **Fig. 8B**). Spécialement dans le groupe des animaux dont le sexe était indéterminé (**Tableau n°5**), le tri par le ratio 11KT/E2 reflète bien le taux de masculinisation des individus, le ratio le plus élevé étant observé chez un mâle avec 2 testicules, et le moins élevé chez une femelle immature.

En conclusion en tant qu'indicateur de la masculinisation, il est préférable de se baser sur le ratio 11KT/E2 en janvier qui est plus discriminant que le phénotype sexuel externe pour le suivi des animaux XXmal (**Fig. 9**). Cela permettrait de hiérarchiser le phénotype masculinisé chez ces animaux sans procéder à l'analyse macroscopique des gonades qui nécessite le sacrifice de ces animaux.

D'un point de vue physiologique, ces résultats montrent aussi que des truites XXmal intersexuées peuvent développer une gamétogénèse complète et fonctionnelle dans les deux compartiments ovarien et testiculaire de leur ovotestis. En particulier, des taux circulants élevés de 11KT ne semblent pas empêcher le développement ovarien et à l'inverse, des taux élevés d'E2 n'empêchent pas le développement testiculaire.

III. ANALYSES MOLÉCULAIRES DE LA MASCULINISATION DE LA LIGNÉE «*MAL*»

Introduction

Chez la truite arc-en-ciel, la différenciation sexuelle de la gonade commence aux alentours de l'éclosion [Vizziano *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2012a]. Pourtant l'application de traitements masculinisants à des alevins XX à partir de la 1^{ère} alimentation, soit environ un mois après l'éclosion, suffit à inverser totalement le sexe [Jalabert *et al.*, 1975; Johnstone *et al.*, 1979]. L'étude moléculaire des masculinisations, soit par des traitements avec des androgènes exogènes, soit par des traitements avec un inhibiteur de l'aromatase (tel que 1,4,6-androstatriène-3,17-dione ou ATD), met en avant des points communs à ce phénomène de masculinisation, comme par exemple la répression des gènes exprimés par les cellules de granulosa, et plus spécialement l'aromatase gonadique i.e., *cyp19a1a* [Baron *et al.*, 2005b; Baron *et al.*, 2008a; Vizziano *et al.*, 2008]. En ce qui concerne les animaux de la lignée *mal*, le ou les gènes responsables du phénotype masculinisé restent encore inconnus.

Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que, paradoxalement à la pénétrance incomplète du phénotype masculinisé associé à la mutation « *mal* » chez les adultes [Quillet *et al.*, 2002], la différenciation morphologique des gonades de la plupart des animaux XX*mal* était perturbée quel que soit le sexe (**article n°1**). En plus d'un retard dans la mise en place de la méiose et de l'organisation des gonades XX*mal*, le nombre de cellules germinales détectées est réduit en comparaison des animaux témoins, laissant supposer un retard dans la gonadogenèse ou au moins dans la gamétogénèse. En dépit de ces perturbations précoces, les animaux « *mal* » adultes sont fertiles et ont des niveaux de stéroïdes sexuels circulants en corrélation avec leur phénotype gonadique (voir « **profils stéroïdiens** »).

Dans un second temps, les familles *mal1* et *mal2* décrites dans l'**article n°1** ont été utilisées pour répondre à une autre problématique : quel est le phénotype moléculaire (d'expression de gènes) lors de cette masculinisation gonadique. Afin d'y répondre, nous avons comparé l'expression de gènes, au cours de la différenciation sexuelle, de gonades des animaux XX*mal* et à celles de témoins mâles XY et femelles XX. Nous avons d'abord focalisé l'analyse sur des gènes candidats sélectionnés pour leur importance dans le processus de différenciation sexuelle de la gonade. Puis nous avons effectué une analyse transcriptomique sans *a priori* de façon à analyser de façon globale et exhaustive le phénotype moléculaire de ces gonades pendant leur différenciation.

Table 6 : Gènes sélectionnés à partir du microarray.

| Cluster | contig microarray | gènes | annotation complète | amorces | plasmides | contig agенаe |
|---------|----------------------|---------|--|--|-----------------|------------------------|
| C2 | TC125280 | inconnu | inconnu | 5'-AGGATGGGTTCTTGCCTAATGAA-3' 3'-GCGCTTTACTGCTACGTCTCATC-5' | tcad0007.i.11 | BX079143.s.om.10 |
| C3 | TC121419 | RSPH3 | (sp:Q86UC2) Radial spoke head protein 3 homolog OS=Homo sapiens GN=RSPH3 PE=2 SV=1 | 5'-TCATGTATGACCGACGTGTTGTC-3' 3'-CCTGCTGTCTCTGGACCTCAATA-5' | tcbk0045.n.16 | BX319897.s.om.10 |
| C3 | TC101181 | inconnu | inconnu | 5'-CTGTTCTACGACACGCTGGTAGC-3' 3'-GTTCAGAGCTAGCCCTTCTGTCA-5' | tcbk0015.n.07 | BX302848.s.om.10 |
| C3 | TC109819 | Rps8 | (sp:P62243) 40S ribosomal protein S8 OS=Rattus norvegicus GN=Rps8 PE=1 SV=2 | 5'-GCCCAATTTACTCCCACCTGTTA-3' 3'-CCTTTCCTTGATGACAGTTTTG-5' | pas de clone | CA353708.s.om.10 |
| C5 | TC95559 | HNMT | [BBH] HNMT_HUMAN (sp:P50135) Histamine N-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=HNMT PE=1 SV=1 | 5'-GAAGGAAAACAGCAAACCTGCTCA-3' 3'-AGTCAGAGATGGACTTGGTGACAG-5' | tcay0033.f.05 | BX312015.s.om.10 |
| C5 | TC113991 | SNAI2 | (sp:P97469) Zinc finger protein SNAI2 OS=Mus musculus GN=Snai2 PE=2 SV=1 | 5'-CGAGCTGGAAAGCCCTACAGTAT-3' 3'-GTATGCGACCGAGCTAAGGATCT-5' | 1RT11N10_D_G05 | FYV3OTN02FKTKE.s.om.10 |
| C5 | TC122977 | inconnu | Contient SUA5, un domaine conservé impliqué dans la traduction. | 5'-CCTGAACATAGCCTGGTTCCTCT-3' 3'-AGTAGAAAGACACCAGGCCGAAC-5' | 1RT137H20_D_D10 | CA373158.s.om.10 |
| C5 | TC98195 | ANGPTL7 | (sp:O43827) Angiopoietin-related protein 7 OS=Homo sapiens GN=ANGPTL7 PE=1 SV=1 | 5'-CAACAACCAACTCAGCACAAG-3' 3'-ATAGCGATAGAACACGCCATTCA-5' | tcad0004.b.24 | BX077265.s.om.10 |
| C6 | TC105270 | Csrp2 | [BBH] CSRP2_MOUSE (sp:P97314) Cysteine and glycine-rich protein 2 OS=Mus musculus GN=Csrp2 PE=2 SV=3 | 5'-TCTGAAGAGCATACTCCCCTGTG-3' 3'-CAGGTTTCCCACATCATAATGGA-5' | tcba0001.e.03 | BX087043.s.om.10 |
| C6 | TC123207 | WHSC2 | Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 | 5'-AGGCAGGGGTATCCTCAAGACTA-3' 3'-ATCCAGGAATCTGAGGGGACATA-5' | tcbi0043.k.09 | GBPNQUD01B33LO.s.om.10 |

Matériels et méthodes

a. Animaux et prélèvements

Les animaux témoins et ceux de la lignée « *mal* » ont été élevés dans la pisciculture expérimentale INRA du Drennec (PEIMA, Sizun, France) à 11°C. Les œufs ont été transférés au stade œillé (environ 15 jpf) dans les installations expérimentales du laboratoire INRA LPGP à Rennes, où ils ont été tout d'abord maintenus dans le circuit d'eau d'alevinage à 10°C±1°C puis transférés dans un autre circuit à 12±1°C à partir de l'éclosion (~30 jpf). En plus des familles de la lignée XX*mal*, des familles monosexes femelles XX et monosexes mâles XY ont été produites selon les techniques établies au laboratoire [Jalabert *et al.*, 1975; Chevassus *et al.*, 1979; Chevassus *et al.*, 1988] et utilisées comme des lots témoins dans nos expériences qui ont été conduites dans les mêmes conditions expérimentales que celles mentionnées dans l'**article 1** (voir « materials & methods »). Pour l'analyse des transcrits, aussi bien pour la quantification relative de leur expression que pour leur localisation, les lots « *mal* » utilisés correspondent à ceux issus de mères différentes et d'un même mâle de la lignée « *mal* », et décrits par histologie dans l'**article n°1**. Pour les autres expériences, il s'agit de lots de truites « *mal* » issus de pères et mères différents, élevés selon le même protocole d'élevage.

Pour la **quantification relative d'expression des gènes**, les gonades d'une centaine de poissons ont été prélevées par lot à chaque date de prélèvement (53 jpf, 60 jpf, 69 jpf, 84 jpf, 99 jpf et 113 jpf) pour étudier la période de la différenciation sexuelle. Elles ont été directement congelées dans l'azote liquide pour une conservation à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

Pour la **localisation d'expression des transcrits**, des troncs d'alevins ont été préparés à 43 jpf, 53 jpf et 60 jpf. Pour cela nous avons effectué une section du corps entre la tête et la nageoire caudale dans la zone où se trouvent les gonades le long de la vessie natatoire. L'intestin a été retiré pour permettre un meilleur accès aux gonades lors des différents traitements d'hybridation *in toto*, les troncs ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pour la nuit à 4°C, puis transférés dans du méthanol à -20°C en attente de leur analyse.

Le **taux de masculinisation** de chaque famille « *mal* » a été déterminé par l'analyse histologique des gonades prélevées à 11 mois. Ces taux de masculinisation sont donnés dans la partie résultats de l'**article n°1**.

b. Quantification de l'expression des transcrits

Les ARN totaux des gonades ont été extraits avec une solution commerciale (Trizol®) suivant le protocole recommandé par le fabricant, puis transformés en ADNc par reverse transcription et quantifiés par PCR en temps réel selon le protocole décrit dans l'**article n°1**. La normalisation de ces résultats a été réalisée par une quantification relative à l'expression du gène ubiquitaire *ef-1α*.

Les amorces utilisées ont été publiées précédemment par le laboratoire [Vizziano *et al.*, 2007], et celles définies à partir des données du microarray sont présentées dans le (**tableau n°6**).

c. Analyses statistiques

Les résultats de PCR en temps réels ont été analysés avec une ANOVA pour comparer l'expression moyenne des transcrits dans les gonades entre les différents lots, tous âges confondus, et avec un test non paramétrique de type Kruskal-Wallis et Mann Whitney lorsque les conditions ne permettaient pas d'appliquer des tests paramétriques.

d. Localisation de l'expression des transcrits

L'hybridation *in toto* a été réalisée sur des troncs ouverts de truites fixées au paraformaldéhyde 4%. Des ribosondes anti sens marquées à la digoxigénine ont été produites en utilisant le kit Promega T3/T7 RNA Polymerase à partir des amplicons M13/M13R de plasmides contenant l'insert du gène d'intérêt. L'hybridation des ribosondes a été réalisée selon le protocole décrit par [Yano *et al.*, 2011] à l'aide de l'automate d'hybridation *in situ* Intavis AG. Des photographies macroscopiques sont prises avant l'inclusion dans la paraffine. Les échantillons sont déshydratés et inclus perpendiculairement en paraffine pour réaliser, par la suite, des coupes transversales de 5 µm.

e. Puce à ADN

Les ARN totaux purifiés à partir des gonades ont également été utilisés pour des analyses d'expression génique à haut débit par hybridation de puces à ADN. Nous avons utilisé la technique AGILENT One Color et une puce à ADN 37K de truite construite à partir des connaissances sur les séquences exprimées (EST) de truite acquises préalablement à ma thèse [Govoroun *et al.*, 2006]. Une annotation automatique du microarray est proposée par SIGENAE, la version utilisée étant la version dite « s.om.10 ». Les données d'expression ont été normalisées, analysées par un test de type "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) [Tusher *et al.*, 2001] avec une comparaison multi-classes correspondant aux 4 groupes analysés (Mâles témoins, Femelles témoins, XXmal1 et XXmal2). Les profils d'expression génique significativement différents entre au moins deux groupes avec un FDR (False Discovery Rate) inférieur à 5% ont été normalisés (transformation logarithmique, centrage médian et normalisation des profils d'expression génique). Ces données ont ensuite été regroupées en « clusters » d'expression similaire en utilisant l'algorithme de clustering non hiérarchique « k-mean » du logiciel Cluster [Eisen *et al.*, 1998]. Les paramètres retenus pour cette analyse sont un nombre de cycles maximum de 100 et une valeur de « k » (nombre de groupes) de 7. Les résultats de cette analyse ont été visualisés avec le logiciel Java TreeView [Saldanha, 2004].

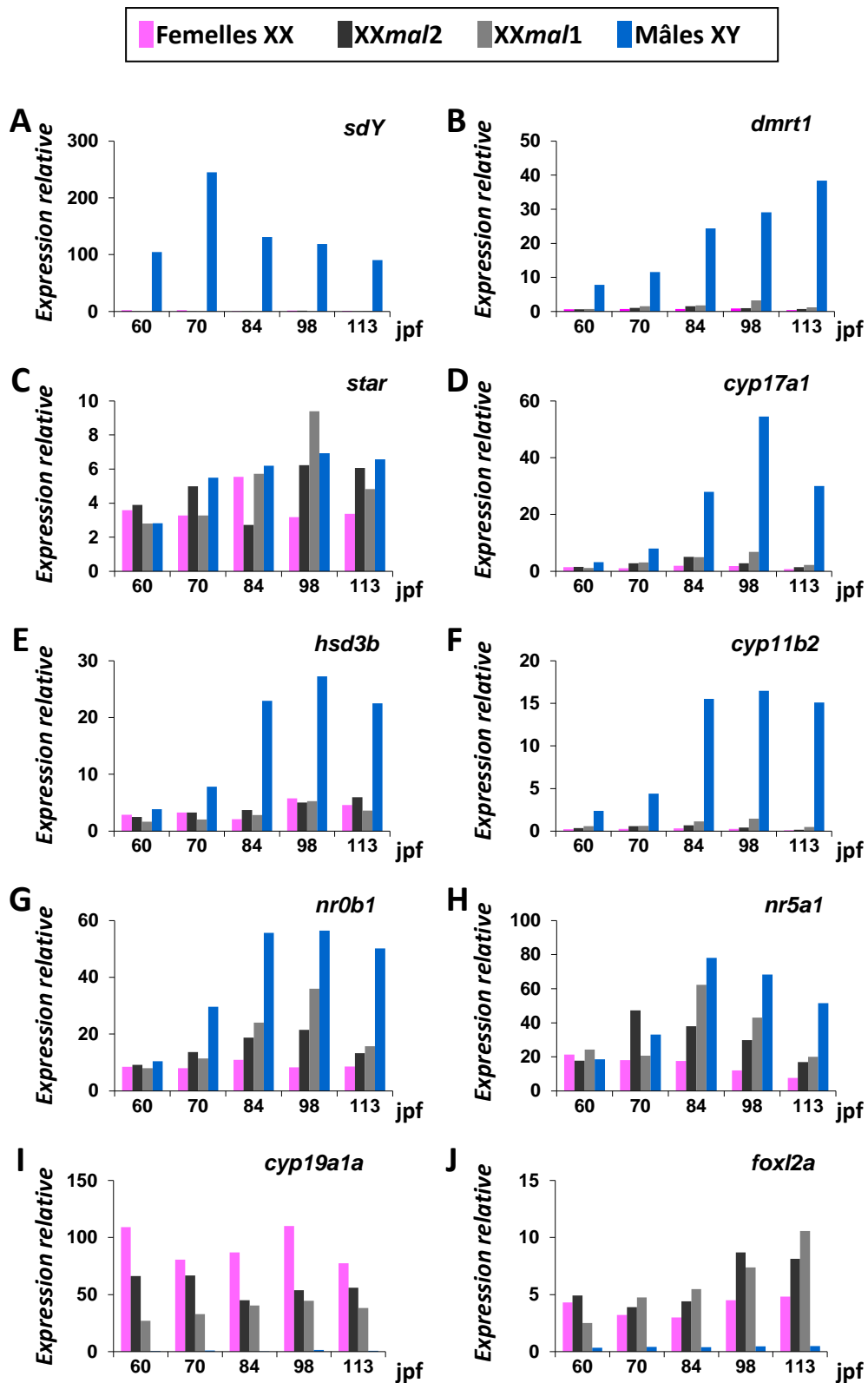


Fig. 10 : Expression relative de quelques gènes de la différenciation sexuelle et de la stéroïdogénèse dans la gonade en cours de différenciation. Les résultats sont représentés par le ratio entre l'expression spécifique du gène et celle de *ef1α*.

Résultats

a. Gènes de la différenciation sexuelle et de la stéroïdogénèse entre 60 et 113 jpf.

En parallèle de la description histologique de la différenciation sexuelle réalisée dans l'article n°1, des gonades d'animaux prélevées à partir de la 1^{ère} alimentation ont été utilisées pour une analyse des transcrits de quelques gènes clefs de la différenciation sexuelle et de la stéroïdogénèse afin d'identifier des gènes impliqués dans cette masculinisation (Fig. 10).

Quantification des transcrits des gènes de la différenciation sexuelle et de la stéroïdogénèse (Fig. 10)

À 60 jpf, plusieurs gènes sont différenciellement exprimés entre mâles et femelles témoins comme *sdY* (*sexually dimorphic on the Y chromosome*), *dmrt1* (*doublesex and mab-3-related transcription factor 1*), *cyp11b2* (*cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2*) en faveur des mâles et inversement *cyp19a1a* (*cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a*) et *foxl2a* (*forkhead box l2a*) en faveur des femelles. Puis à 70 jpf, l'expression des gènes *star* (*steroidogenic acute regulatory protein*), *cyp17a1* (*cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide*), *hsd3b* (*hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta*), *nr0b1* (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*) et *nr5a1* (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*) augmente chez les mâles témoins. Ces gènes ont majoritairement dans les gonades XXmal, un profil d'expression similaire à celui des femelles témoins XX, à l'exception de quelques gènes pour lesquels l'expression est dérégulée en comparaison de celle des femelles témoins. Ces profils dérégulés sont en cohérence avec une masculinisation soit associée à une surexpression de gènes (*star*, *nr0b1*, *nr5a1*) soit associée à une sous-expression de gènes (*cyp19a1a*), sauf pour *foxl2a* qui a tendance à être plus fortement exprimé que dans les ovaires témoins à partir de 70 jpf.

Les niveaux d'expression relatifs des gènes *nr5a1*, *nr0b1*, *cyp19a1a* et *foxl2a* tendent à être différents entre les familles mal1 et mal2.

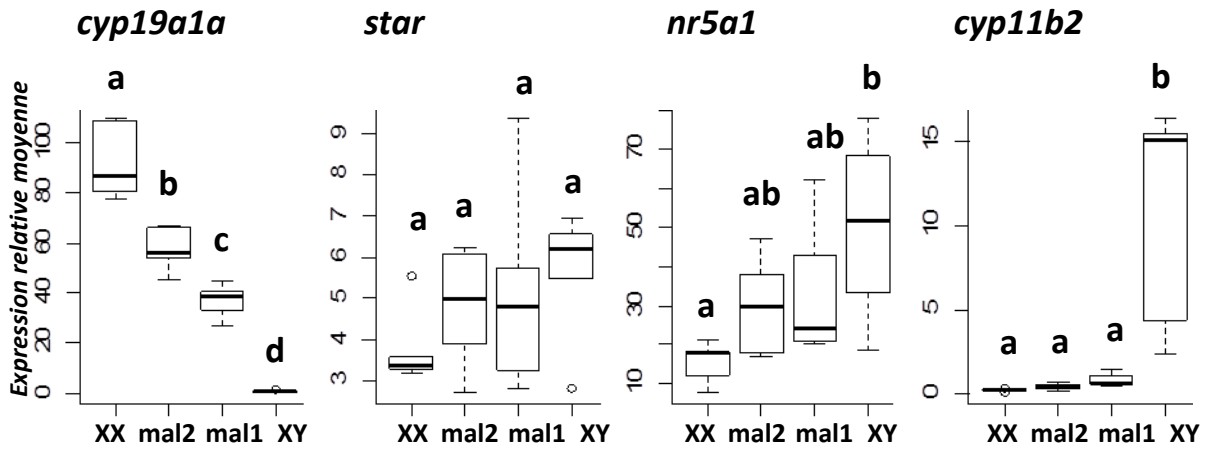


Fig. 11 : Expression relative moyenne de gènes chez les XXmal au cours de la différenciation sexuelle. Les profils d'expression des gènes, tel que *cyp11b2*, chez les animaux « mal » sont similaire à ceux des femelles témoins sauf pour *cyp19a1a*, *star* et *nr5a1*. Les résultats sont présentés en « boîte de dispersion » et les moyennes sont ordonnées par le test de Tukey après l'analyse ANOVA. (n=5 dates par lot).

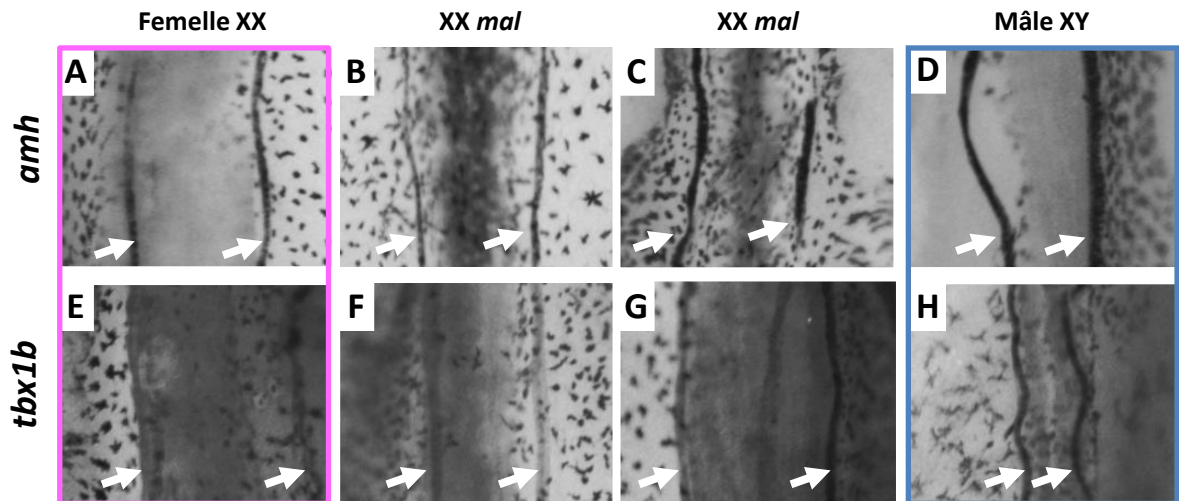


Fig. 12 : Hybridation in toto de l'*amh* et *tbx1b*, des marqueurs de la différenciation testiculaire à 43jpf. Expression forte dans les testicules témoins et faible dans les ovaires, indiquant probablement une masculinisation de certains individus XXmal dont l'expression de ces gènes est forte dans les gonades (C et G).

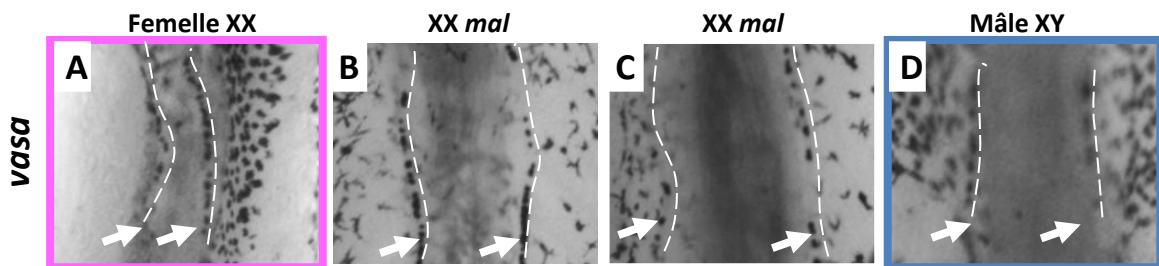


Fig. 13 : Hybridation in toto de *vasa* à 43jdpf. L'expression de ce marqueur des cellules germinales est discontinue le long de la gonade.

Profil moyen d'expression (Fig. 11)

Une analyse ANOVA comparant les moyennes de l'expression de ces transcrits par lot pour l'ensemble des prélèvements révèle que les transcrits XXmal ont globalement une moyenne d'expression similaire aux femelles témoins XX pour tous les gènes analysés (ex avec *cyp11b2*) sauf pour *cyp19a1a*, *star* et *nr5a1* (Fig. 11). Chez les animaux XXmal, l'expression moyenne du gène *cyp19a1a* est non seulement diminuée en comparaison de celle des femelles témoins, mais l'expression moyenne de *cyp19a1a* est aussi plus faible pour *mal1*, ce qui montre aussi qu'il existe des différences entre les 2 familles XXmal. En revanche, la tendance observée concernant l'expression du gène *nr5a1* au cours du temps ne se traduit pas par une différence significative entre *mal1* et *mal2*. Il n'y a pas non plus d'expression différentielle du gène *star* entre truites témoins et truites « mal ».

Localisation de l'expression par hybridation in toto (HIT)

Ces résultats obtenus par qPCR ont été complétés par des études de localisation des transcrits de quelques gènes importants et ce à 43 jpf qui est un stade de développement plus précoce de la gonade que ceux retenus pour nos expériences de qPCR. Cette approche permet également d'avoir des informations au niveau individuel contrairement aux analyses précédentes qui étaient réalisées sur des pools de gonades représentatifs d'une moyenne de nombreux individus. Nous avons effectué une étude macroscopique après HIT de l'ensemble du tronc ouvert permettant une observation du signal sur l'ensemble de la gonade. La gonade apparaît comme un long filament noir lorsque le signal d'expression est fortement marqué.

En analysant des marqueurs précoces de différenciation testiculaire, comme ici *amh* (anti-mullerian hormone) et *tbx1b* (T-box transcription factors 1), deux phénotypes sont visibles à 43 jpf (Fig. 12). Pour ces 2 gènes, l'intensité du signal est plus forte dans les testicules témoins (Fig. 12D,H) que dans les ovaires témoins (Fig. 12A,E). En comparaison les gonades XXmal peuvent être classées *a priori* soit comme des ovaires (Fig. 12B,F) soit comme des testicules (Fig. 12C,G) en fonction des individus analysés.

Concernant le marqueur de cellules germinales, *vasa* (vasa homolog), sa localisation est discontinue tout au long de la gonade avec la même intensité de signal aussi bien chez les animaux XXmal que les témoins mâles et femelles à 43 jpf (Fig. 13). Il ne semble pas y avoir de différences visibles.

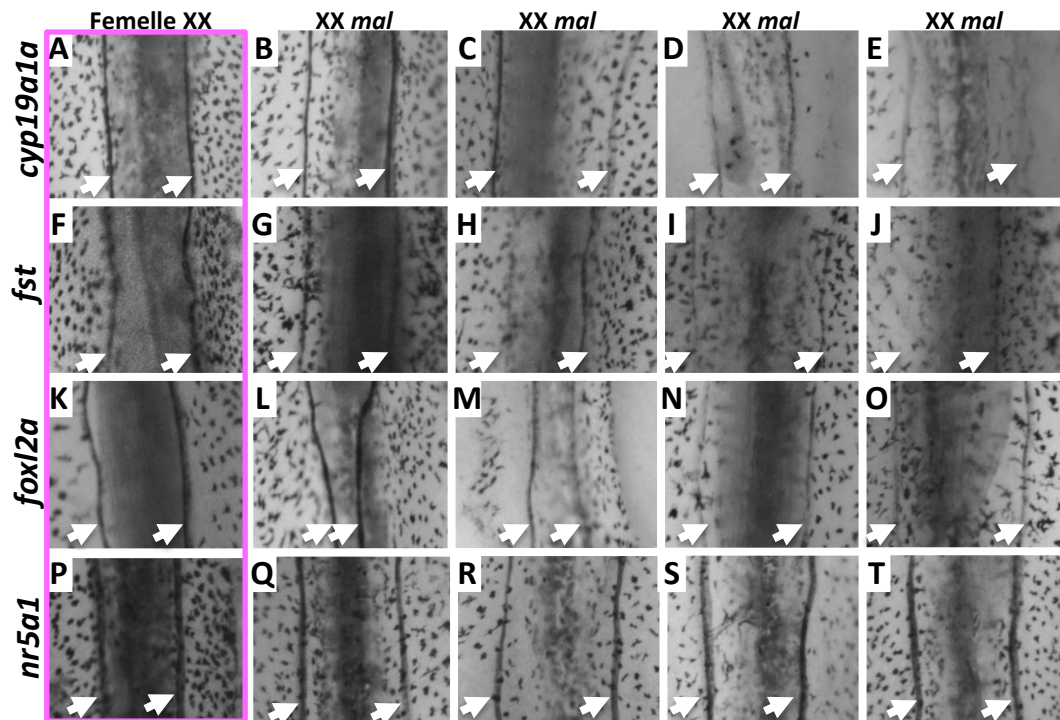


Fig. 14 : Hybridation *in toto* de l'aromatase (*cyp19a1a*), *foxl2a*, la follistatine (*fst*) et *nr5a1* à 43jpf. Les animaux de la lignée mal présentent un phénotype gonadique variable en ce qui concerne l'expression de l'aromatase, *foxl2a* et la follistatine (l'emplacement des gonades est indiqué par des flèches blanches). (B,G,L) Ces gènes peuvent être fortement exprimés le long des gonades comme chez les femelles (A,F,K), l'expression peut être asymétrique (C), faible et discontinue (D), ou nulle (E,J,N,O).

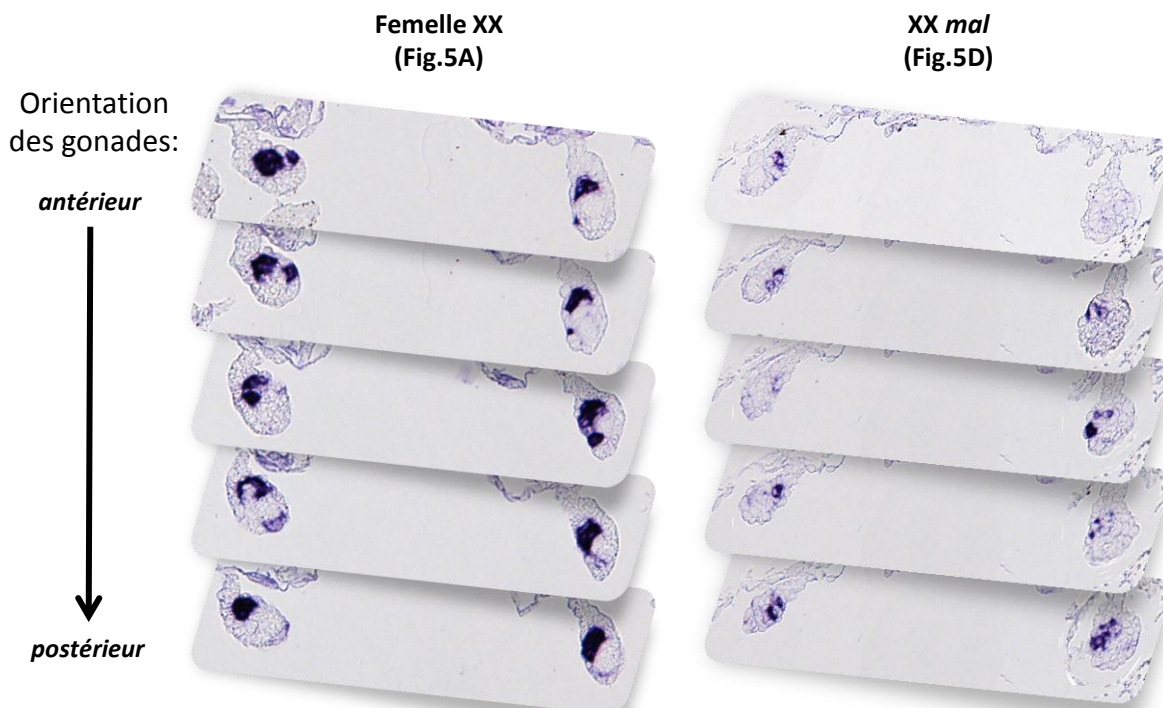


Fig. 15 : Coupes transversales après hybridation *in toto* de *cyp19a1a* à 43jpf. Les coupes transversales des tronc (A) et (D) sont disposées selon une orientation antéro-postérieure. Le signal *cyp19a1a* localisé dans les cellules stéroïdogènes au sein de la gonade indique que le transcrite est sous exprimé de façon discontinue chez cet individu XXmal.

Un autre gène dont l'expression ne semble pas dérégulée à 43 jpf est le régulateur de la stéroïdogénèse *nr5a1* (*sf1*) qui est exprimé fortement aussi bien le long des gonades des femelles témoins que des animaux XXmal analysés à 43 jpf (**Fig. 14P-T**).

Les marqueurs de la différenciation ovarienne, *cyp19a1a* (**Fig. 14A**), *fst* (**Fig. 14F**) et *foxl2a* (**Fig. 14K**) sont fortement exprimés tout le long de la gonade à 43 jpf chez les femelles témoins. Dans les gonades XXmal, la topologie et l'intensité d'expression sont dérégulés de façons très variables d'une gonade à l'autre. Ces phénotypes varient d'une expression similaire au phénotype des femelles témoins, c'est-à-dire qu'ils présentent un signal fort et continu (**Fig. 14B,G,L**), ou bien une diminution partielle du signal (**Fig. 14H,M**) ou encore une disparition complète du signal (**Fig. 14E,I,J,N,O**). Le cas le plus intéressant est celui de *cyp19a1a* où l'on peut observer soit une asymétrie d'expression du transcrite (**Fig. 14C**), soit une expression faible et discontinue (**Fig. 14D**) dans les deux gonades, sinon une disparition complète du signal (**Fig. 14E**).

La non détection des transcrits *cyp19a1a*, *foxl2a* et *fst* pourraient indiquer la future masculinisation de ces gonades XXmal. Pour *cyp19a1a*, l'analyse de pools de gonades montrait effectivement une diminution de son expression chez les XXmal par rapport aux femelles témoins.

En complément pour l'HIT de *cyp19a1a* (**Fig. 15**), l'observation des coupes transversales de troncs d'une femelle témoin XX (**Fig. 14A**) et de l'animal XXmal avec l'expression faible et discontinue (**Fig. 14D**) confirment les observations macroscopiques. Au niveau microscopique, le signal *cyp19a1a* est localisé dans les cellules stéroïdogènes, avec une intensité faible et aléatoire tout au long de la gonade chez l'individu XXmal analysé en comparaison à la femelle témoin XX. Cet individu XXmal exprime donc l'aromatase gonadique en moindre quantité.

L'étude macroscopique des HIT met en évidence une altération de l'expression des gènes, plus particulièrement ceux de la différenciation ovarienne. La quantité d'animaux dérégulés observés et le type de dérégulation montrent que cela ne concerne pas que les animaux qui vont effectivement être masculinisés.

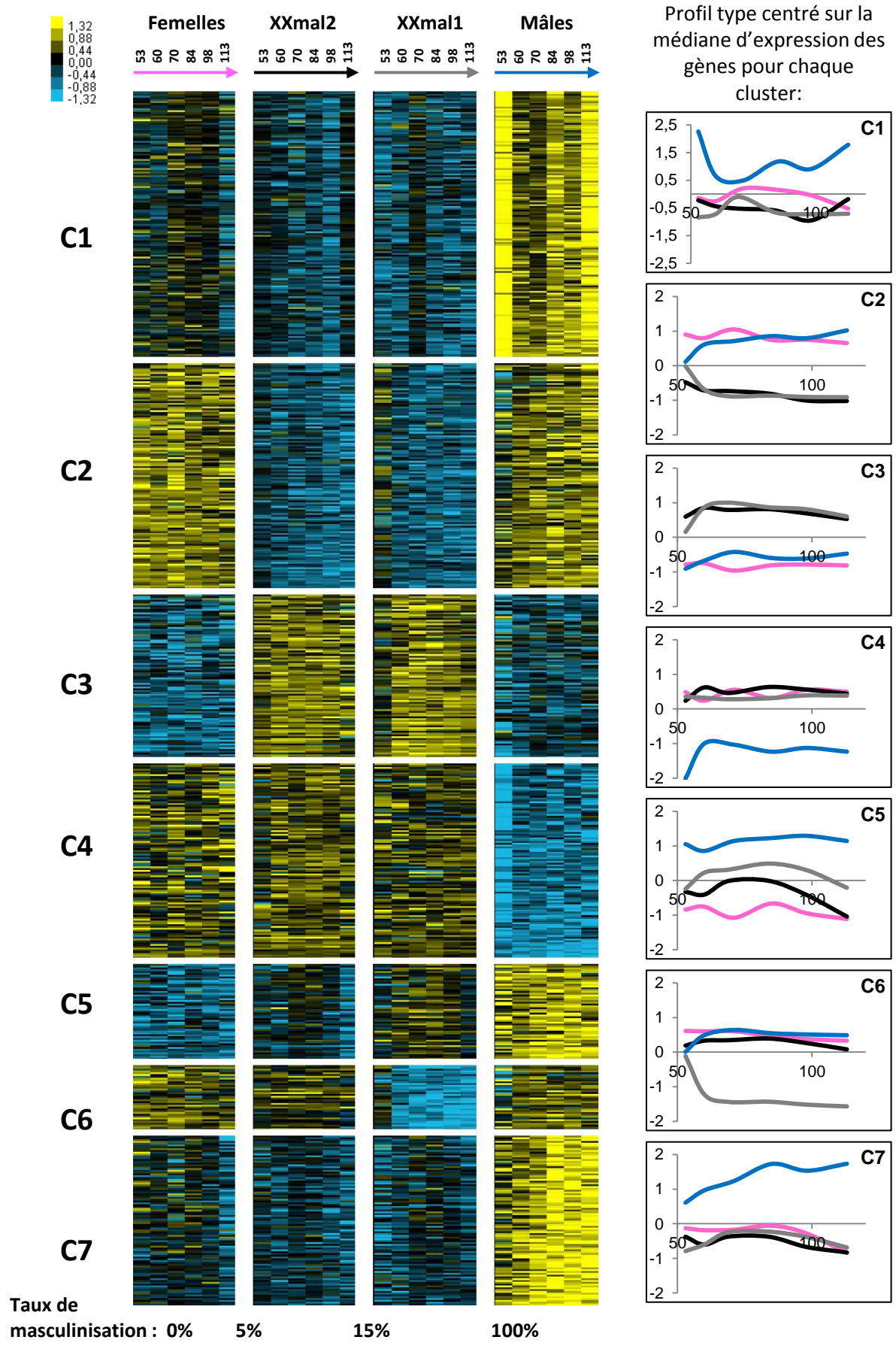


Fig. 16 : Transcriptome de gonades pendant la différenciation sexuelle et taux de masculinisation.

b. Transcriptomes des gonades entre 53 et 113 jpf

Pour compléter les analyses de gènes candidats, une analyse transcriptomique a été réalisée afin de rechercher de nouveaux gènes candidats impliqués dans cette masculinisation de populations génétiquement femelles. Les familles XXmal ont été sexées *a posteriori* (**article n°1**) et présentent des différences significatives de taux de masculinisation, sont 15% et 5% pour les familles mal1 et mal2 respectivement.

Microarray de gonades (Fig. 16)

Après analyse statistique, 663 gènes différentiellement exprimés ont été regroupés par profils d'expression moyens en 7 groupes par la méthode des *k means* (**Fig. 16 et voir Annexe 1 : liste des gènes annotés du microarray**) :

Le cluster **C1** contient 146 gènes surexprimés uniquement chez les mâles témoins, dont *esr1* (estrogen receptor 1).

Le cluster **C2** contient 127 gènes sous-exprimés chez les animaux XXmal par rapport aux animaux témoins mâles et femelles, dont *fasn* (*fatty acid synthase*).

Cluster **C3** : 92 gènes surexprimés chez les animaux XXmal par rapport aux animaux témoins mâles et femelles.

Cluster **C4** : 110 gènes surexprimés chez les femelles témoins et les animaux XXmal dont : *foxl2* et *cyp19a1a*.

Cluster **C5** : 55 gènes surexprimés chez les mâles témoins, exprimés également chez les animaux XXmal avec une différence entre familles dont *cyp11b2*, *angptl7* (angiopoietin-like 7) et *tbx1a*.

Cluster **C6** : 37 gènes sous-exprimés uniquement dans la famille la plus fortement masculinisée (mal1).

Cluster **C7**: 96 gènes surexprimés uniquement chez les mâles témoins dont *dmrt1*, *hsd3b*, *amh*, *gja1* et *sox9a2*.

L'analyse globale de ces profils d'expressions indique que 52% des gènes retenus comme différentiellement exprimés sont identiques entre les femelles témoins et les animaux XXmal. Parmi ceux-ci 36% sont sous-exprimés (C1 et C7) et 16% surexprimés (C4) par rapport aux animaux mâles témoins. Les familles XXmal présentent également un assez grand nombre de profils d'expression différents à la fois des animaux témoins mâles et femelles (33% des gènes avec 19% de transcrits sous-exprimés (C2) et 14% surexprimés (C3) par rapport aux témoins).

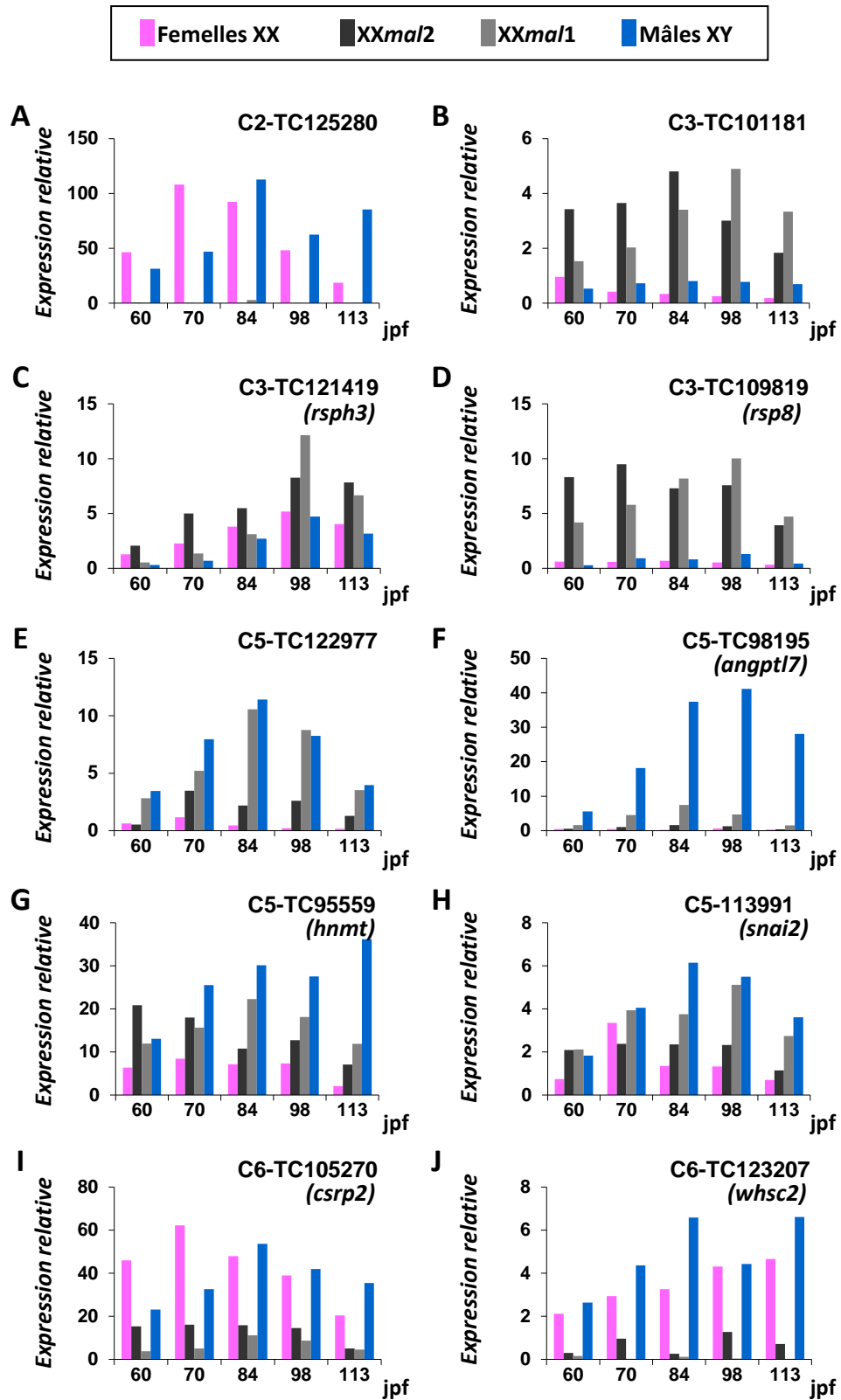


Fig. 17 : Expression relative de gènes sélectionnés à partir des clusters caractéristiques de l'analyse par microarray. Normalisée avec *ef1 α*

De façon intéressante le cluster C5 qui contient des gènes clairement surexprimés chez les mâles témoins montre des différences entre les deux familles XXmal. Ces différences sont, de plus, en accord avec leurs taux de masculinisation respectifs puisque pour la famille XXmal1, qui est la plus masculinisée à 11mois (15% de masculinisation) ces gènes du cluster C5 apparaissent plus exprimés que dans la famille XXmal2 (5% de masculinisation). Le cluster C6 a lui aussi un profil assez intéressant car il contient des gènes qui sont sous-exprimés uniquement chez les animaux de la famille XXmal la plus masculinisée (XXmal1).

Validation par qPCR de gènes caractéristiques des contigs

Pour valider ces données nous avons sélectionné quelques gènes pour les tester en qPCR. Ces gènes ont été choisis sur la base de leurs profils d'expression représentatifs des profils des gènes contenus dans les clusters C2 et C3 qui contiennent des gènes dérégulés (surexpression ou sous-expression) spécifiquement dans les familles XXmal ; le cluster C5, qui contient des gènes marqueurs de la masculinisation; et le cluster C6, qui contient des gènes dont les profils d'expression signent la masculinisation plus importante de la famille XXmal1 (**Tableau 6 et Fig. 17**). Ces gènes ont fait l'objet d'une ré-annotation manuelle car au moment de l'analyse l'annotation automatique n'était pas de bonne qualité.

Sur les 20 gènes analysés, seuls 10 présentent un profil d'expression en qPCR similaire à celui obtenu par l'analyse de type microarray. Parmi ces 10 gènes (**Fig. 17**), 7 ont une annotation protéique clairement établie. Il s'agit des gènes suivant :

rsph3 – (C3 ; TC121419), un homologue de radial spoke head protein 3 contenant un domaine conservé ([pfam06098](#) : Radial_spoke_3), ces protéines étant impliquées dans des fonctions diverses telle la motilité des flagelles, des fonctions sensorielles et de développement. Son expression augmente dans le temps plus fortement chez les animaux XXmal et sans différence entre mâles et femelles témoins.

rsp8 – (C3 ; TC109819), une protéine de la petite sous unité ribosomale 40S interagissant directement avec l'ARN ribosomal 18S par le domaine conservé ([cd11382](#): Ribosomal_S8e), fonction dans la traduction. Ce gène est très fortement exprimé chez les XXmal en comparaison des témoins.

angpt17 – (C5 ; TC98195), une des dernières protéines angiopoïétine-like découverte, elle pourrait être une cible de la voie Wnt/ β -caténine [Katoh and Katoh, 2006], elle possède le domaine conservé C-terminal FrEDs associé aux fibrinogènes [[cd00087](#) : FrED] mais son rôle exact n'est pas encore connu. Quelques travaux chez l'humain et la souris ont démontré que la Dexaméthasone (un glucocorticoïde de synthèse) et TGF β 2 stimulent l'expression de *Angpt17* [Kuchtey *et al.*, 2008], et suggèrent une fonction dans la formation de la matrice extra-cellulaire au niveau de l'œil [Comes *et al.*, 2011]. Ce marqueur est très fortement exprimé dans les testicules témoins au cours de la

différenciation sexuelle ce qui en fait un bon marqueur de différenciation testiculaire, et est plus faiblement exprimé chez les animaux XXmal1 et peu ou pas chez les animaux XXmal2.

hnmt – (C5 ; TC95559) la protéine histamine N-méthyltransférase inactive l’histamine par N-méthylation, régulant ainsi négativement la réponse immunitaire déclenchée par l’histamine chez l’humain. Ce marqueur de masculinisation est exprimé dans tous les lots mais plus fortement dans les testicules témoins. Son expression au sein des familles XXmal est intermédiaire à celle des témoins mâles et femelles, avec une différence entre familles qui évolue avec le taux de masculinisation qui est plus élevé chez les XXmal1.

snai2 – (C5 ; TC113991) protéine Zinc finger SNAI2 (*Danio rerio*) ou SLUG (*Salmo salar*) contenant le double domaine ([pfam13465](#) :zf-H2C2), facteur de transcription impliqué dans le développement chez le poisson zèbre et le médaka [Liedtke *et al.*, 2011]. Très exprimé dans les testicules témoins, nous observons ici aussi une expression intermédiaire des XXmal avec une différence entre familles XXmal.

crsp2 – (C6 ; TC105270) « Cystein Rich Protein », est un facteur de transcription contenant deux domaines conservés de type LIM ([cd09480](#): LIM1_CRP2 et [cd09840](#): LIM2_CRP2) qui a un rôle dans la différenciation cellulaire. Ce gène est sexuellement dimorphique avant 84 jpf. Tout au long de la cinétique il est sous-exprimé chez les XXmal, surtout chez les XXmal1 au départ.

whsc2 – (C6 ; TC123207, « Wolf-Hirschhorn syndrom candidate 2 » est un membre des NELF (negative elongation factor), un complexe protéique participant à l’élongation de la transcription par la régulation de la RNA polymérase II. Le syndrome de Wolf-Hirschhorn est associé à une délétion du bras court du chromosome 4 chez les patients contenant WHSC2h [Wright *et al.*, 1999]. Cette maladie est associée à plusieurs symptômes dont des anomalies rénales et génitales ainsi qu’un retard de croissance intra utérin et post natal. Il est sous-exprimé chez les familles XXmal, particulièrement pour les XXmal1.

L’analyse qPCR a confirmé les profils d’expression de ces gènes, sauf pour le cluster C6 qui apparaît comme une dérégulation propre à la famille mal1 uniquement dans le microarray. En qPCR, nous retrouvons pour *crsp2* et *whsc2* une sous-expression de la famille mal1 plus importante mais pas uniquement. La famille mal2 présente également une sous-expression de ces gènes par rapport aux témoins.

Parmi les gènes dont l’annotation n’a pas pu être déterminée, le contig C5-TC122977 apparaît comme un bon marqueur de la masculinisation permettant une distinction cohérente entre les familles *mal1* et *mal2* (Fig. 17E). Ce gène contient le domaine conservé (COG0009:SUA5), SUA5 indiquant une fonction probable dans la traduction.

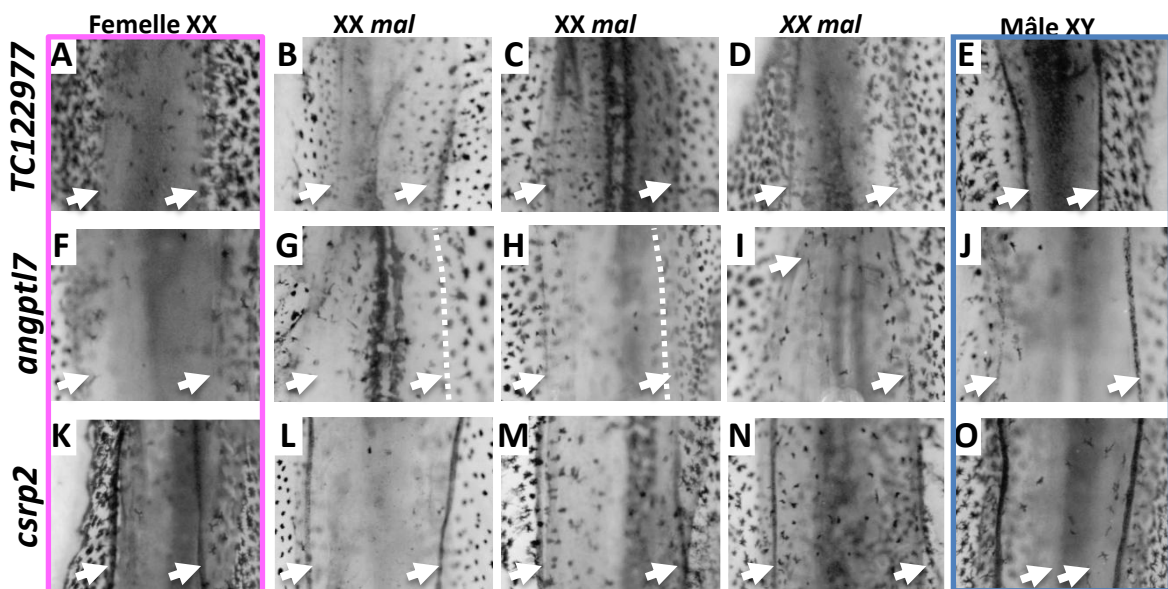


Fig. 18 : Hybridation *in toto* à 60jpf de gènes des clusters C5 (TC122977 et *angptl7*) et C6(*csrp2*) du microarray. Ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les gonades, avec des profils de masculinisation plus ou moins marqué pour les transcrits TC122977 et *angptl7*, avec au contraire une sous expression chez les animaux XXmal pour le dernier gène *csrp2*.

Localisation de l'expression par hybridation in toto (HIT)

Nous avons localisé l'expression de 3 de ces gènes, *angptl7*, *crsp2* et *TC122977* dans des gonades en cours de différenciation. L'analyse des résultats sur ces 3 gènes montre une expression nette dans la gonade (**Fig. 18**). Comme indiqué précédemment avec la quantification relative des transcrits, l'*angptl7* et *TC122977* ne sont pas détectés dans les ovaires témoins, et sont faiblement ou peu exprimés dans la gonade des animaux XXmal, mais au contraire très fortement exprimés chez les testicules témoins. Plus particulièrement le transcrit *TC122977* est détecté à des niveaux différents entre animaux XXmal, allant d'une absence totale de signal (**Fig. 18B**) comme chez les femelles témoins, à une expression plus faible (**Fig. 18C,D**). Mais nous n'avons pas observé de signal aussi fort que celui présent dans les testicules témoins.

Également en accord avec les données de microarray et qPCR à 60 jpf, le gène *crsp2* est lui nettement sous-exprimé chez tous les XXmal étudiés en comparaison des gonades témoins.

L'analyse de l'expression de ces gènes montre des profils testiculaires variables mais également des dérégulations propres à la lignée « *mal* ».

Discussion

- Gènes de la différenciation sexuelle et de la stéroïdogénèse

Aussi bien avec l'analyse qPCR que par les microarrays, les résultats confirment tout d'abord les données acquises ces dernières années par l'équipe [Baron *et al.*, 2005b; Vizziano *et al.*, 2007; Vizziano *et al.*, 2008; Yano *et al.*, 2011] puisque nous observons que durant cette période, les gènes *sdY*, *dmrt1*, *cyp17a1*, *hsd3b*, *cyp11b2*, *nr0b1 (Dax1)* et *nr5a1 (Sf-1)* sont clairement surexprimés chez les mâles XY, et qu'inversement les gènes *cyp19a1a* et *foxl2a* sont clairement surexprimés chez la femelle XX en qPCR. Bien que peu de gènes soient communs avec ceux des données antérieures de transcriptomiques [Baron and Guiguen, 2003; Baron *et al.*, 2008b] à cause de la méthode de sélection, ceux détectés dans ce microarray sont en accord avec la littérature. Parmi ceux-ci, on relève des gènes caractéristiques de la différenciation ovarienne comme *foxl2* et *cyp19a1a* [Baron *et al.*, 2005b] dans le cluster **C4** (surexpression chez les femelles témoins et les familles XXmal). Parmi les gènes caractéristiques de la différenciation testiculaire, *cyp11b2*, *angptl7* [Baron *et al.*, 2005b] et *tbx1a* [Yano *et al.*, 2011] sont dans le cluster **C5** (surexpression chez les mâles témoins et la famille XXmal) et *dmrt1*, *hsd3b*, *amh*, *gja1* et *sox9a2* [Baron *et al.*, 2005b] dans le cluster **C7** (surexpression exclusivement chez les mâles témoins).

En dehors des clusters contenant les marqueurs de la différenciation ovarienne ou testiculaire, seul *esr1* (estrogen receptor1) et *fasn* (fatty acid synthase) sont communs aux données précédentes. Précédemment, l'expression du gène *esr1* a été détecté majoritairement chez les mâles en fin de différenciation testiculaire [Baron *et al.*, 2005c; Vizziano *et al.*, 2008], en accord avec ces données, le transcrit est détecté ici dans le cluster **C1** (sous-expression des femelles témoins et animaux XXmal). Par contre *fasn*, qui est surexprimé tardivement dans les ovaires [Baron *et al.*, 2005b], est dans le cluster **C2** (sous-exprimé chez les animaux XXmal seulement). Si on considère ce gène comme un marqueur de la différenciation ovarienne tardive, la sous-expression de *fasn* observée chez les XXmal est peut-être à relier au retard de différenciation ovarienne que nous observons par les analyses histologiques (**article n°1**).

Pour la majorité des gènes analysés, les truites XX de la lignée « mal » ont un profil d'expression proche de celui des femelles témoins. Ainsi (1) l'expression du déterminant majeur du sexe mâle *sdY* n'est pas détectée chez les animaux XXmal et *sdY* est bien absent du génome des animaux XXmal (données non présentées). Ce résultat était attendu puisque *sdY* est un gène porté par le chromosome Y [Yano *et al.*, 2012a], mais cela confirme que le phénotype de masculinisation des animaux XXmal n'est pas dû à une translocation du locus *sdY* sur un autosome dans cette lignée de truite particulière. Cette hypothèse pouvait en effet être émise car le locus *sdY* s'est probablement

déjà transposé au cours de son évolution chez les Salmonidés [Yano *et al.*, 2012a; Woram *et al.*, 2003] (2) Les gènes marqueurs de la différenciation testiculaire comme *dmrt1*, *amh*, *tbx1* et *sox9a2* ainsi que ceux de la stéroïdogénèse, *cyp17a1*, *hsd3b* et *cyp11b2*, sont très faiblement exprimés chez les truitelles XXmal, avec un profil similaire aux femelles témoins XX. Cependant 2 gènes régulant à la fois la différenciation testiculaire et la stéroïdogénèse, *nr0b1* et *nr5a1*, sont eux surexprimés chez les XXmal en comparaison avec les témoins femelles XX. (3) Concernant les marqueurs de la différenciation ovarienne que nous avons analysés chez les XXmal, le gène *cyp19a1a* est sous-exprimé à un niveau intermédiaire à celui des mâles et des femelles témoins et *foxl2a* est, lui, surexprimé, et ce de façon plus marquée après la différenciation histologique de la gonade.

L'analyse individuelle par HIT a permis de distinguer des altérations de localisation de l'expression des transcrits spécialement pour les gènes de la différenciation ovarienne *cyp19a1a*, *fst* et *foxl2a*. La proportion d'animaux (9/12) présentant une perturbation de l'expression des gènes de la différenciation ovarienne à 43 jpf est surprenante, sachant le peu de masculinisation finalement observée *a posteriori* chez ces adultes (5-15%).

Plus particulièrement avec l'aromatase *cyp19a1a*, gène majeur dans la différenciation ovarienne des poissons, les hybridations *in toto* ont révélé des phénotypes très différents sur le peu d'animaux analysés. Considérant qu'une altération de sa fonction induit la masculinisation d'individus XX [Guiguen *et al.*, 2010], nous pouvons relier l'asymétrie d'expression à l'asymétrie de masculinisation observée chez les animaux XXmal adultes [Quillet *et al.*, 2004] et (**article n°1**). L'individu XXmal, présentant une expression faible et discontinue de *cyp19a1a* à 43 jpf, a un phénotype similaire à celui observé chez des truites témoins XX beaucoup plus jeunes (28-30 jpf, [Nicol *et al.*, 2011]). Cet animal pourrait donc présenter un retard d'expression de *cyp19a1a* et ce retard pourrait être corrélé aux retards de développement de la gonade que nous observons par la suite (**article n°1**). Cette expression, faible et continue, a probablement une répercussion sur la synthèse des œstrogènes gonadiques qui est probablement plus faible chez cet animal que chez des femelles contrôles à ce moment précis de sa différenciation gonadique. Cependant, tous les XXmal n'ont pas un profil d'expression aussi perturbé et nous avons également observé chez ces animaux des phénotypes relativement similaires à ceux observés chez des femelles témoins du même âge.

Au vu des dérégulations observées (quantité et topologie d'expression) précocement (43 jpf) et durant la différenciation sexuelle, le gène *cyp19a1a* semble un bon candidat pour expliquer la masculinisation des individus XXmal, bien que nous ne sachions pas ce qui est l'origine de la perturbation de son expression.

Chez la truite arc-en-ciel, bien que *Nr5a1* (*Sf1*) soit connu pour moduler l'expression de l'aromatase en se liant à son promoteur avec d'autres co-facteurs [Kanda *et al.*, 2006], l'expression de *nr5a1* augmente à la fois dans les ovaires et les testicules, sans distinction, avant la 1ère alimentation

[Vizziano *et al.*, 2007], puis cette expression diminue dans les ovaires et au contraire augmente dans les testicules [Baron *et al.*, 2005b]. De plus *Nr5a1* est aussi connu pour avoir d'autres effets que la régulation précoce de la stéroïdogénèse durant la différenciation gonadique [Ozisk *et al.*, 2003; Martinerie *et al.*, 2009]. Il n'est donc pas surprenant de ne pas observer de dérégulation de *nr5a1* à 43 jpf chez la truite avec les HIT. Mais la dérégulation de *nr5a1*, visible ultérieurement en qPCR, semble plutôt indiquer une implication tardive dans la masculinisation des lignées « *mal* » en conséquence d'une dérégulation précoce.

La masculinisation induite chez des truites arc-en-ciel femelles normales (XX) peut être obtenue soit par des traitements avec des androgènes [Jalabert *et al.*, 1975], soit par l'inhibition de la différenciation femelle avec un inhibiteur de l'aromatase [Guiguen *et al.*, 1999]. Si on se base sur les études moléculaires comparant les masculinisations de population XX induites par utilisation d'un inhibiteur de l'aromatase (ATD) ou par des androgènes 11-oxygénés [Vizziano *et al.*, 2008], la surexpression de quelques gènes comme *star* et *nr5a1* tend à confirmer une dérégulation de la différenciation ovarienne plutôt qu'une induction de la différenciation mâle dans nos populations XXmal. Une telle comparaison est délicate car les traitements avec des androgènes exogènes ne sont pas physiologiques puisqu'ils inhibent la stéroïdogénèse endogène chez la truite [Vizziano *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2008a; Baron *et al.*, 2005c; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2008]. Ces données ne permettent donc pas de trancher sur l'origine de la masculinisation entre une induction de la différenciation mâle par les androgènes et une dérégulation de la différenciation femelle.

Cependant, l'hypothèse d'une dérégulation de la voie femelle semble supportée par l'observation de dérégulations précoces de l'expression de l'aromatase, en plus de *fst* et *foxl2a*, soit avant que ne soit détectée l'expression de gènes de la stéroïdogénèse mâle comme *cyp11b2.1*, *cyp17a1* et *cyp11a1* (P450 SCC), c'est à dire environ 46 jpf chez des témoins mâles [Vizziano *et al.*, 2007]. Les dérégulations précoces (43 jpf) observées pour *cyp19a1a*, *fst* et *foxl2a* sont plus complexes que celles des marqueurs testiculaires précoces comme *tbx1b* et *amh* qui reflètent la masculinisation ou non des gonades. Ceci peut indiquer que la masculinisation a déjà débuté dans les gonades marquées par les ribosondes *tbx1b* et *amh*, alors qu'il est difficile de conclure pour l'ensemble des gonades avec un signal perturbé pour les gènes ovariens.

D'autre part, il est encore possible de changer le sexe des truites 1mois (~60 jpf) après le début de la différenciation sexuelle, comme c'est le cas avec les traitements aux androgènes ou avec l'ATD appliqués à partir de la 1ère alimentation [Jalabert *et al.*, 1975; Vizziano *et al.*, 2008] ce qui n'exclut pas une différenciation tardive de la gonade XXmal en ovaire ou testicule. L'action des androgènes dans la masculinisation finale des animaux XXmal est effective puisqu'ils présentent les caractères sexuels secondaires en conséquence.

La détermination tardive de la différenciation du sexe de la gonade pourrait expliquer le décalage entre des dérégulations de marqueurs de la différenciation sexuelle observées précocement et le faible nombre d'animaux masculinisés plus tard. Cette détermination tardive serait liée au retard de gonadogenèse que nous avons observé (**article n°1**) et pourrait aussi être liée à un retard de croissance plus général de ces animaux.

Enfin, l'analyse histologique a mis en évidence un retard de différenciation sexuelle des gonades, mais également un nombre faible de cellules germinales chez les animaux « *mal* ». La quantification relative de l'expression de *vasa* à 60 jpf et l'observation de coupes histologiques transversales suggèrent une diminution du nombre de cellules germinales (**article n°1**) en comparaison des femelles témoins à un âge où il n'y a pas encore de différence entre mâle et femelle quant au nombre de cellules germinales chez la truite [Nagler *et al.*, 2011]. Le faible nombre d'animaux XXmal analysés en HIT (n=4) ne permet pas de confirmer ou de réfuter cette hypothèse. Cependant, le fait que les cellules germinales des animaux XXmal expriment *vasa* avec la même intensité que celles des animaux témoins nous permet de penser que l'utilisation du transcrit *vasa*, pour estimer le nombre de cellules germinales, n'est pas biaisé par l'intensité d'expression, au sein d'une cellule germinale, qui aurait pu être différente entre les lignées XXmal et les témoins.

- Autres données du microarray

L'analyse du microarray a détecté peu de gènes de la différenciation sexuelle connus mais une importante quantité de dérégulations dans les gonades en comparaison aux femelles témoins (48% des gènes). Finalement peu de ces dérégulations peuvent être expliquées par la masculinisation de ces populations par comparaison avec les profils d'expression des témoins mâles. Ce cluster de « masculinisation » (cluster C5) représente seulement 8% du total des gènes différentiellement exprimés de notre analyse. Environ 40% des dérégulations observées ne sont donc pas corrélées avec des expressions géniques sexuellement dimorphiques. À cause des difficultés d'annotation, nous n'avons pas pu réaliser dans le cadre de ma thèse d'analyse de type Gene Ontology. Seul quelques gènes avec des profils caractéristiques des clusters ont été analysés par qPCR et HIT.

Ce nombre (256/663) de gènes dérégulés sans lien avec le sexe final des animaux semblent indiquer que le phénotype masculinisé n'est peut-être pas le seul phénotype associé à la mutation « *mal* ». Bien que nous n'observions pas de mortalités ou de malformations particulières chez les poissons de la lignée « *mal* », il est possible que cette mutation ait d'autres conséquences. Quel que soit le ou les gènes impliqués dans le syndrome « *mal* », leur action semble plus importante que ce que nous attendions. Ces 40% de dérégulations d'expression génique non liés au sexe dans des populations peu affectées tardivement par le phénotype masculinisé nous indiquent que les processus altérés par « *mal* » concernent une grande partie des poissons XXmal, si ce n'est

l'ensemble de la population, indépendamment du sexe final de l'individu. Nous ne pouvons pas exclure que la masculinisation ne soit qu'un phénotype secondaire de ces dérégulations précoces.

De façon très intéressante, nous distinguons dans le cluster C5 des gènes non liés au sexe présentant une différence entre les familles mal1 et mal2. Ces familles issues du même père mais de mère différentes se distinguent par des taux de masculinisation différents, plus important chez mal1. Parmi les gènes de ce cluster, *whsc2* (Wolf-Hirschhorn syndrom candidate 2) est intéressant car sa délétion est associée à une pathologie humaine complexe associant des anomalies rénales, génitales et surtout des retards de croissance intra-utérins et postnataux [Wright *et al.*, 1999]. Ce gène est fortement sous-exprimé chez les animaux XXmal, mais encore plus fortement dans la famille mal1, la plus masculinisée. Or, nous avons observé au cours des différentes expériences que le poids moyen des animaux XXmal est systématiquement plus faible que celui des animaux témoins (mâles et femelles confondus). De plus dans l'**article n°2**, nous avons observé que le poids moyen final est associé au degré de masculinisation de l'animal (intersexué ou mâle). Pour des mêmes conditions d'élevage, les animaux XXmal avec un phénotype masculinisé sont plus légers que ceux présentant un phénotype femelle, et par conséquent les familles les plus masculinisées sont également celles présentant le poids moyen le plus faible. Enfin nous observons un retard de gonadogenèse et gamétogénèse (**article n°1**). Ces données indiqueraient un retard de développement bien que nous n'observions pas de retard pour certaines de ces étapes importantes comme l'éclosion (30 jpf) ou la nage libre (60 jpf). Sans nécessairement relier la sous-expression de *whsc2* chez les XXmal à l'origine de la masculinisation, ce gène pourrait participer à créer un environnement moléculaire défavorable à la différenciation ovarienne.

- Limites de l'expérimentation et de l'interprétation des résultats

L'analyse des transcrits entre 53 et 113 jpf a été conçue pour explorer l'expression des gènes à différents moments de la différenciation sexuelle dans les gonades. Du fait de la faible quantité de matériel biologique à ces stades précoces, le plan expérimental a nécessité le mélange de gonades d'une centaine de poissons par lot et par date (environ 1600 poissons sont utilisés dans ces analyses) pour les expériences qPCR et microarray.

Du fait des temps de dissection nécessaires pour l'obtention de ces gonades embryonnaires de truite et des effectifs nécessaires pour obtenir les quantités d'ARN suffisantes pour conduire les analyses moléculaires, nous n'avons pas fait de réplicats biologiques pour chaque point de la cinétique. Cela induit deux défauts majeurs pour l'analyse statistique entre les lots et l'interprétation des résultats. D'une part avec le manque de réplicats biologiques, les analyses statistiques sont réalisées à partir de la moyenne des observations dans le temps par lot, et ceci malgré la variabilité d'expression des gènes au cours de la différenciation sexuelle. D'autre part, regrouper des centaines de poissons en un échantillon unique entraîne la perte d'information sur la variabilité inter-

individuelle. Cette perte devrait être importante pour ces populations dont le phénotype masculinisé est à pénétrance incomplète, l'expression des gènes devant varier selon le degré de masculinisation de l'individu. Le risque est alors de ne pas détecter une expression spécifique de la masculinisation du fait d'une dilution de ce signal au sein d'un pool hétérogène à un moment donné, et plus encore en moyennant des expressions très variables au cours du temps.

Par exemple, avec la quantification relative de l'expression de *nr5a1* (*sf-1*), dont l'expression moyenne au cours du temps est sexuellement dimorphique chez les témoins en faveur des mâles comme vu précédemment dans la littérature [Baron *et al.*, 2005b]. Ce gène tend à être surexprimé chez les animaux XXmal en comparaison des femelles XX témoins et sous-exprimé par rapport aux mâles témoins. Mais notre analyse ne permet pas de dire que cette expression est statistiquement différente de celles des mâles ou femelles témoins. Un autre exemple est celui du gène *star* qui est surexprimé chez les truites mâles XY durant la période d'étude selon les travaux précédents [Baron *et al.*, 2005b; Baron *et al.*, 2008a; Baron *et al.*, 2008b; Vizziano *et al.*, 2008]. Sa surexpression visible à partir de 98 jpf dans notre expérience chez les familles XXmal et les mâles XY témoins n'a pu être confirmée par notre analyse statistique de comparaison des moyennes. Les expressions de *star* et *nr5a1* ne sont pas statistiquement différentes entre les lots XXmal, bien que l'expression de *nr5a1* semble supérieure pour les mal1 (15% de masculinisation) au cours de la différenciation sexuelle.

Concernant le microarray, la moyenne d'expression, et donc la perte de l'information temporelle, biaise également les gènes sélectionnés par SAM car ce sont les moyennes d'expression entre lots qui sont comparées. La principale conséquence étant que peu de gènes connus pour leur implication forte dans le processus de différenciation sexuelle ont été détectés par rapport à des analyses précédentes de transcriptomique chez la truite [Baron *et al.*, 2005b; Baron *et al.*, 2008a]. Une nouvelle étude regroupant les données précoces versus tardives permettrait peut-être de palier en partie ces problèmes. Malgré ce biais expérimental, 663 gènes sont représentés dans l'analyse de comparaison de gonades dont 48% avec une expression dérégulée en comparaison des femelles témoins. Quel que soit la cause de la masculinisation, elle semble affecter des processus au-delà de la différenciation gonadique car moins de 3% des gènes sont en communs avec les transcriptomes précédents.

L'autre information majeure à prendre en compte pour l'interprétation des données de qPCR et microarray est la pénétrance incomplète du phénotype masculinisé. Au sein du même échantillon de gonades XXmal, à un temps donné, peuvent être présents des futures femelles XXmal et des futurs animaux masculinisés XXmal.

L'observation d'une dérégulation d'expression par rapport aux femelles témoins XX peut résulter soit d'un phénomène global concernant toute la population à ce moment précis, soit de la résultante

du mélange de femelles XXmal et d'individus XXmal masculinisés dont les expressions du gène étudié seraient différentes. L'avantage d'avoir analysé ici des populations « mal » faiblement masculinisées (5-15%) est que cela suggère une dérégulation de tous les animaux « mal » plutôt qu'une sous/surexpression due à la masculinisation de quelques individus isolés. Particulièrement pour les gènes *cyp19a1a*, *star*, *nr5a1 (sf-1)* et *nr0b1 (dax1)*, nous pouvons supposer que les animaux avec une expression perturbée sont plus nombreux que ceux qui seront masculinisés à 11 mois.

En contrepartie, nous ne pouvons pas exclure un effet de dilution des transcrits de gènes probablement surexprimés par les animaux XXmal masculinisés, peu représentés dans ces familles faiblement masculinisées. Ce cas particulier pourrait être celui de l'*amh*, ce marqueur de la différenciation testiculaire étant détecté dans le cluster C7 (surexpression dans les testicules témoins uniquement) du microarray, donc *a priori* non exprimé chez les XXmal. Le transcrit *amh* est pourtant détecté par hybridation *in toto* dans au moins un animal XXmal.

En complément de l'approche de quantification des transcrits, l'hybridation *in situ* nous a permis des analyses au niveau individuel. Ces analyses nous révèlent que les perturbations de l'expression génique affectent plus d'individus XXmal que ce que pourrait suggérer le taux de masculinisation à 11mois de ces populations. Cela est surtout bien visible pour les gènes de la différenciation ovarienne précoce (*cyp19a1a*, *foxl2a* et *fst*) qui apparaissent très perturbés par rapport aux témoins femelles. À l'inverse, pour les gènes signant la différenciation testiculaire, il reste difficile d'interpréter une absence de dérégulation (surexpression) comme un résultat définitif pour l'ensemble de la population ; le risque étant de ne pas avoir analysé d'animal masculinisé ou de ne pas avoir travaillé avec le bon marqueur de masculinisation. Par exemple le gène TC122977, est autant fortement exprimé par la famille mal1 que les mâles témoins en qPCR, mais nous ne distinguons pas aussi nettement le signal en HIT chez les animaux XXmal.

Conclusion sur les gènes candidats

La difficulté d'exploitation de notre modèle est de pouvoir interpréter les résultats issus de l'analyse d'un mélange d'animaux hétérogènes dû à la pénétrance incomplète du phénotype masculinisé, surtout lorsque nous observons une absence de dérégulation. Les familles *mal1* et *mal2* ont été sexées après les analyses moléculaires et se sont révélées assez peu masculinisées (voir **article n°1**).

Malgré cela, l'ensemble de nos données moléculaires indiquent que la masculinisation de ces populations génétiquement femelles présente les caractéristiques suivantes :

- (1) Elle intervient sans l'induction de *sdY* qui est spécifique du chromosome Y,
- (2) Elle commence tôt dans la différenciation sexuelle puisque nous détectons dès 43 jpf des dérégulations de marqueurs ovariens et l'expression de marqueurs testiculaires.
- (3) Le phénotype précoce associé à « *mal* » affecte probablement d'avantage d'animaux que ceux qui seront réellement masculinisés à l'âge adulte, et d'avantage de gènes que ceux impliqués dans la différenciation sexuelle.

Le rôle central de l'aromatase gonadique et son expression précoce dans la différenciation ovarienne en fait un des candidats majeurs pouvant expliquer la masculinisation d'une population génétiquement femelle en cas d'interférences [Guiguen *et al.*, 2010], mais ne suffit pas à expliquer l'ensemble des phénotypes associés à « *mal* », comme le faible nombre de cellules germinales (**article n°1**) ou un poids moyen plus faible chez les animaux masculinisés (**article n°2**). Sa dérégulation serait une conséquence de la perturbation induite par « *mal* » et est très probablement à l'origine des masculinisations observées.

La surprise de cette expérience a été de trouver autant de gènes présentant des profils d'expression dérégulés (surexpression ou sous-expression) durant la différenciation gonadique alors que ces populations sont finalement très peu masculinisées, donc à priori peu affectées par la mutation *mal*. Cette dérégulation apparaît très tranchée quantitativement et semble donc peu compatible avec une dérégulation affectant uniquement la petite proportion d'animaux qui vont ensuite se masculiniser. Cela plaide donc en faveur d'une pénétrance complète d'un phénotype précoce qui créerait une instabilité de la différenciation ovarienne pouvant ou non être suivie par une masculinisation effective.

Après la phase de différenciation histologique, les individus masculinisés des familles XX*mal* sont pour la plupart des intersexués présentant majoritairement des ovotestis avec une zone testiculaire dans la partie antérieure (**article n°1**). Mais étonnamment, aucune des gonades analysées en HIT à des stades précoces, dérégulées ou non, ne présentaient d'extinction ou de disparition du signal localisé sur une partie de la gonade pouvant être relié à la formation de ce type d'ovotestis. Chez les souris XY de la souche B6/Y^{POS}, qui présentent des cas de féminisation, la formation de l'ovotestis est

expliquée par une expression localisée de *sry* dans la future gonade, insuffisante aux extrémités de la gonade pour induire la différenciation testiculaire et permettant le développement d'une zone ovarienne en périphérie de la gonade [Koopman and Wilhelm, 2011; McClelland *et al.*, 2012]. Contrairement au modèle murin, la truite est très sensible aux stéroïdes sexuels après cette période de différenciation sexuelle précoce. La formation de l'ovotestis pourrait donc résulter d'une dérégulation locale de certaines enzymes de la stéroïdogénèse conduisant à des concentrations locales insuffisantes de certains stéroïdes comme par exemple les œstrogènes.

L'ensemble des données moléculaires suggèrent donc une dérégulation précoce de la différenciation gonadique qui se répercute au cours de la différenciation sexuelle aboutissant à une instabilité de la différenciation de la gonade dont le sexe sera déterminé en fonction d'un effet seuil.

IV. CONCLUSION SUR LE PHÉNOTYPE ASSOCIÉ

Au vu de ces résultats, la notion de pénétrance incomplète du phénotype associé au syndrome « *mal* » est à expliciter plus en détail. Il semble y avoir plusieurs phénotypes associés à « *mal* », la masculinisation tardive qui est la plus facilement détectable, n'affecte pas tous les individus. Il reste une forte proportion d'individus dont l'environnement moléculaire est dérégulé précocement dans la gonade pendant la différenciation sexuelle et qui ne seront pas masculinisés ultérieurement, si l'on se réfère au taux final d'individus masculinisés.

L'ensemble des résultats de biologie moléculaire et d'histologie peuvent difficilement s'expliquer uniquement par l'hypothèse génétique simple d'une mutation unique.

Premièrement, la pénétrance incomplète du phénotype masculinisé est également associée à divers degrés de masculinisation des gonades (ovotestis, testicules), ce qui suggère un effet dose efficace pour la formation ou non de l'ovaire. Si la différenciation des gonades XX*mal* dépend de l'effet dose efficace, il est possible que le phénotype associé à « *mal* » soit de pénétrance complète entraînant une instabilité de la différenciation ovarienne. Selon le fond génétique/combinaison d'allèles de l'individu, cette instabilité permettrait une production suffisante ou non d'œstrogènes par exemple pour le développement d'un ovaire. L'hypothèse d'un effet dose de stéroïdes est appuyé d'une part par l'importance des stéroïdes sexuels dans la différenciation sexuelle des poissons [Guiguen, 2000; Devlin and Nagahama, 2002] et d'autre part par le manque de preuve de l'organisation moléculaire expliquant la formation d'ovotestis lors des expériences d'hybridation *in toto*. La plupart des gonades observées chez les adultes sont des ovotestis, mais aucune des gonades avec une altération d'expression observée en HIT n'indique la formation d'un futur ovotestis.

Deuxièmement, en plus des masculinisations, le phénotype « *mal* » est associé à d'autre processus comme par exemple un retard de développement gonadique qui affecte tous les animaux XX*mal* qu'ils soient masculinisés ou non. Ce retard est également associé à un nombre de cellules germinales plus faibles chez les XX*mal* ainsi qu'à un nombre conséquent de gènes dérégulés non reliés à une différence de sexe.

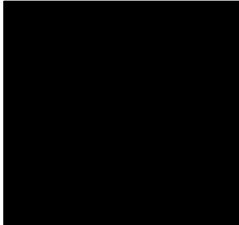
Troisièmement, il existe des différences entre familles XX*mal*, la plupart, expliquées par les différences de masculinisation.

Ce qui ressort de ces données est une dérégulation globale à des stades précoces entraînant un déséquilibre de la différenciation ovarienne permettant la masculinisation plus ou moins complète d'une partie des individus de la lignée « *mal* ».

D'autres facteurs semblent accentuer ce déséquilibre pendant la différenciation sexuelle, comme l'effet de la température d'élevage qui sera analysé dans le chapitre suivant.

Chapitre 2.

TEMPÉRATURE ET MASCULINISATION
DE LA LIGNÉE « MAL »



L'influence des facteurs externes sur la masculinisation des lignées « *mal* » de truites-arc-en-ciel avait été suggérée lors d'expériences préliminaires (Quillet, données non publiées) et où une diminution de la température avait entraîné une diminution du taux de masculinisation.

Nous avons donc voulu approfondir cet aspect particulier. Pour cela, dans un premier temps nous avons déterminé l'influence de la température à travers l'étude de 7 familles XXmal issues de 2 générations différentes de truites, résultats qui sont synthétisés dans l'article n°2 qui sera prochainement soumis pour publication. Dans un deuxième temps, une analyse moléculaire de l'effet de la température *in vivo* sur les transcrits et l'activité enzymatique aromatase a été réalisée et complétée par une analyse *in vitro* pour observer l'action directe de la température sur les gonades.

I. MASCULINISATION DES INDIVIDUS XXMAL À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES – ARTICLE N°2

Afin d'analyser l'influence de la température sur le phénotype de masculinisation des lignées « *mal* », 4 familles XXmal ont été soumises à différents régimes de température de l'eau d'élevage au cours de la différenciation sexuelle : une condition froide (8°C), une condition standard du laboratoire (12°C) et une condition chaude non létale (18°C). Ces 4 familles de truites XXmal, étaient issues de fécondations individuelles des ovocytes de 4 femelles différentes avec du sperme d'un même père. Elles ont été exposées dès 30 jpf séparément aux 3 températures retenues, puis ont été regroupées par condition thermique au moment de la 1^{er} alimentation (~55 jpf) pour diminuer les biais techniques d'un effet « bassin ». Après sexage des gonades par histologie, nous observons une augmentation globale du taux de masculinisation des 4 familles mélangées à 18°C en comparaison de la condition témoin (12°C). Suite au génotypage, il s'est avéré que seule une famille présentait une hausse significative du taux de masculinisation à 18°C, indiquant que cette réponse à la température est aussi dépendante d'effets parentaux (ici au moins d'un effet maternel). Par la suite, l'expérience a été renouvelée à 12°C et 18°C avec 3 nouvelles familles XXmal issues de pères et mères différentes, ces 3 familles ayant été élevées séparément. Ces nouvelles familles XXmal se sont avérées beaucoup plus masculinisées que les précédentes à 12°C et montrent toutes une augmentation significative de leurs taux de masculinisation à 18°C. Globalement ces données démontrent un effet marqué des températures élevées sur l'augmentation du taux de masculinisation des lignées « *mal* » mais aussi de l'importance du fond génétique dans la sensibilité de ce phénotype au facteur température.

En plus de ces résultats sur l'augmentation global des taux de masculinisation des populations *mal* soumises à des températures élevées, nos données montrent que les fortes températures agissent aussi sur l'intensité des phénotypes de masculinisation de chaque individu en diminuant les cas d'intersexualité présentant seulement une gonade droite masculinisée.

Enfin l'exploitation en parallèle des données de poids individuel enregistrées lors de ces expérimentations a mis en évidence que les animaux XXmal masculinisés présentent un poids moyen inférieur aux femelles XXmal alors qu'à ce stade aucune différence significative de poids entre mâles et femelles n'est décrite dans la littérature chez la truite arc-en-ciel. Ce phénotype « poids » pourrait donc être un phénotype particulier supplémentaire de cette lignée *mal* sous contrôle de la (ou les) même(s) mutation(s) et ne pas être en relation directe avec le phénotype « masculinisé ».

Article n°2 : High temperature increases the masculinization rate of an all-female (XX) rainbow trout population with a genetically governed masculinized phenotype

Karina Valdivia¹, Elodie Jouanno¹, Jean-Nicolas Volff², Delphine Galiana-Arnoux², René Guyomard³, Louise Helary¹, Brigitte Mourot¹, Alexis Fostier¹, Edwige Quillet³ and, Yann Guiguen¹

¹ INRA, UR1037 LPGP Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France.

² IGFL, UMR5242 CNRS/INRA/Université Claude Bernard Lyon I / ENS, Lyon Cedex 07, France.

³ INRA, UMR1313 GABI Génétique Animale et Biologie Intégrative, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Correspondence to: Yann Guiguen, INRA LPGP, Bâtiment 16A, Campus de Beaulieu 35042, Rennes Cedex, France. Email: yann.guiguen@rennes.inra.fr

Key words: sex differentiation, sex inversion, mutation, temperature, body weight, salmonid, rainbow trout, fish

Grant Sponsor: French National Research Agency (ANR) project ANR Genanimal Sexytrout.

Abstract

Salmonids are often considered to have a robust genetic sex determination system with a simple male heterogamety (XX/XY). However, despite this strict genetic sex determinism system, spontaneous masculinization of XX females has been found in a rainbow trout population of gynogenetic doubled haploid individuals (the *mal*-carrying population). As temperature effect on sex determination has been reported in some salmonid species, the present study was carried out to investigate in detail the potential implication of temperature on masculinization in the XX *mal*-carrying population. Seven families issued from XX *mal*-carrying parents were exposed starting from hatching to low (8 °C), medium (12°C) and high (18°C) rearing water temperature and the resulting sex-ratios were established by histological analysis. Our results demonstrate that masculinization can be strongly increased by high temperature treatment (18°C) depending on the genetic background of these XX *mal*-carrying individuals. Whatever the temperature treatment, we also found a clear sexual dimorphism of the body weight, with XX females being significantly heavier than the XX masculinized animals. This masculinization in XX *mal*-carrying rainbow trout is probably triggered by an interaction between the temperature treatment and a complex genetic background potentially involving some part of the genetic sex determination regulatory cascade along with some minor sex-influencing loci. These results show that despite of its rather strict GSD system, rainbow trout sex determination can be modulated by temperature as described in many other fish species.

Introduction

The primary causal signal which determines sex in vertebrates is variable and two main types of primary sex determination have been described in gonochoric species: genotypic sex determination (GSD), where the sex of the embryo is strictly determined by genotypic information inherited from its parents, as in mammals and birds and environmental sex determination (ESD), where the sex of the embryo is physiologically determined by the environment, as in some reptiles and fish species (Angelopoulou, Lavranos and Manolakou, 2012). Intermediate sex determination systems have also been described (Baroiller, D'Cotta and Saillant, 2009), where a number of genetic factors, sometimes influenced by the environment, contribute to the *sex-ratio*, i.e. species with minor genetic factors overriding sex chromosomes or even without sex chromosomes like in sea bass (Vandeputte *et al.*, 2007). The best characterized ESD to date is temperature-dependent sex determination (TSD) that has been well described in some reptiles, amphibians (Sarre, Ezaz and Georges, 2011) and fish species (Ospina-Alvarez & Piferrer, 2008).

In teleost fishes, a large range of various types of sexuality has been described, from hermaphroditism to gonochorism (Yamamoto, 1969), with a high diversity of sex determination systems (Mank & Avise, 2009) including various degrees between full GSD and full ESD (Penman & Piferrer, 2008; Price, 1984). A detailed review on the influence of temperature (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008) on sex differentiation in

teleosts distinguished a full and physiological TSD system from thermal effects on GSD. Remarkably, in both case, high temperature treatments consistently induced male-biased *sex-ratios* (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008) with only a few notable exceptions including sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in which a female-biased *sex-ratio* was observed at high temperature (Craig, Foote and Wood, 1996). However these results were not confirmed by a follow-up study on other strains of the same species (Azuma *et al.*, 2004).

Salmonids are often reported with a simple and robust XX/XY GSD system (Davidson *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2012), but thermal effects on GSD have also been observed in Grayling (Wedekind *et al.*, 2012) and at least one saltwater *Oncorhynchus* species, i.e., the sockeye salmon as mentioned above (Azuma *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 1996) and the rainbow trout, *O. mykiss* (Magerhans, Muller-Belecke and Hoerstgen-Schwark, 2009) although, early studies did not detect any effect of high temperatures on sex differentiation of this latter species either with short-term (van den Hurk & Lambert, 1982) or long-term treatments (Baroiller, Guiguen and Fostier, 1999). However, a more recent and thorough study in rainbow trout demonstrated that high temperatures (18°C) can modulate *sex-ratio* with slight but significant deviations from a balanced *sex-ratio* (Magerhans *et al.*, 2009). Interestingly, these slight *sex-ratio* deviations were detected either in favor of males or of females according to the genetic background of the tested population. These results have been

further confirmed and the masculinization in response to temperature was shown to be heritable (Magerhans & Horstgen-Schwark, 2010).

Despite a strict male heterogamety, spontaneous masculinization of XX rainbow trout females has been found in a population of gynogenetic doubled haploid individuals (Quillet, Aubard and Queau, 2002). The analysis of the male phenotype transmission in a three generation pedigree supported the hypothesis that a recessive mutation in one putative minor sex determination factor (named *mal*), together with other sex modifier loci, was responsible for the masculinization of XX individuals (Quillet *et al.*, 2002; Quillet, Labbe and Queau, 2004). Further preliminary observations suggested that the expression of maleness was influenced by environmental factors, low temperature during the first stages reducing the frequency of masculinized individuals (Quillet *et al.*, unpublished results).

The aim of the present study was then to investigate more in detail the potential role of temperature on masculinization in *mal*-carrying rainbow trout individuals. Seven families issued from *mal*-carrying parents were exposed to a low (8 °C) and/or high (18°C) rearing water temperature in comparison to a reference temperature of 12°C during the sex differentiation period. The resulting sex-ratios were established by histological analysis and compared. Our results confirmed that the masculinization rate depends on the genetic background and demonstrated that

masculinization of XX *mal*-carrying individuals is strongly increased by a high temperature treatment (18°C). These results show that despite of its rather strict GSD system, rainbow trout sex determination can be influenced by thermal effects in combination with special genetic backgrounds as described in many other fish species.

Materials and methods

Animals

Experiments involving animals complied with French and European regulations regarding the use and care of laboratory animals. The rainbow trout population used in this study was derived from the winter-spawning INRA-SY (Synthetic) strain, maintained at the INRA experimental fish facilities (Gournay-sur-Aronde & PEIMA, France), as previously described (Quillet *et al.*, 2002). The experimental population of *mal*-carrying animals was maintained from the initial pedigree (Quillet *et al.*, 2002) by mating spontaneous XX *mal*-carrying males and females. Two sets of experimental progeny were analyzed in the present study.

In Experiment A, four half-sib families of *mal*-carrying XX rainbow trout (*mal*1 to *mal*4) were produced in November 2008 by mating four females with one male from the XX *mal*-carrying experimental line.

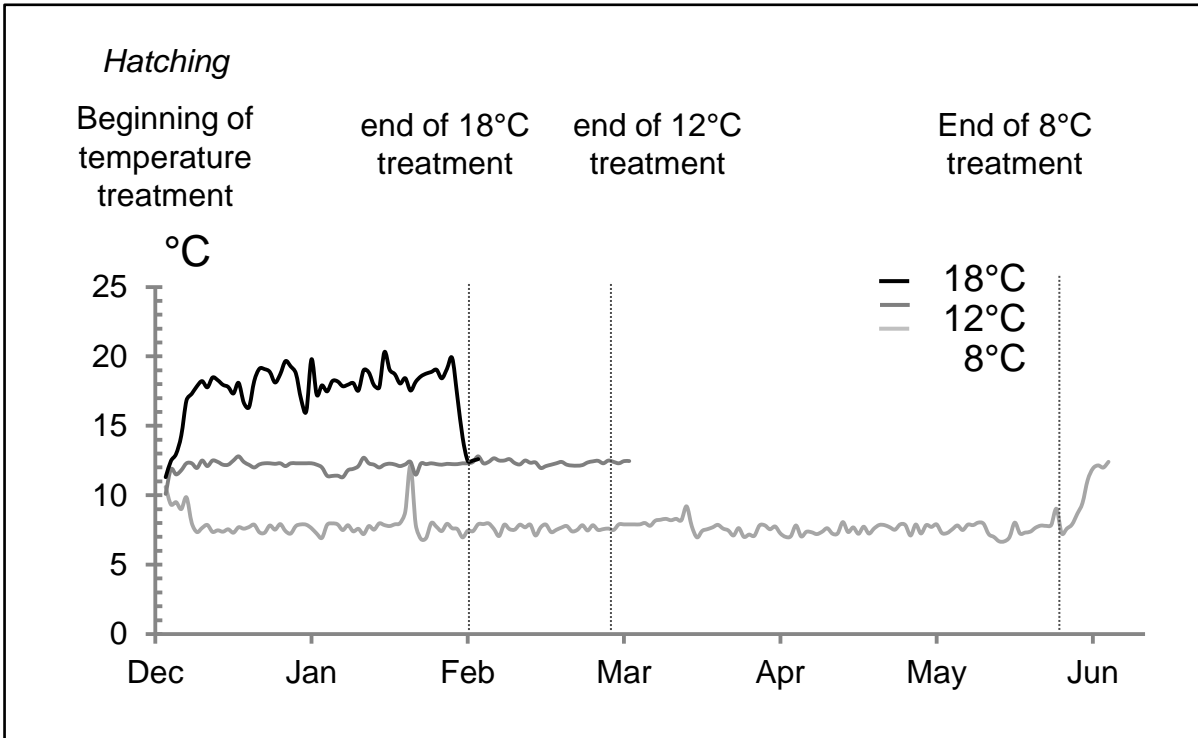


Fig. 1 : Experimental conditions for the common garden experiment A: Eggs from four *mal*-carrying progenies were incubated at 10°C until hatching, and then dispatched by temperature treatment at: 8, 12 or 18°C. At first feeding, the total number of fish per progeny was reduced to 110 and all four progeny were mixed for each temperature condition. At the end of temperature treatment, fish were transferred and maintained at 12°C (see materials and methods for more details).

In Experiment B, three additional families of *mal*-carrying XX rainbow trout, (mal5 to mal7) were produced in November 2010 by mating separately three females with three males from the XX *mal*-carrying experimental line. An all-female (XX) group was also produced as a control using standard XX neomales as previously described (Chevassus, Chourrout and Jalabert, 1979; Jalabert, Billard and Chevassus, 1975).

Temperature treatment

In the common garden Experiment A (mal1 to mal4), batches of 600 eggs per progeny were incubated at 10°C ± 1°C until hatching (approximately 32 days) and then transferred to indoor experimental facilities at the Fish Physiology and Genomics Laboratory (INRA LPGP, Rennes). Every batch was split into three groups of 200 hatched embryos that were maintained separately in incubators at three different temperatures, *i.e.* 8, 12 and 18°C. At 560°C days post-fertilization, *i.e.* at the free swimming and first feeding stage, fish were transferred to tanks and 110 fish from each progeny were pooled in 4 separate tanks resulting in a 4 progenies common garden experiment at each temperature. The duration of thermal treatments was adjusted according to the temperature, *i.e.* 6 months at 8°C, 3 months at 12°C and 2 months at 18°C (Fig. 1). At the end of each thermal treatment, fish were maintained at 12°C until they attained a sufficient size for sexing (between 9 and 12 months depending on the initial temperature regime) (Gabillard *et al.*, 2003; Kwain, 1975). Fish were sacrificed using a

lethal dosage of phenoxyethanol (1‰ in water). For each individual, both gonads were fixed in Bouin-Holland fluid for histology analysis and a fin clip was stored in 90% ethanol for subsequent genotyping and parental assignment. Breeders were fin clipped as well.

In Experiment B, control females and XX *mal*-carrying progeny were kept in separate tanks and exposed to 2 temperature treatments, 12°C and 18°C, for 2 months starting from hatching and then maintained at 12°C until they grew enough for sexing. Between fifty to sixty fish per experimental group were sacrificed at 7 month old and their gonads were sampled for histological analysis.

Histological analysis

For histological analysis gonads after fixation for 48 hr in Bouin-Holland fluid, were dehydrated in aqueous 70% and 95% ethanol, ethanol/butanol (5:95) and butanol. Tissues were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with Regaud's hematoxylin (Gabe, 1968).

Sex-ratio assessment

Fish gonadal phenotypes were analyzed and classified as described in Valdivia *et al.* (in press). Briefly, fish were scored as “normal female” when no sign of masculinization could be detected by histology on any gonad and when no delay in gametogenesis could be observed in comparison with control females (XX all-female population). Females with delayed ovarian development were scored as “delayed oogenesis females.” All other phenotypes exhibiting

masculinization features were classified as either “normal males” or “intersex animals.” The animals that received intersex scores had at least one gonad with some signs of masculinization. The masculinization rates (percentage of “intersex animals” plus “normal males”) were statistically analyzed using either the χ^2 test or the Fisher's exact test. The *sex-ratio* in experiment A was established only for fish correctly assigned to a progeny with both gonads.

Genotyping and parental assignation

For the common garden experiment (experiment A), the pedigree of every fish was rebuilt by genotyping 13 microsatellites. Genotyping was carried out at Labogena (<http://www.labogena.fr/>, Jouy-en-Josas, France). Parentage assignment was then assessed using the VITASSIGN software (Vandeputte, Mauger and Dupont-Nivet, 2006). An accurate mortality rate by progeny cannot be estimated due to 3% of genotyping failure.

Weight analysis

In experiment A the total body weight was recorded for each animal at the final sampling. Because fishes were not sampled at the same age between temperature treatment batches, the effect of the sex on weight was tested only within groups having received the same temperature treatment.

Statistical analyses

Using 12°C temperature treatment as control condition, χ^2 test and Fisher's exact test were used to compare the masculinization rate, the

gonadal phenotype and the mortality rate between temperature treatments. For the weight analysis, comparisons of the effect of sex on mean body weight were performed using a Student t-test or a Wilcoxon test and followed by a two way ANOVA to compare weight among the different progeny and the sex. The analysis on mean body weight and sex phenotypes within each progeny was not performed due to the too low number of animals in the masculinized categories.

Results

Overall effect of temperature on the masculinization rate in mal-carrying animals

In experiment A, with a final number of fish ranging from 357 to 386 per group, the mortality reached 10.6% in average and was slightly higher at 8°C than at 12°C and 18°C (Table 1). Subsequent analyses were only performed with animals that were successfully assigned to a family and for which both gonads have been histologically analyzed. This represented 94.4%, 95.8% and 94.0% of the initial number of sampled fish for the 8°C, 12°C and 18°C treatments, respectively.

In experiment A, histological analysis of the gonads of the four XX *mal*-carrying progeny showed that 75.1% of fish were normal females at the control temperature of 12°C (Table 1). This percentage was not significantly changed at a lower temperature (8°C) but decreased at a higher temperature (18°C: 63.2%). The percentage of females with delayed oogenesis was approximately the same (10.4% on average)

Table 1 : Gonadal phenotypes and survival rates in the three different temperature treatments (common garden experiment A).

| Experiment A data | 8°C | 12°C | 18°C |
|--|-------------|-------------|----------------|
| Total of fish at the end of the experiment | 378 | 403 | 399 |
| Mortality rate (%) | 14.1* | 8.4 | 9.3 |
| Genotyping failure (%) | 3.9 | 2.9 | 2.0 |
| Total of fish analyzed | 357 | 386 | 375 |
| Gonadal phenotype | 8°C | 12°C | 18°C |
| Previtellogenic females (%) | 73.9 | 75.1 | 63.2** |
| Females with delayed oogenesis (%) | 11.7 | 10.6 | 9.1 |
| Intersex (%) | 12.6 | 13.5 | 21.1* |
| Males (%) | 1.7 | 0.8 | 6.7*** |
| Total masculinized fish (%) | 14.3 | 14.3 | 27.7*** |

Comparison of gonadal phenotype by temperature: χ^2 test (Df=1) p value; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

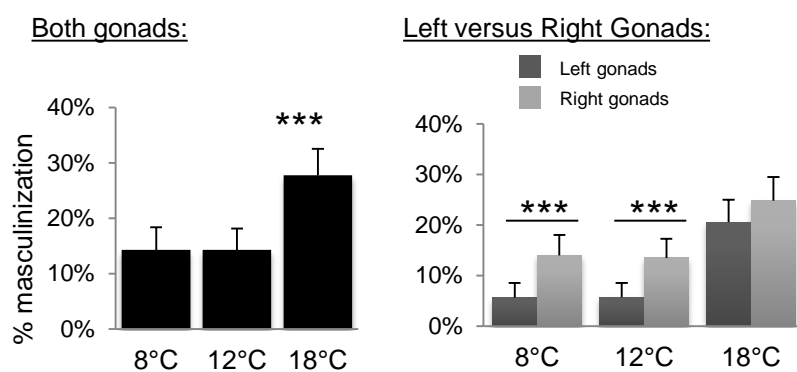


Fig. 2 : Effect of different rearing temperatures on the masculinization rate of a pool of 4 progenies issued of *mal*-carrying XX parents in experiment A. (8°C, n=357; 12°C, n=386 ;18°C, n=375) Left panel: A fish was considered masculinized when at least one of his gonad is masculinized. Comparison to control temperature 12°C (%+CI; χ^2 ; *** $p < 0.001$); Right panel: Masculinization rates of left (dark bloc) and right (grey bloc) gonads according to the temperature treatment during sex differentiation (%+CI; χ^2 ; *** $p < 0.001$).

whatever the temperature treatment. The percentage of total masculinization reached 14.3% at 12°C and was not changed at a lower temperature of 8°C, but a twofold significant increase was observed at a higher temperature of 18°C (27.7%; p value= 7.28e-06) (Fig. 2, left panel). Within families, only *mal4* showed a statistically significant increase of masculinization rate at 18°C, however the tendencies for all the other families are coherent with such an increase. The most represented phenotype in masculinized individuals was an intersex type rather than full males whatever the temperature treatment. In addition we found that the right gonad was consistently more often masculinized than the left one. However, this difference was significant only at 8°C and 12°C but no longer significant at 18°C (Fig. 2, right panel).

In view of the results obtained in experiment A, a second experiment (B) was designed to confirm this effect of a high rearing temperature (18°C) compared to the control temperature (12°C) on the rate of masculinization of three additional *mal*-carrying families (Table 2). In this experiment the 3 independent families were reared in separate tanks. At 12°C, an already high rate of masculinization was observed in these families (73.6% as a mean), but this rate was still significantly increased in each family reared at 18°C (97.1% as a mean). In contrast, the all-female XX control population did not show any masculinization neither at 12°C nor at 18°C.

Family effect on the masculinization rate in *mal*-carrying animals

In the common garden experiment A, the parental assignation failed for 2.9% of all fish. A significant inter-families variation of the masculinization rate has been observed at 12°C (Fig. 3, left panel). This is not the case for the 3 other families of experiment B (Table 2 and supplementary Table 1), but their masculinization rate was higher (73.3% as a mean) compared to the 4 families of experiment A (14.3% as a mean). Furthermore, in experiment A only the *mal4* family, which had the highest masculinization rate at 12°C (36.7%), showed a significant and high increase of its masculinization rate (71.1%) when reared at 18°C (Fig. 3, left panel). In experiment B, the three tested families showed a significant and high increase of their masculinization rate at 18°C (Table 2).

Another difference was observed between families in relation with the left-right gonad asymmetry which has been analyzed in details in experiment A. Only *mal3* and *mal4* families showed at 12°C a significant and lower masculinization of the left gonad compared to the right gonad (Fig. 3 right panel). Interestingly, these 2 families had a higher rate of masculinization at 12°C compared to the *mal1* and *mal2* families.

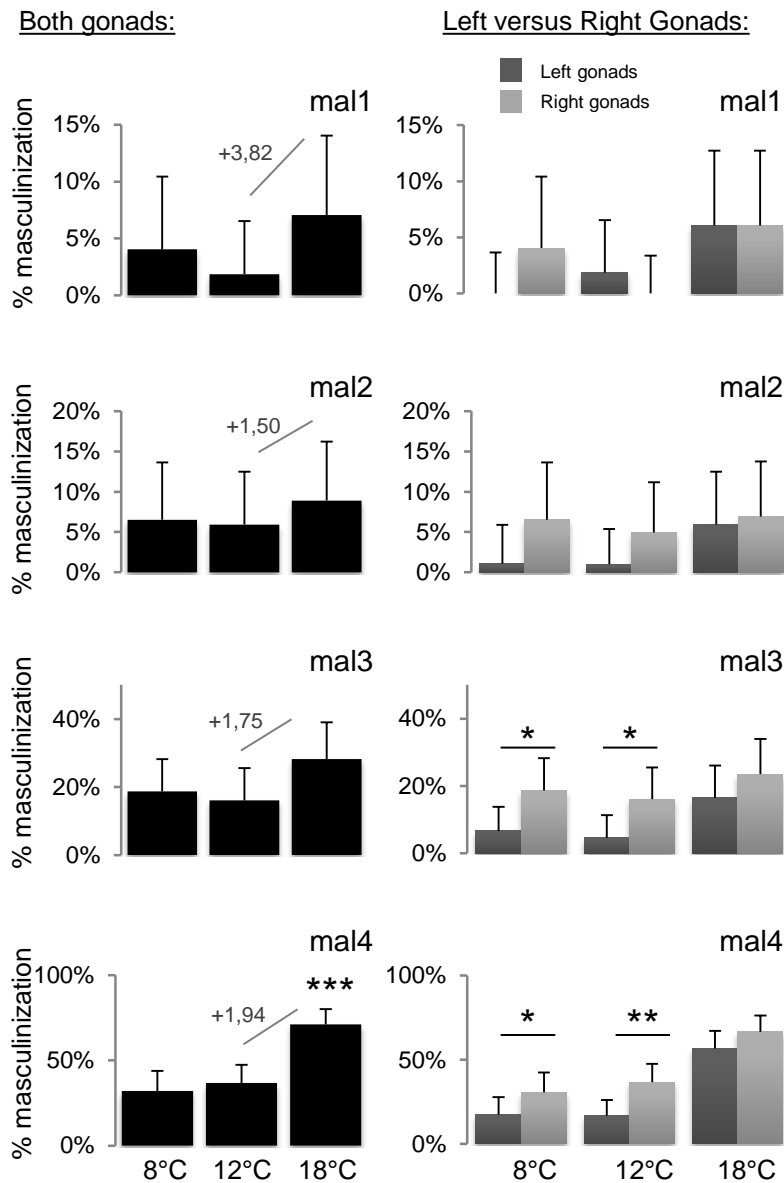


Fig. 3 : Rate of masculinization of the 4 *mal*-carrying progenies exposed to different temperatures in experiment A. Left panel: Percentage of fish masculinized for each progeny according to the rearing temperature. Right panel: Percentages of masculinization for the left and right gonad. (%+CI; χ^2 ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (For 8, 12 and 18°C respectively: n mal1= 99, 108 and 99; n mal2= 92, 101 and 101; n mal3= 91, 87 and 85; n mal4= 75, 90 and 90).

Body weight and masculinization

As mentioned above, because of the growth heterogeneity between the experimental groups, samplings for histological analysis of the gonads were done at different time points. However, within each temperature treatment we compared the total body weight of all animals in relation to gonadal phenotype. This analysis demonstrated a clear sexual dimorphism in the body weight between the masculinized animals that have a significantly lower body weight than the XX *mal*-carrying females in all 3 temperature treatment (Table 3). Further analysis revealed that the mean body weight is dependent on family and sex effects whatever temperature, but only at 8°C the sex effect depends of the families. In addition at 12°C, the body weight of the animals decreased according to their masculinization status (data not shown).

Discussion

Although the acknowledged system of sex determination in rainbow trout is a genetic sex determination (GSD) system with a male heterogamety (XX-XY) (Davidson *et al.*, 2009), an unexpected masculinization was observed in an all-female rainbow trout population obtained by mitotic gynogenesis (Quillet *et al.*, 2002). Based on preliminary results suggesting that the masculinization rate of these XX *mal*-carrying populations was affected by water temperature (Quillet *et al.*, unpublished results) and as temperature is known as a major environmental factor able to modulate sex differentiation (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008), we designed

precise controlled experiments to explore these possible effects of temperature on the occurrence of the masculinized phenotypes in *mal*-carrying XX families. We confirmed in two separate experiments that the rate of masculinization is increased by raising the rearing temperature from 12°C, taken as a reference, to 18°C. Mortality rates were low and sex differences in mortality cannot explain such a result. For instance, in experiment A, we would obtain masculinization rates of either 26.4, 21.5 and 34.5% at 8°C, 12°C and 18°C respectively if we hypothesized that all dead fish were males, or 12.3, 13.1 and 25.2% at 8°C, 12°C and 18°C respectively if we hypothesized that all dead fish were females. Thus, we can conclude that a decrease of temperature has no significant effect on masculinization while an increase of temperature promotes an increase of the masculinization rate of *mal*-carrying rainbow trout. However, as rainbow trout can withstand lower temperature than 8°C, the effect of even lower temperatures should be explored in the future.

In agreement with previous studies (Quillet *et al.*, 2002; Valdivia *et al.*, 2012) we confirmed that the masculinization rates at the reference temperature of 12°C were variable among half-sib (Experiment A) and independent (Experiment B) progeny depending on maternal origin or breeding pair, respectively. This was clearly demonstrated in our common garden experiment, without possible tank effect, in which different progeny exhibited different masculinization rates independently from the

Table 2 : Masculinization rate experiment B.

| Experiment B | 12°C | | 18°C | |
|---|------|------|------|---------|
| | n | % | n | % |
| All-female control | 100 | 0 | 100 | 0 |
| mal5 | 63 | 71.4 | 53 | 98.1*** |
| mal6 | 49 | 81.6 | 66 | 96.9* |
| mal7 | 53 | 67.9 | 55 | 96.3*** |
| Masculinization rate (mal5 to mal7 mix) | 165 | 76.6 | 174 | 97.1*** |

Comparison males versus females in same progeny: χ^2 test (Df=1) p value; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Table 3 : Mean weight (in g) of females versus masculinized fish in the three different temperature treatments (common garden experiment A)

| Experiment A | 8°C | | | 12°C | | | 18°C | | |
|-------------------|-----|----------|---------------------|------|----------|---------------------|------|---------|---------------------|
| | n | mean | sd | n | mean | sd | n | mean | sd |
| Phenotypic sex | | | | | | | | | |
| Females | 306 | 148.4 | 42.2 | 331 | 226.2 | 53.6 | 271 | 74.3 | 17.7 |
| Masculinized fish | 51 | 112.0*** | 44.8 | 55 | 183.3*** | 56.9 | 104 | 62.4*** | 19 |
| Anova two way | Df | F | Pr(>F) | Df | F | Pr(>F) | Df | F | Pr(>F) |
| Family effect | 1 | 39.5 | 9.5e ⁻¹⁰ | 1 | 34.1 | 1.2e ⁻⁰⁸ | 1 | 37.0 | 2.9e ⁻⁰⁹ |
| Sex effect | 3 | 26.0 | 3.1e ⁻¹⁵ | 3 | 20.4 | 2.9e ⁻¹² | 3 | 18.9 | 2.0e ⁻¹¹ |
| Sex* Family | 3 | 5.3 | 0.0015 | 3 | 1.4 | 0.24 | 3 | 0.7 | 0.57 |

Comparison of males versus females in the same temperature condition: T test p value; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

temperature effects. If we take into consideration the simple one-locus hypothesis suggesting that these XX mal-carrying animals have a recessive mutation inducing a limited penetrance masculinization phenotype, the only difference between these 4 progeny is then the dam that could be either heterozygote or homozygote at the mal locus with the only sire used being homozygote. This rather simple explanation would be much more complicated considering the possible involvement of several loci in the masculinization process of mal-carrying XX families. However in the absence of a precise knowledge on this genetic determinism, the only conclusion that we can draw right now is that the masculinization rates of these mal-carrying progeny is genetically determined with a clear maternal effect. However we don't know if this is strictly linked with the mal locus including eventually other potential modifier loci, or if this could be also due to the genetic background of these animals independently from this (or these) mal 'mutation(s)'.

The same maternal effect was also observed in response to temperature as among the different progeny analyzed in our common garden experiment, only one of them presented a significant increase in its masculinization rate at the highest temperature (18°C). However, a similar tendency was also observed in the three other families that had a higher masculinization rate at high temperature and no difference between the 8 and 12°C treatments. Interestingly this significant effect of temperature on masculinization was found in

the progeny with the highest rate of masculinization at 12°C. This was confirmed in experiment B in which all progeny had a high masculinization rate at 12°C and also exhibited a significant increase of their masculinization rate at 18°C. In salmonids, only three cases of temperature effect on *sex-ratio* have been reported (Azuma *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 1996; Magerhans and Horstgen-Schwark, 2010; Magerhans *et al.*, 2009; Wedekind *et al.*, 2012). In rainbow trout a high temperature (18°C) treatment similar to the one applied here was shown to modulate *sex-ratios* in both male and female direction depending on the population origin and the breeding pair (Magerhans *et al.*, 2009). The existence of a heritable component of *sex-ratio* at high temperature was further demonstrated through one generation of divergent selection producing lines with up- and down-biased *sex-ratios* (Magerhans and Horstgen-Schwark, 2010). Indeed in our experiments, temperature effects have been explored only for masculinization because mal-carrying animals are all genetic XX females, but similar genetic differences were observed. However, in contrast with these previous studies (Magerhans and Horstgen-Schwark, 2010; Magerhans *et al.*, 2009), we did not observed any masculinization induced by a high temperature treatment in a control population. Genetic influences on fish TSD have been already described in Atlantic silverside (Conover & Kynard, 1981) and in Nile tilapia (Baroiller *et al.*, 2009) that has been considered as a prime example of thermal effects on GSD (Ospina-

Alvarez and Piferrer, 2008). Similar genetic influences are also probably important in rainbow trout both as direct modulators of thermal effects on GSD (Magerhans and Horstgen-Schwark, 2010; Magerhans *et al.*, 2009) or in our case as modulators of thermal effects on GSD combined with a specific mal genetic background. This genetic complexity has also been recently suggested in Nile tilapia (Luhmann *et al.*, 2012), in which the masculinizing effects of temperature may depend on the combination of different alleles from minor and major sex determining factors.

In addition to the various types of masculinization phenotypes and perturbation of gonadal development that were already described in these XX mal-carrying populations (Quillet *et al.*, 2002; Valdivia *et al.*, 2012), we also confirmed the left-right (LR) asymmetry with the right gonads being significantly more frequently masculinized as previously described (Quillet *et al.*, 2004) than the left gonads at 8 and 12°C. In vertebrates, despite a bilateral symmetrical appearance of the body plan, many internal organs are organized in an asymmetrical LR manner. Gonads are generally regarded as symmetrical paired organs with the important exception of avian species, in which the gonadal LR asymmetry is a well-known phenomenon. This bird gonadal asymmetry is expressed very early since the colonization of the gonadal anlage by primordial germ cells (PGCs) is already asymmetrical with a higher number of PGCs found in the left gonad (Van Limborgh, 1968). Apart from bird, a few reports also describe a LR

gonadal asymmetry in some mammals (Hunter, 1996; Mittwoch, 2001), amphibians and reptiles (reviewed in (Yu, 1998). In teleosts, a LR gonadal asymmetry was observed during gonadal differentiation in Argentine silverside, *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann & Ito, 2005) and subsequently during gonadal development in brown trout, *Salmo trutta* (Ashby, 1957). In some salmonid species, the left gonad also tends to be more developed and less sensitive to steroid treatments (Chevassus & Krieg, 1992; Guillevic & Guiguen, 2008). Rainbow trout gonads might then have an underlying asymmetrical differentiation program that is not normally fully expressed but that could be revealed in imbalanced physiological conditions. The higher masculinization rate of the right gonads in the mal-carrying animals could be in relation with such an asymmetrical differentiation program that may favor the masculinization of the right gonad under a genetically disturbed environment. However, this LR asymmetry is no longer observed in the high temperature treatment that also promotes the highest masculinization rate. This demonstrates that temperature not only increases the overall rate of masculinization at a population level but also amplifies each individual masculinization phenotype pushing slight masculinization phenotypes, including LR intersex, toward a more complete masculinized phenotype.

Thermal effects on GSD in salmonids have been suggested to be the direct consequence of the temperature itself and its magnitude when

applied at a critical period of embryonic development (Azuma *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 1996) instead of the existence of a defined pivotal temperature like what is described in many reptiles. Such a progressive effect of temperature cannot be totally excluded from our experiments but this effect would be then only detectable above a certain threshold temperature as no significant masculinization rates were detected between 8 and 12°C. Masculinization by high temperatures in fish has been hypothesized to be the result of a physiological stress triggering a cortisol elevation as proposed in TSD fish species like in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Hattori *et al.*, 2009) or in some GSD species with thermal effects like in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Yamaguchi *et al.*, 2010) or medaka, *Oryzias latipes* (Hayashi *et al.*, 2010). In addition to these temperature induced effects, masculinization by direct cortisol treatments was also achieved in rainbow trout (Van den Hurk & van Oordt, 1985). These cortisol treatments were able to induce either a delayed meiotic initiation in Japanese flounder (Yamaguchi & Kitano, 2012) or to inhibit proliferation of germ cells in medaka (Hayashi *et al.*, 2010). Interestingly these two gonadal phenotypes were also detected in gonads of XX mal-carrying rainbow trout (Valdivia *et al.*, in press). However, in rainbow trout, an early stress induced by handling, cold chock (Barry *et al.*, 1995) or hypoxia (Fuzzen *et al.*, 2011) did not increase whole body cortisol levels until 6 weeks after hatching, i.e., well after the beginning of the molecular differentiation

period (shortly after hatching) of the gonad in this species (Vizziano *et al.*, 2007). Besides, in XX common carp, *Cyprinus carpio*, with a masculinization mutation (the mas mutation) a hypocorticism has been reported (Ruane *et al.*, 2005; Ruane, Th Goos and Komen, 2007) contrasting with the hypothesis that high cortisol levels would trigger masculinization. It should be also noted that this masculinization in XX common carp was always associated with an early meiosis entry in masculinized animals (Komen, Yamashita and Nagahama, 1992) contrasting also with the delayed meiotic initiation triggered by cortisol found in Japanese flounder (Yamaguchi and Kitano, 2012).

In rainbow trout no clear sex difference has been recorded on body weight before puberty (Crandell & Gall, 1993; Kause *et al.*, 2003; van den Hurk & Slof, 1981). However in our XX mal-carrying population we found significant sex differences in body weight with females being heavier than masculinized animals. The lower weight of males cannot be due to an early maturation that was not observed whatever the temperature treatments. This surprising phenotype could then be considered as an additional mal-carrying phenotype induced directly by the mal mutation(s), instead of a secondary effect of the masculinization. However relation between growth and sex differentiation is often evoked in the literature (Koumoundouros *et al.*, 2002; Tabata, 1995) and whether a differential growth rate could affect sex differentiation remains an interesting hypothesis that would link these sex

and growth phenotypes in mal-carrying animals, with potentially also a temperature effect on the growth rate.

In conclusion our results demonstrate that masculinization in XX mal-carrying rainbow trout is increased by high water temperature treatments and that masculinization also depends on their genetic background with at least some clear maternal effect. This masculinization in mal-carrying rainbow trout population is probably triggered by an interaction between the temperature treatment and a complex genetic background potentially involving some part of the GSD regulatory cascade along with some minor sex-influencing loci.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nicolas Dechamp, the staff of the INRA experimental facilities at Fish Physiology and Genomics Laboratory and PEIMA and for taking care of fish production and rearing. This work was supported by the French National Research Agency (ANR, project Sexytrout). K.V. received a fellowship from the “Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur”.

References

Angelopoulou, R., Lavranos, G. and Manolakou, P. (2012). Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10(1): 13.

Ashby, K. R. (1957). The Effect of Steroid Hormones on the Brown Trout (*Salmo trutta* L.) during the Period of Gonadal Differentiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 5(3): 225-249.

Azuma, T., Takeda, K., Doi, T., Muto, K., Akutsu, M., Sawada, M. and Adachi, S. (2004). The influence of temperature on sex determination in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Aquaculture* 234(1-4): 461-473.

Baroiller, J. F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S. and Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153(1): 30-38.

Baroiller, J. F., D'Cotta, H. and Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex Dev.* 3(2-3): 118-135.

Baroiller, J. F., Guiguen, Y. and Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55(6-7): 910-931.

Barry, T. P., Malison, J. A., Held, J. A. and Parrish, J. J. (1995). Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *Gen. Comp Endocrinol.* 97(1): 57-65.

Chevassus, B., Chourrout, D. and Jalabert, B. (1979). Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I. Les populations "monosexes". *Bull. Fr. Piscic.* 274: 18-31.

Chevassus, B. and Krieg, F. (1992). Effect of the concentration and duration of methyltestosterone treatment on masculinization rate in the brown trout (*Salmo trutta*). *Aquatic Living Resources* 5(4): 325-328.

Conover, D. O. and Kynard, B. E. (1981). Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213(4507): 577-579.

Craig, J. K., Foote, C. J. and Wood, C. C. (1996). Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(1): 141-147.

Crandell, P. A. and Gall, G. A. E. (1993). The genetics of body weight and its effect on early maturity based on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 117(1GÇô2): 77-93.

Davidson, W. S., Huang, T. K., Fujiki, K., von Schalburg, K. R. and Koop, B. F. (2009). The Sex Determining Loci and Sex Chromosomes in the Family Salmonidae. *Sex Dev.* 3(2-3): 78-87.

Fuzzen, M. L., Alderman, S. L., Bristow, E. N. and Bernier, N. J. (2011). Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in rainbow trout and differential effects of hypoxia on the endocrine and cellular stress responses during development. *Gen. Comp Endocrinol.* 170(3): 604-612.

Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques*. Paris : Masson.

- Gabillard, J. C., Rescan, P. Y., Fauconneau, B., Weil, C. and Le Bail, P. Y. (2003). Effect of temperature on gene expression of the GH/IGF system during embryonic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 298A(2): 134-142.
- Guillevic, M. and Guiguen, Y. Left-right gene expression asymmetry in gonads of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following masculinization treatments with androgens. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (ISRP). *Cybiurn* 32[2], 99. 08.
- Hattori, R. S., Fernandino, J. I., Kishii, A., Kimura, H., Kinno, T., Oura, M., Somoza, G. M., Yokota, M., Strüssmann, C. A. and Watanabe, S. (2009). Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, a Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *Plos One* 4(8).
- Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y. and Kitano, T. (2010). High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol. Reprod. Dev.* 77(8): 679-686.
- Hunter, R. H. F. (1996). Aetiology of intersexuality in female (XX) pigs, with novel molecular interpretations. *Mol. Reprod. Dev.* 45(3): 392-402.
- Jalabert, B., Billard, R. and Chevassus, B. (1975). Preliminary experiments on : production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 15 (1): 19-28.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Mäntysaari, E. and Eskelinen, U. (2003). Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture* 228(1-4): 53-68.
- Komen, J., Yamashita, M. and Nagahama, Y. (1992). Testicular Development Induced by A Recessive Mutation During Gonadal Differentiation of Female Common Carp (*Cyprinus-Carpio*, L). *Development Growth & Differentiation* 34(5): 535-544.
- Koumoundouros, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, C., Sterioli, A., Divanach, P. and Kentouri, M. (2002). Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* 292(6): 573-579.
- Kwain, W. H. (1975). Embryonic Development, Early Growth and Meristic Variation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Exposed to Combinations of Light Intensity and Temperature. *J Fish Res Bd Canada* 32(3): 397-402.
- Luhmann, L. M., Knorr, C., Horstgen-Schwark, G. and Wessels, S. (2012). First Evidence for Family-Specific QTL for Temperature-Dependent Sex Reversal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sex Dev.*
- Magerhans, A. and Horstgen-Schwark, G. (2010). Selection experiments to alter the *sex-ratio* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 306(1-4): 63-67.
- Magerhans, A., Muller-Belecke, A. and Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Effect of rearing temperatures post hatching on *sex-ratios* of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. *Aquaculture* 294(1-2): 25-29.
- Mank, J. E. and Avise, J. C. (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex Dev.* 3(2-3): 60-67.
- Mittwoch, U. (2001). Genetics of mammalian sex determination: Some unloved exceptions. *J. Exp. Zool.* 290(5): 484-489.
- Ospina-Alvarez, N. and Piferrer, F. (2008). Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single *Sex-ratio* Response Pattern and Possible Effects of Climate Change. *Plos One* 3(7): e2837.
- Penman, D. J. and Piferrer, F. (2008). Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. *Reviews Fish. Sci.* 16: 16-34.
- Price, D. J. (1984). Genetics of sex determination in fishes-a brief review. In *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*: 77-89. London: Potts, G.W., Wootton, R.J.
- Quillet, E., Aubard, G. and Queau, I. (2002). Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: detection and genetic analysis. *J. Hered.* 93(2): 91-99.
- Quillet, E., Labbe, L. and Queau, I. (2004). Asymmetry in sexual development of gonads in intersex rainbow trout. *J. Fish Biol.* 64(4): 1147-1151.
- Ruane, N. M., Lambert, J. G. D., Goos, H. J. T. and Komen, J. (2005). Hypocorticism and interrenal hyperplasia are not directly related to masculinization in XX mas-1/mas-1 carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology* 143(1): 66-74.
- Ruane, N. M., Th Goos, H. J. and Komen, J. (2007). Stress-induced facilitation of the cortisol response in 17alpha-hydroxylase deficient XX mas-1/mas-1 carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp Endocrinol.* 150(3): 473-479.
- Sarre, S. D., Ezaz, T. and Georges, A. (2011). Transitions Between Sex-Determining Systems in Reptiles and Amphibians. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 12(1): 391-406.

- Strüssmann, C. A. and Ito, L. S. (2005). Where does gonadal sex differentiation begin? Gradient of histological sex differentiation in the gonads of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). *J. Morphol.* 265(2): 190-196.
- Tabata, K. (1995). Reduction of female proportion in lower growing fish separated from normal and feminized seedlings of Hiramé, *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 61(2): 199-201.
- Valdivia, K., Mourot, B., Jouanno, E., Volff, J. N., Galiana-Arnoux, D., Guyomard, R., Cauty, C., Collin, B., Rault, P., Helary, L., Fostier, A., Quillet, E. and Guiguen, Y. (2012). Sex differentiation in an all-female (XX) rainbow trout population with a genetically governed masculinization phenotype. *Sexual Development* in press .
- Van den Hurk, R. and Lambert, J. G. D. (1982). Temperature and steroid effects on gonadal sex differentiation in rainbow trout. In *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen (NL), 1982/08/02-06: 69-72. Richter, C. J. J. and Goos, H. J. T.(Eds.): Pudoc Wageningen.
- Van den Hurk, R. and Slof, G. A. (1981). A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 218(3): 487-497.
- Van den Hurk, R. and van Oordt, P. G. (1985). Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp Endocrinol.* 57(2): 216-222.
- Van Limborgh, J. (1968). The first sign of sexual differentiation of the gonads in chick embryos. *Arch Anat Microsc Morphol* 57: 79-90.
- Vandeputte, M., Mauger, S. and Dupont-Nivet, M. (2006). An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 265-267.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H. and Chatain, B. (2007). A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* 176(2): 1049-1057.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C. and Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn.* 236(8): 2198-2206.
- Wedekind, C., Evanno, G., Szekely, T., Jr., Pompini, M., Darbellay, O. and Guthruf, J. (2012). Persistent Unequal *Sex-ratio* in a Population of Grayling (Salmonidae) and Possible Role of Temperature Increase. *Conserv. Biol.*
- Yamaguchi, T. and Kitano, T. (2012). High temperature induces cyp26b1 mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K. and Kitano, T. (2010). Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151(8): 3900-3908.
- Yamamoto, T. O. (1969). Sex Differentiation. In *Fish Physiology*: 117-175. Hoar, W. S. and Randalls, D. J.(Eds.). New York: Academic Press.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A. and Guiguen, Y. (2012). An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol.*
- Yu, Z. H. (1998). Asymmetrical testicular weights in mammals, birds, reptiles and amphibia. *International Journal of Andrology* 21(1): 53-55.

Table 1 supplementary : Gonadal phenotype of progenies in experiment A.

| Experiment A | 8°C | | | | 12°C | | | | 18°C | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | mal1 | mal2 | mal3 | mal4 | mal1 | mal2 | mal3 | mal4 | mal1 | mal2 | mal3 | mal4 |
| Previtellogenic females | 86 | 73 | 62 | 43 | 92 | 82 | 68 | 48 | 80 | 77 | 57 | 23 |
| Females with delayed oogenesis | 9 | 13 | 12 | 8 | 14 | 13 | 5 | 9 | 12 | 15 | 4 | 3 |
| Intersex | 4 | 3 | 17 | 21 | 2 | 6 | 14 | 30 | 3 | 7 | 21 | 48 |
| Males | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 2 | 3 | 16 |
| % masculinization | 4.0 ^a | 6.5 ^{ab} | 18.7 ^{bc} | 32.0 ^c | 1.9 ^a | 5.9 ^{ab} | 16.1 ^b | 36.7 ^c | 7.1 ^a | 8.9 ^a | 28.2 ^b | 71.1 ^c |
| n | 99 | 92 | 91 | 75 | 108 | 101 | 87 | 90 | 99 | 101 | 85 | 90 |

Comparison of masculinization rate between progenies at same temperature: χ^2 test (Df=1), differences between letters indicate significantly different proportions at P<0.05.

Discussion complémentaire de l'article n°2 (tableaux supplémentaires)

Le principal résultat de cet article est la hausse de masculinisation à 18°C. Il existe, néanmoins, un effet maternel dans l'amplitude de réponse, puisque dans l'expérience A seul une famille répond significativement à une hausse de la température.

Dans le **tableau supplémentaire n°1**, le détail des phénotypes gonadiques associés selon les familles et les températures d'élevage révèle d'une part qu'il y a des différences de taux de masculinisation entre familles comme vu précédemment ([Quillet *et al.*, 2002]; **article n°1**). Ces différences sont principalement dues à un effet maternel.

D'autre part, toutes les familles XXmal ont tendances à avoir une hausse du taux de masculinisation à 18°C, portant aussi bien sur le nombre d'intersexués que de mâles complets. Bien que l'analyse statistique par famille confirme la hausse de masculinisation à 18°C pour une seule famille seulement (mal4), une analyse globale en excluant la famille mal4 aboutit au même résultat que la **figure 2**. Il y a bien une sensibilité à la température du phénotype masculinisé dans toutes les populations XXmal.

En réponse à la température, la masculinisation des individus XXmal est plus aboutie puisque nous observons plus de mâles complets dans toutes les familles. Ces données et la perte de l'asymétrie gauche/droite dans la condition la plus masculinisante renforce la notion d'effet dose suggérée dans le chapitre 1 pour expliquer cette masculinisation. Des individus qui se seraient différenciés en femelles XXmal à 12°C ont été masculinisés à 18°C, ce qui indique qu'il a plus d'animaux potentiellement capables de se masculiniser que ce nous observons réellement. En conclusion du **chapitre 1**, nous avons mentionné que le phénotype masculinisé était à pénétrance incomplète mais que le phénotype associé à « *mal* », c'est à dire une dérégulation plus globale, pouvait être de pénétrance complète. Cette théorie s'illustre ici avec la hausse de masculinisation à 18°C. La hausse de la température à la période charnière de la différenciation sexuelle semble avoir contribué au déséquilibre moléculaire sous-jacent de la lignée « *mal* » aboutissant non seulement à la masculinisation de plus d'animaux mais également une masculinisation plus complète.

Table 2 supplementary : Mean body weight according gonadal phenotype in experiment A

| Experiment A | 8°C | | | 12°C | | | 18°C | | |
|--------------------------------|------------|--------------------|-----------|-------------|--------------------|-----------|-------------|-------------------|-----------|
| Gonadal phenotype | n | mean | sd | n | mean | sd | n | mean | sd |
| Previtellogenic females | 264 | 154.2 ^c | 39.4 | 290 | 231.9 ^c | 47.1 | 237 | 75.6 ^b | 17.1 |
| Females with delayed oogenesis | 42 | 111.8 ^a | 42.1 | 41 | 186.1 ^a | 76.7 | 34 | 64.9 ^a | 19.1 |
| Intersex | 45 | 118.1 ^a | 43.3 | 52 | 189.3 ^a | 52.9 | 79 | 64.1 ^a | 18.9 |
| Males | 6 | 66.2 ^b | 33.3 | 3 | 80.2 ^b | 30.2 | 25 | 56.9 ^a | 18.5 |
| Anova one way | Df | F | Pr(>F) | Df | F | Pr(>F) | Df | F | Pr(>F) |
| | 3 | 28.4 | <2.2e-16 | 3 | 24.4 | 1.76e-14 | 3 | 15.7 | 1.15e-09 |

Comparison in the same temperature condition: Anova one way, differences between letters indicate significantly different means at P<0.05.

Un autre résultat de ces expériences permet de supposer une pénétrance complète du phénotype associé à « *mal* » mais pas de la masculinisation, ce sont les données sur le poids corporel moyen. En reliant le niveau de dérégulations en comparaison des femelles témoins à des phénotypes gonadiques, nous pouvons supposer que les quatre phénotypes gonadiques observés à 11mois (**article n°1**) peuvent être classés par ordre croissant de perturbation : des femelles en prévitellogenèse comme le témoin, des femelles en retard d'ovogenèse, des animaux intersexués et, le cas le plus dérégulé, des mâles. Nous observons très nettement que plus ils sont « dérégulés », plus le poids moyen de leur catégorie diminue (**tableau supplémentaire n°2**). Ainsi les mâles ont le poids moyen les plus faibles, les animaux intersexués ou femelles retardées ont des poids moyens inférieurs aux femelles. Sauf à 18°C où nous n'observons pas de différence de poids entre animaux intersexué et mâles, probablement à cause de l'accélération de la croissance par la hausse de la température. Le développement accéléré se fait probablement au détriment d'autre processus ce qui réduit les écarts entre catégories.

La truite arc-en-ciel, animal poïkilotherme, a une croissance optimale dans une température comprise entre 6-8°C et 16-17°C [Brett, 1979], au-delà la dépense énergétique augmente au détriment de la croissance. Donc paradoxalement même si les truites se développent plus vite à 18°C, elles grandissent moins à cause d'un métabolisme accéléré spécialement dans une souche de truite présentant autant de dérégulations. Ce phénomène peut à lui-seul expliquer la masculinisation des lignées XXmal à 18°C dans une population dont le seuil d'œstrogènes est à peine suffisant pour la différenciation ovarienne. Le développement accéléré à 18°C ne permettrait pas aux tissus gonadiques de s'imprégner suffisamment en facteurs féminisants pour un développement ovarien ce qui expliquerait l'augmentation non seulement d'animaux masculinisés mais également de testicules complets à forte température.

La sensibilité à la température serait une conséquence de la dérégulation observée dans les stades précoces. Mais d'autres phénomènes peuvent également expliquer l'action de la température qui pourrait agir comme un facteur de stress via le cortisol comme il a été démontré chez le cardeau [Yamaguchi *et al.*, 2010], le médaka [Hayashi *et al.*, 2010] et l'Athérine d'Argentine [Hattori *et al.*, 2009], ou bien un effet épigénétique de la température comme chez le bar européen [Navarro-Martín *et al.*, 2011].

Une conséquence commune à la hausse de température est la diminution de l'expression de l'aromatase, dont nous avons étudié l'expression et l'activité enzymatique, dans la suite de ce travail.

II. EFFET DE LA TEMPÉRATURE AU NIVEAU MOLÉCULAIRE

Introduction

Chez les poissons dont le déterminisme sexuel est strictement dépendant de la température (TSD) ainsi que ceux dont la température peut influencer sur le déterminisme génétique (GSD+TE), l'augmentation de la température est le plus souvent associée à une déviation du *sex-ratio* vers la masculinisation [Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008] avec quelques cas contraires comme le saumon rouge [Craig *et al.*, 1996] et une lignée sélectionnée de truite arc-en-ciel [Magerhans *et al.*, 2009]. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer cet effet masculinisant de la température. Une influence de la température sur les marques épigénétiques du promoteur de l'aromatase gonadique a été ainsi démontrée chez le bar européen [Navarro-Martín *et al.*, 2011], et l'effet masculinisant de la température a aussi été assimilé à un facteur stress dont l'effet passerait par l'augmentation du cortisol circulant [Hattori *et al.*, 2009; Fernandino *et al.*, 2012; Kitano *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2010]. L'effet masculinisant de la température a également été associé selon les espèces à des apoptoses des cellules germinales [Ito *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Selim *et al.*, 2009; Strüssmann *et al.*, 1998], à une inhibition des proliférations des cellules germinales [Hayashi *et al.*, 2010] ou à un retard d'entrée en méiose [Yamaguchi and Kitano, 2012]. Le point commun à toutes ces études est la répression de l'expression du gène de l'aromatase gonadique, *cyp19a1a* [D'cotta *et al.*, 2001; Duffy *et al.*, 2010; Karube *et al.*, 2007; Kitano *et al.*, 2012] et par extension de l'activité enzymatique de l'enzyme aromatase comme chez le poisson zèbre [Uchida *et al.*, 2004].

Chez les truites arc-en-ciel de la lignée « *mal* », nos données montrent que la différenciation gonadique de ces animaux est caractérisée par un plus faible nombre de cellules germinales, un retard d'entrée en méiose (**article n°1**) à 12°C et une augmentation de la masculinisation par la hausse de température (**article n°2**). Par conséquent, dans la suite de notre étude, nous nous sommes focalisés d'abord sur l'expression de certains gènes clefs de la différenciation gonadique lors de la hausse de la température. Plus spécialement nous avons approfondi le rôle potentiel de l'aromatase dans l'établissement de ce phénotype en caractérisant l'activité enzymatique aromatase de gonades exposées *in vivo* et *in vitro* à différentes températures (12°C ou 18°C). En complément la sécrétion de stéroïdes par les gonades en cultures *in vitro*, a été caractérisée.

Tableau 4 : Expériences et familles XX mal

| Familles XX mal | Fécondation | Exposition in vivo 12°C/18°C | Exposition in vitro 12°C/18°C |
|------------------------|--------------------|--|--|
| Mal5 | Nov 2010 | qPCR, activité aromatasase, dosage, RIA surnageant de broyat | - |
| Mal6 | Nov 2010 | qPCR | - |
| Mal7 | Nov 2010 | qPCR | - |
| Mal8 | Nov 2011 | Activité aromatasase de poissons élevés à 12°C | Dosage RIA milieux de culture et surnageant de broyat de gonades, Activité aromatasase |
| Mal9 | Nov 2011 | Activité aromatasase de poissons élevés à 12°C | Dosage RIA milieux de culture et surnageant de broyat de gonades, Activité aromatasase |

Dans tous les cas, la mesure d'activité aromatasase est réalisée pendant 4h à 12°C.

Matériels et méthodes

Animaux et prélèvements

Les animaux témoins et ceux de la lignée « mal » ont été élevés dans la pisciculture expérimentale INRA du Drennec (PEIMA, Sizun, France) à 11°C. Les œufs produits ont été transférés au stade œillé (environ 15 jpf) dans les installations expérimentales du laboratoire INRA LPGP à Rennes. Ils ont été initialement maintenus dans le circuit d'eau d'alevinage à 10°C±1°C puis transférés dans le circuit à 12±1°C ou 18°C à partir de l'éclosion (~30 jpf). En plus des familles de la lignée XX mal, des familles monosexes femelles XX et monosexes mâles XY ont été produites selon les techniques établies au laboratoire [Jalabert *et al.*, 1975; Chevassus *et al.*, 1979; Chevassus *et al.*, 1988] et utilisées comme témoins des expériences dans les mêmes conditions expérimentales.

Cette partie de mon travail de thèse a été réalisée à partir de 2 générations successives de truites. Ainsi pour l'analyse *in vivo* de l'effet de la température nous avons travaillé sur les familles mal5, mal6 et mal7 exposées *in vivo* à 12°C et 18°C (comme décrit dans l'expérience B de **l'article n°2**) et pour l'analyse *in vitro* de nouvelles familles (mal8 et mal9) ont été produites et élevées seulement à 12°C, selon les conditions décrites dans **l'article n°1**. L'utilisation de ces différentes familles dans les différentes expériences est synthétisée dans le **tableau n°4**.

L'effet de la température *In vivo*, a été quantifié à partir de gonades prélevées à 61 jpf (environ 700°Cjours) pour les mesures d'expression des gènes par RT-PCR et 97 jpf (1100°Cjours) pour les mesures d'activité aromatasase. Les poissons femelles témoins et XXmal5, 6 et 7 ont été élevés dans des bacs séparés à 12°C ou 18°C à partir de l'éclosion. Un lot de témoins mâles a été élevé en parallèle uniquement à 12°C. Afin de minimiser l'effet direct de la température sur le développement, et pour comparer les lots élevés à 12°C et 18°C, les animaux ont été prélevés à des dates décalées en jours post-fécondation mais identiques pour des valeurs de degrés-jours : soit à 53 et 61 jpf pour 18°C et 12°C respectivement (environ 720°Cjours), et 74 et 97 jpf pour 18°C et 12°C respectivement (1140°Cjours). Pour l'extraction d'ARN, chaque lot a été prélevé en 4 réplicats de 75 poissons à 12°C et 18°C, sauf pour les mâles témoins qui n'ont pas été exposés à 18°C. Les gonades ont par la suite été directement congelées dans l'azote liquide pour une conservation à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN. Pour la mesure de l'activité aromatasase des femelles témoins et animaux mal5, les gonades sont prélevées en 4 réplicats de 17 poissons par lot et stockées à -80°C. Pour la mesure d'activité aromatasase, les gonades de truites mal8 et mal9 et de truites témoins mâles et femelles ont été préparées en 4 réplicats de 20 poissons à 87 jpf.

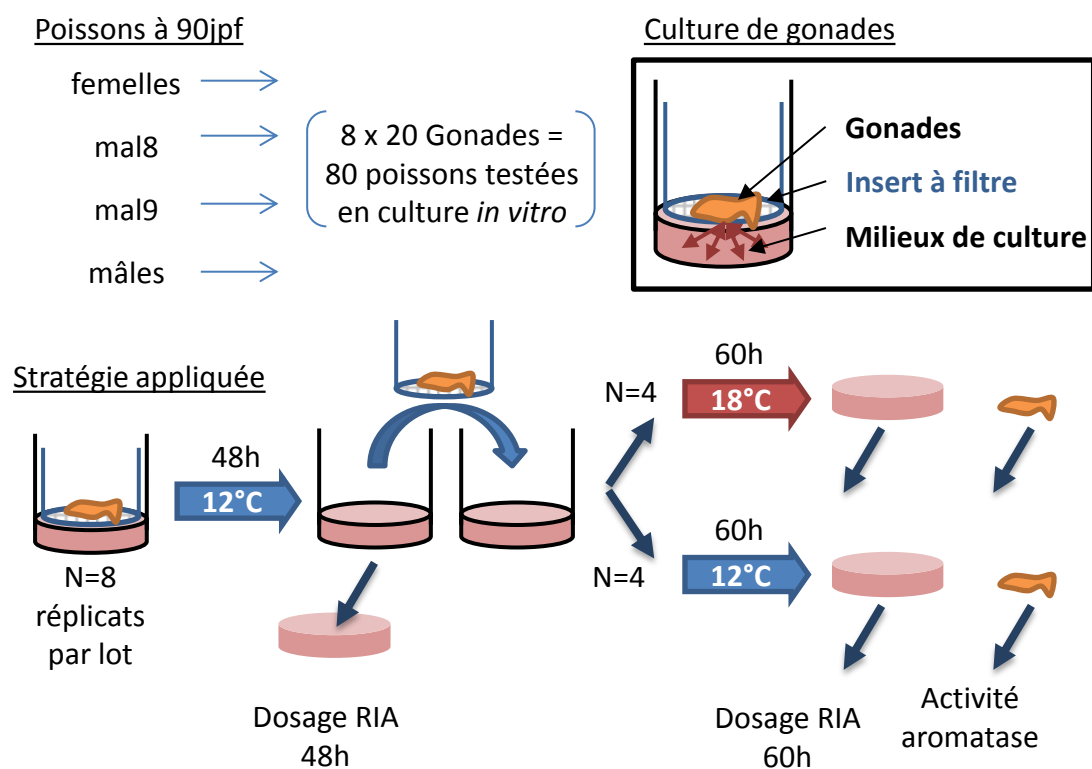


Fig. 4 : Expérience de culture de gonade pour tester l'effet température *in vitro* pendant 60h. Les gonades de 90jpf des lots témoins mâles et femelles, ainsi que celle des lots mal8 et mal9, ont été exposées 48h à 12°C puis 60h soit à 18°C soit à 12°C. Au bout de 48h le milieu de culture est récupéré pour un dosage RIA et les gonades sont mise en culture dans un nouveau milieu de culture qui sera dosé à la fin de l'expérience en parallèle de la mesure d'activité aromatasase.

In vitro, l'effet direct de la température sur les gonades a été déterminé par la mesure de l'activité aromatasase et de la production de stéroïdes. Les gonades de 80 poissons à 90 jpf par lot (8 réplicats de 20 gonades) ont été mises en culture sur des inserts en polycarbonate d'une porosité de 8 µm (Dutscher) au contact d'un milieu de culture MCDB auquel ont été ajoutés Gentamycine (50µg/ml) et Ultrosor 2% ajuster à un pH=7,8 et une pression osmotique de 310 mOM. Ces gonades d'animaux femelles témoins, mâles témoins et de 2 familles XXmal (*mal8* et *mal9*) de 90 jpf ont été prélevées en conditions semi-stériles dans une pièce à 15-17°C. Afin de diminuer les biais liés à la température et à la durée du prélèvement complet des 320 poissons nécessaire à cette expérimentation, les gonades ont d'abord été incubées 48h à 12°C. Puis elles ont été transférées dans un nouveau milieu de culture pour être exposées soit à 12°C, soit à 18°C. Le temps d'incubation a été de 60h avant l'étude de l'activité enzymatique. Après le transfert et à la fin de chaque expérience, le milieu de culture a été récupéré pour un dosage RIA des stéroïdes produits par les gonades durant la culture (**Fig. 4**). Les gonades ainsi cultivées ont été stockées à -80°C en attente de la mesure d'activité aromatasase.

Le **taux de masculinisation** des familles *mal5*, *mal6* et *mal7* a été déterminé par l'analyse histologique des gonades prélevées à 7 mois (résultats présentés dans **les articles n°1 et n°2–table 2**). Du fait de problèmes techniques d'élevage, les effectifs ont dû être abaissés pour chaque expérience en 2010-2011, et seule la famille *mal5* a été utilisée pour la mesure d'activité aromatasase pour l'effet de la température *in vivo*. Nous ne disposons pas du taux de masculinisation final des poissons élevés l'année suivante.

Quantification de l'expression des transcrits

Les ARN totaux des gonades ont été extraits par broyage dans le trizol®, puis transformés en ADNc par RT-PCR et quantifiés par PCR en temps réel selon le protocole décrit dans **l'article n°1**. L'expression des gènes a été normalisée par la moyenne géométrique de 3 gènes de références (18S, EF1α et l'actine B a) selon la méthode décrite par [Vandesompele *et al.*, 2002]. Les amorces utilisées ont été publiées dans [Yano *et al.*, 2011; Vizziano *et al.*, 2007].

Mesure de l'activité aromatasase

La mesure d'activité aromatasase est une technique adaptée de Monod *et al.* (1993) [Monod *et al.*, 1993]. Son principe repose sur le comptage des molécules d'eau tritiée produites après l'aromatation de l' 1β - ^3H androstènedione. Pour cette expérience, 4 réplicats de pool de gonades à 90 jpf ont été broyés dans un tampon à pH=7,55 (17,4mM de Na_2HPO_4 , 2,6mM de NaH_2PO_4 , H_2O , 0,21M de NaCl, 0,15M de KCl, 25M de Saccharose, 5mM de dithiothreitol et 100 μM d'AESBF). Les microsomes sont récupérés par ultracentrifugation avant d'être remis en suspension avec du tampon de broyage, le surnageant étant utilisé pour un dosage RIA ultérieur. La réaction enzymatique est effectuée en triplicats à partir de 100 μl de suspension de microsomes incubés avec 2mM de NADPH en présence de 1β - ^3H androstènedione (activité spécifique = 765 G Bq/mmole) pendant **4h en agitation continue à 12°C**. La réaction a été arrêtée avec du TCA 1M (acide trichloro acétique), mise en suspension avec du charbon pour séparer l'eau tritiée et les stéroïdes pendant une nuit à 4°C. L'eau tritiée est récupérée dans le surnageant après centrifugation et la radioactivité est mesurée avec 4 ml de Picofluor (Packard) dans un compteur beta avec un rendement de 0,34. L'activité aspécifique est estimée et soustraite à partir des tubes témoins négatifs ne contenant pas de matériel biologique. Les données sont rapportées à une gonade.

En complément de la mesure d'activité aromatasase, la quantité de protéine présente dans les suspensions de microsomes est estimée par un dosage bradford étalonnée à la BSA.

Dosage RIA

Les stéroïdes sont dosés par un dosage RIA compétitif selon [Fostier *et al.*, 1978; Fostier *et al.*, 1982; Fostier and Jalabert, 1986] soit directement dans le milieu de culture *in vitro* soit avec une extraction préalable à l'aide d'un solvant organique, acétate d'éthyl/Cyclohexane 50 :50 après avoir effectué la mesure d'activité aromatasase. Chaque échantillon est dosé en duplicat. Sa concentration en stéroïdes est déterminée à partir d'une gamme étalon (5-3000 pg) du stéroïde exogène analysé, et du seuil de sensibilité à 5% (pg/ml). Dans les milieux de cultures ont été dosés : la 17β Œstradiol (E_2), l'androstènedione ($\Delta 4$) et la testostérone (T).

Analyses statistiques

Après normalisation, l'expression relative des gènes a été analysée pour comparer l'effet de la température au sein de chaque lot soit par le test t, soit par le test de Mann Whitney (Wilcoxon) en fonction de la normalité et de la variance des données. Les données de dosage dans les milieux de culture à 48h ont été normalisées par transformation log10 avant de procéder à un test ANOVA pour comparer les lots entre eux. Lorsque les conditions étaient réunies, une ANOVA à 2 facteurs (température et lot) a été réalisée.

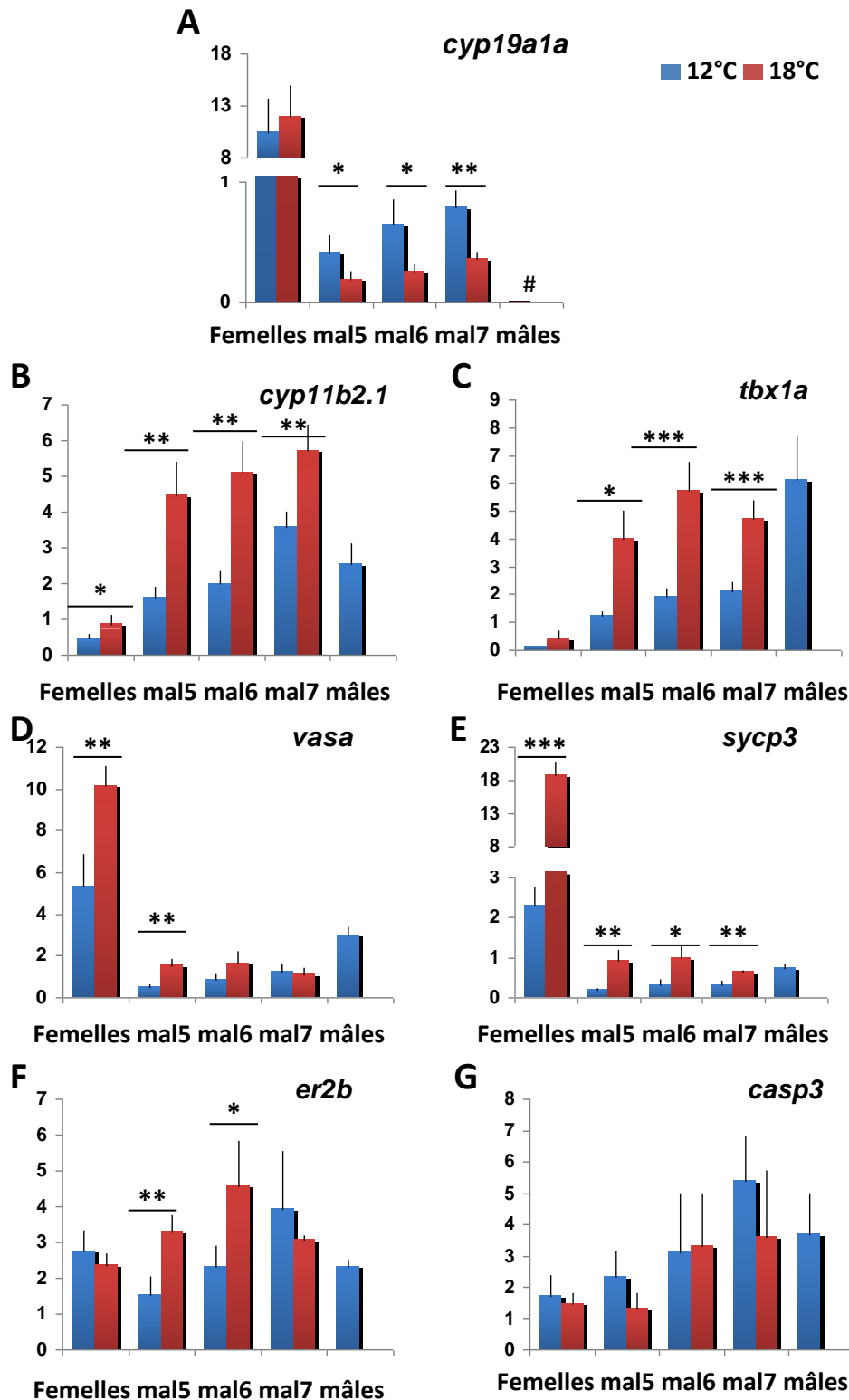


Fig. 5 : Effet de la température *in vivo* sur l'expression de gènes à 53jpf à 18°C et 61jpf à 12°C (environ 720°Cjours). L'effet masculinisant de la température est détectable chez les animaux de la lignée *mal* dès 61jpf sur les gènes clés de la différenciation sexuelle : (A) *cyp19a1a*, (B) *cyp11b2* et (C) *tbx1a*. En dehors des différences entre mâle et femelles, l'expression de marqueurs des cellules germinales et de méiose, (D)*vasa* et (E)*sycp3*, augmente avec le traitement à 18°C mais pas (F) celle d'*er2b*, récepteur beta aux oestrogènes, et celle de (G)*casp3*, un marqueur d'apoptose. (4 réplicats par lot normalisés par la moyenne géométrique de 3gènes de références; moyennes+EC, Test de Wilcoxon entre 12°C et 18°C, p value *<0,05; **<0,01; ***<0,001)

Résultats

a. Effet *in vivo* de la température sur les gonades

i. Expression génique sous influence de la température à 61 jpf

Les familles mal5, mal6 et mal7 sont apparues fortement masculinisées même à la température témoin de 12°C (71,4-81,6%). Leur exposition *in vivo* à 18°C a cependant augmenté significativement leurs taux de masculinisation (96,3-98,1%) à 7 mois (voir **article n°2**).

La conséquence de cette masculinisation par la température est visible dès 60 jpf au niveau de l'expression de gènes clefs de la différenciation sexuelle. Ainsi, l'expression de *cyp19a1a* est détectée à 12°C chez les familles XXmal à des niveaux d'expressions intermédiaires entre celui des femelles témoins et des mâles témoins (non détectés). Le traitement à 18°C n'a pas d'effet sur l'expression de *cyp19a1a* pour les femelles témoins, mais diminue son expression pour toutes les familles XXmal analysées (**Fig. 5A**). A l'inverse, l'expression des marqueurs de différenciation testiculaire, *cyp11b2.1* et *tbx1a*, augmente chez les XXmal soumis à un traitement à 18°C (**Fig. 5B et C**). Chez les XXmal à 12°C, l'expression de *cyp11b2.1* n'est pas significativement différente de celle des mâles témoins, alors que l'expression du gène *tbx1a* reste, elle, significativement plus importante chez les témoins mâles. Par contre à 18°C, l'expression de *tbx1a* atteint un niveau similaire à celui des mâles témoins.

À 12°C les gènes *vasa* et *sycp3*, respectivement des marqueurs des cellules germinales et de la méiose, sont fortement exprimés chez les femelles, plus faiblement chez les mâles et encore moins chez les animaux XXmal (**Fig. 5D et E**). L'expression de ces transcrits *vasa* et *sycp3* est fortement augmentée à 18°C chez les femelles témoins et dans une moindre mesure chez les animaux XXmal.

L'expression du gène du récepteur beta aux œstrogènes, isoforme 2, (*er2b*) a également été quantifiée, et ne montre pas de différence entre mâles et femelles témoins à 61 jpf. La hausse de température augmente l'expression de *er2b* pour les familles mal5 et mal6 (**Fig. 5F**) mais pas pour mal7.

En ce qui concerne le marqueur d'apoptose, caspase 3 (*casp3*), il n'y a pas de différence d'expression dans les gonades entre les familles XXmal et les animaux témoins à 12°C, ni d'effet de la température (**Fig. 5G**).

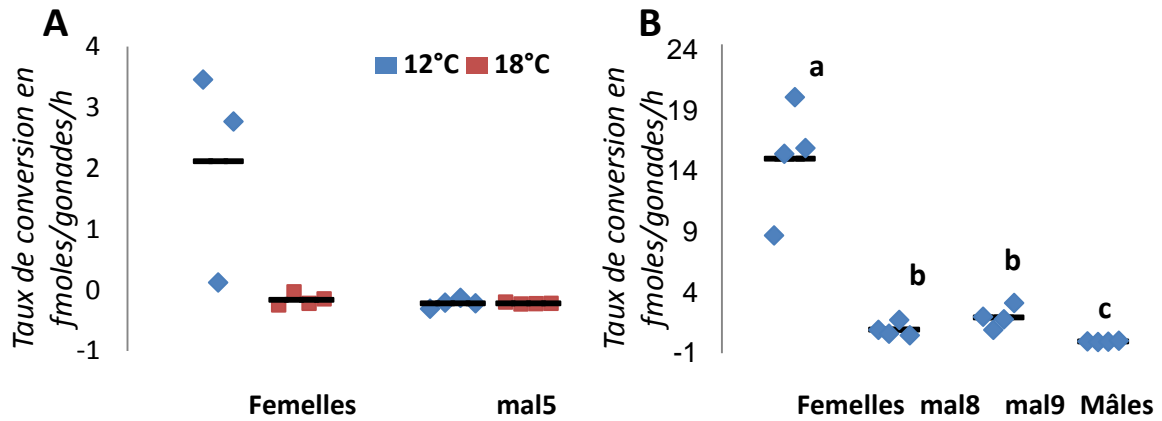


Fig. 6 : Mesure de l'activité aromatase dans les microsomes de gonades à 90jpf après exposition *in vivo* à 12°C ou 18°C. Le taux de conversion de l'androsténédione en œstrone est plus faible pour les gonades de la lignée *mal*. (A) Comparaison entre femelles témoins et individus XX*mal* élevés à 12°C ou 18°C. (B) Comparaison entre femelles et mâles témoins versus 2 familles de la lignée *mal*. Représentation en log10, analyse non paramétrique Mann Whitney entre lot représentée par des lettres pour une différence significative à 5%.

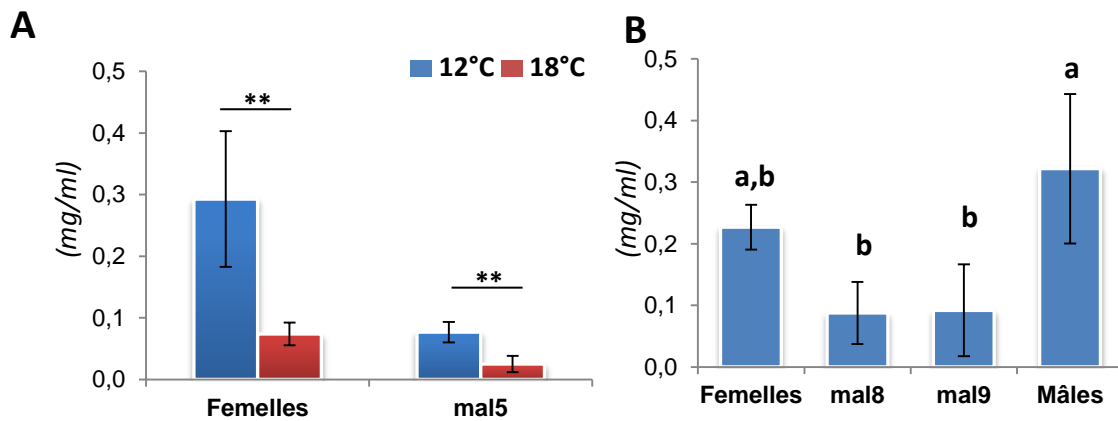


Fig. 7 : Concentration protéique des gonades broyées pour la mesure d'activité aromatase *in vivo* à 90jpf. En condition d'élevage équivalent, les concentrations protéiques sont plus faibles chez les animaux de la lignée *mal* (A) Comparaison entre femelles témoins et individus *mal* élevés à 12°C ou 18°C. (moyenne±EC; test t, p value **<0,01). (B) Comparaison entre femelles et mâles témoins versus 2 familles de la lignée *mal*. (moyenne±EC; Anova, les lettres représentent les différences significatives à 5% entre les lots).

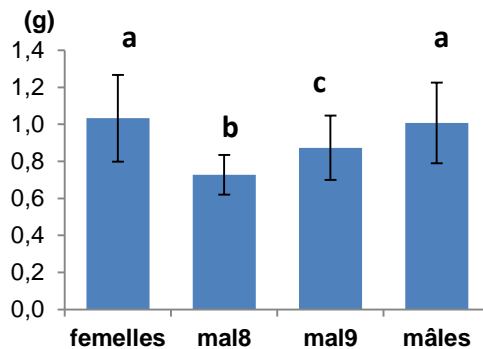


Fig. 8 : Poids moyens des individus prélevés à 90jpf. Les lots *mal* ont un poids moyen inférieur aux animaux témoins mâles et femelles, mais il existe également des différences entre lots (moyenne±EC; Anova, les lettres représentent les différences significatives à 5% entre les lots)

ii. Activité aromatase *in vivo* à 90 jpf

Deux expériences de mesures d'activité aromatase ont été réalisées, la première comparant l'effet de la température *in vivo* de la familles mal5 et de femelles témoins (**Fig. 6A**) puis une seconde comparant 2 familles XXmal à des lots témoins mâles et femelles (**Fig. 6B**).

- Taux de conversion de l'[3H]androstènedione en œstrone par gonade

Pour les 2 expériences, le taux de conversion d'androstènedione des familles mal5, mal8 et mal9 à 12°C est inférieur à celui des femelles témoins. Bien que ce taux de conversion soit faible, il reste supérieur à celui des mâles témoins qui est lui en dessous du seuil de détection. Étonnamment l'activité aromatase chute sous le seuil de détection à 18°C pour les femelles témoins au même niveau que *mal5*. En conséquence d'un taux de conversion non détectable à 12°C, nous n'observons pas d'effet de la température *in vivo* sur l'activité aromatase des microsomes chez les animaux de la population mal5 entre 12 et 18°C.

- Dosages protéiques

Le dosage Bradford réalisé sur les suspensions de microsomes indique une quantité de protéines par gonade plus faible chez les animaux XXmal (**Fig. 7**) que chez les animaux témoins qui ne présentent pas de différences entre mâles et femelles. De plus entre 12°C et 18°C, la quantité de protéines diminue pour les femelles témoins et les animaux mal5.

- Poids

À 90 jpf, il n'y a pas de différence de poids entre femelles et mâles témoins. Au contraire, les animaux mal8 et mal9 ont un poids moyen inférieur et différent entre les lots (**Fig. 8**).

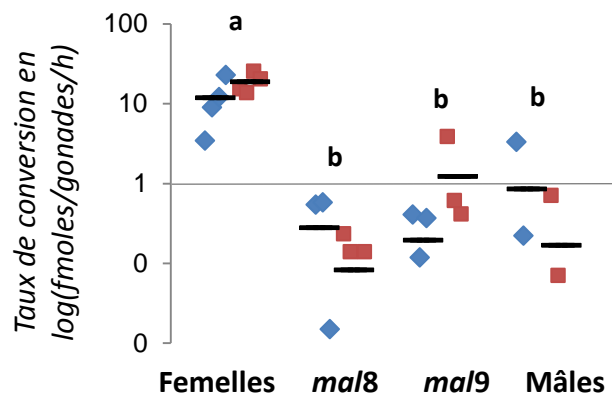


Fig. 9 : Mesure de l'activité aromatase dans les microsomes à 90jpf après exposition durant 60h *in vitro* à 12°C ou 18°C. Le taux de conversion de l'androsténédione en oestrone est plus faible pour les gonades de la lignée *mal* et les témoins mâles à 12°C. La température n'affecte pas l'activité aromatase des microsomes ni pour les animaux témoins, ni pour les animaux *mal*. Transformation log10 et Anova à 2 facteurs lot et température, les lettres sont différentes entre lots pour une différence significative d'au moins 5%, pas d'effet température.

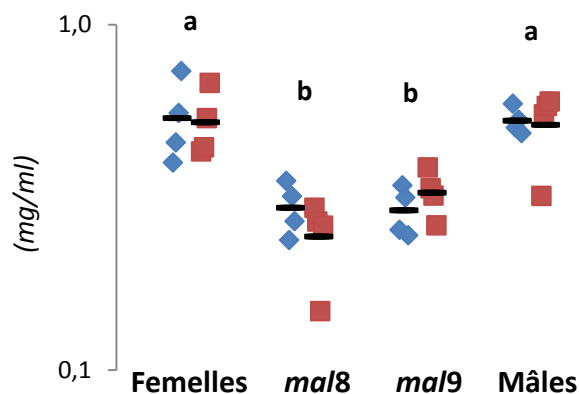


Fig. 10 : Concentration protéique des gonades broyées pour la mesure d'activité aromatase *in vivo* à 90jpf. En condition d'élevage équivalent, les concentrations protéiques sont plus faibles chez les animaux de la lignée *mal* et en 60h la température n'a pas d'effet *in vitro* sur la concentration protéique (ANOVA à 2 facteurs, les lettres représentent les différences significatives entre lots, il n'y a pas d'effet de la température)

b. Effet in vitro de la température sur les gonades

i. Activité aromatase in vitro à 90 jpf

L'effet de la température a été étudié *in vitro* sur les gonades d'animaux témoins mâles et femelles ainsi que 2 familles mal8 et mal9.

- Taux de conversion de l'[3H]androstènedione en œstrone par gonades

L'activité aromatase est élevée chez les femelles témoins en comparaison aux mâles témoins et aux lots mal8 et mal9. Entre 12 et 18°C, nous n'observons pas de différences significatives quelles que soient les familles (témoins et animaux XXmal) (**Fig. 9**).

- Dosage protéiques

L'analyse des variances à 2 facteurs montre une différence significative entre lots mais pas entre traitements thermiques. La température de culture des gonades pendant 60h n'a donc pas influé sur les quantités de protéines dans les microsomes (**Fig. 10**).

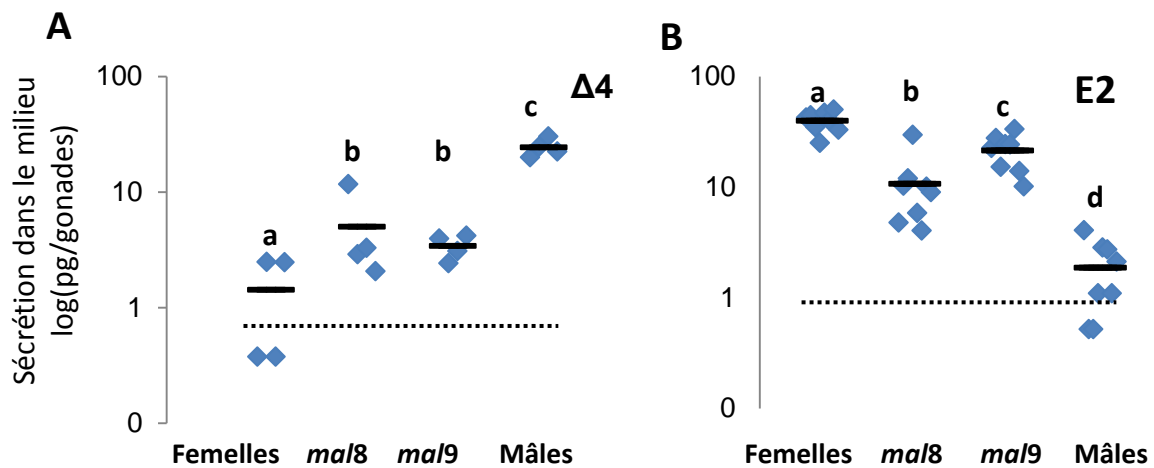


Fig. 11 : Dosage RIA des stéroïdes sécrétés dans le milieu de culture pendant 48h à 12°C. Représentation des dosages: les différents réplicats (losanges), la moyenne des lots (trait) et le seuil de sensibilité de détection à 5% (en pointillés) (A) l'androsténedione ($\Delta 4$) fortement produit par les testicules des mâles témoins, est peu excrétée par les gonades des lignées mal encore moins par les ovaires. Données log10 (B) la 17 β -oestradiol (E2), hormone féminisante fortement produite par les ovaires, est modérément excrétées par les gonades mal et presque indétectable dans le milieu de culture des testicules. Lettres différentes entre lots pour une différence significatives d'au moins 5% (p value de test t) Seuil de sensibilité à 5% de $\Delta 4$: 0,75 pg/gonades et E2: 1,04 pg/gonades

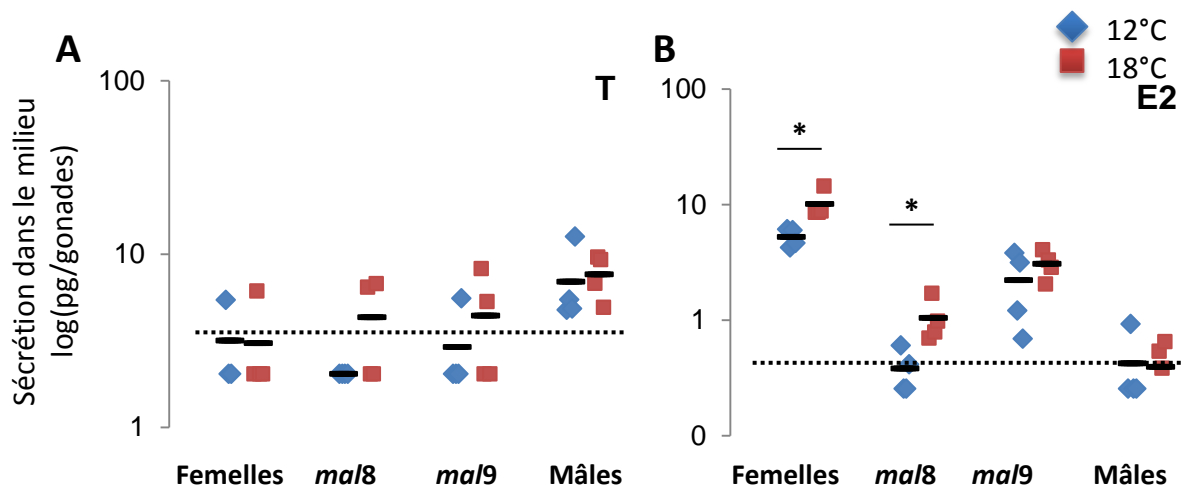


Fig. 12 : Dosage RIA des stéroïdes accumulés dans le milieu de culture pendant 60h à 12°C ou 18°C. Représentation log10 des dosages des différents réplicats et du seuil de sensibilité de détection à 5%, ANOVA à 2 facteurs température et lot (A) la testostérone (T) fortement produite par les testicules des mâles témoins, est difficilement détectable dans les surnageants des lots mal et femelles témoins. La hausse de température stimule la production chez quelque réplicats des lignées mal sans différence significative (B) la 17 β -oestradiol (E2), hormone féminisante fortement produite par les ovaires, est modérément excrétée par les gonades mal et presque indétectable dans le milieu de culture des testicules. Seuil de sensibilité à 5% de T: 4,06 pg/gonades et E2: 0,51 pg/gonades

ii. Dosage des milieux de culture

Les sécrétions de stéroïdes accumulées à la fin de chaque culture de gonade ont été dosées par RIA avant et après traitement thermique.

- Production de stéroïdes *in vitro* avant traitement thermique à 48h

(a) Androstènedione ($\Delta 4$) – (seuil de sensibilité à 5% : 0,75 pg/gonades)

Après 48h de culture *in vitro*, les testicules témoins sécrètent plus de $\Delta 4$ que les ovaires témoins. Aucune différence entre familles n'est détectée chez les animaux XXmal, mais celles-ci ont une sécrétion de $\Delta 4$ plus faible que les mâles témoins et plus forte que les femelles témoins (**Fig. 11A**).

(b) Œstradiol (E2) – (seuil de sensibilité à 5% : 1,04 pg/gonades)

À l'inverse l'accumulation d'œstradiol est plus forte dans les ovaires témoins que les testicules témoins à 90 jpf. Les familles XXmal présentent des niveaux de sécrétion intermédiaires plus faibles que ceux des femelles témoins mais supérieurs à ceux des mâles témoins. La famille mal9 a une sécrétion d'E2 plus forte que la famille mal8 (**Fig. 11B**).

Après 48h de culture *in vitro* à 12°C, les gonades XXmal ont produit de l'androstènedione et de l'œstradiol à des niveaux intermédiaires à ceux ovaires ou testicules témoins. Globalement les animaux « mal » produisent peu de stéroïdes sexuels.

- Production de stéroïdes après exposition à 12°C ou 18°C

(c) Testostérone (T) – (seuil de sensibilité : 4,06 pg/gonades)

Après 60h de culture, la testostérone est presque indétectable dans le milieu de culture des ovaires témoins et des gonades XXmal. Il n'y a pas non plus d'effet de la température sur l'accumulation de testostérone dans le milieu (**Fig. 12A**).

(d) Œstradiol (E2) – (seuil de sensibilité : 0,51 pg/gonades)

Comme précédemment, les ovaires témoins sécrètent plus d'E2 que les autres lots. La sécrétion d'E2 est très faible en limite du seuil de détection pour les gonades de la famille mal8 et les testicules témoins (**Fig. 12B**).

L'augmentation de température a favorisée l'accumulation d'E2 par les ovaires témoins et les gonades XXmal mais n'a pas eu d'effet sur la production de testostérone.

Discussion

Effet de la température sur l'expression des gènes

En accord avec les données histologiques indiquant une hausse du nombre d'animaux masculinisés à 18°C dans toutes les familles XXmal testées (mal 5, 6 et 7), l'expression des marqueurs testiculaires *cyp11b2* et *tbx1a* sont surexprimés à 18°C et, à l'inverse, le marqueur de différenciation ovarienne, *cyp19a1a* est lui diminué. Cette diminution de l'expression de *cyp19a1a* était attendue car c'est le point commun à toutes les expériences de masculinisation par la température chez les poissons, aussi bien le bar [Blazquez *et al.*, 2008; Blázquez *et al.*, 2009], que chez le cardeau hirame [Kitano *et al.*, 1999], l'Athérine d'Argentine [Karube *et al.*, 2007], la capucette [Duffy *et al.*, 2010], le tilapia [D'Cotta *et al.*, 2001; D'cotta *et al.*, 2001] et le médaka [Kitano *et al.*, 2012]. Cela renforce l'hypothèse que le gène *cyp19a1a* est une des cibles des dérégulations induites par la ou les mutations présentes chez les familles XXmal.

Des régulations similaires montrant une baisse d'expression de *cyp19a1a* et la hausse d'expression de *cyp11b2* ont été observées chez le bar [Blazquez *et al.*, 2008; Blázquez *et al.*, 2009] suite à des traitements par la température mais aucune différence n'a été observée concernant l'expression des récepteurs nucléaires aux œstrogènes. L'expression de ces gènes n'est pas fortement influencée par la température chez nos femelles témoins, mise à part une légère augmentation de celle de *cyp11b2*. Nous n'avons pas détecté d'animaux masculinisés chez ces femelles témoins XX soumises à de fortes températures d'élevage. Ces résultats sont donc bien reliés à la masculinisation des lignées XXmal observées. Par ailleurs les données sur *cyp11b2* consolident nos premières données de transcriptomes, où l'expression de *cyp11b2* n'était pas détectée chez les XXmal. Nous avons alors supposé que ce résultat était lié au faible taux de masculinisation (dilution de l'expression dans un pool hétérogène), à l'inverse ici l'expression de *cyp11b2* est détectée car les animaux sont fortement masculinisés (plus de 68% à 12°C).

Concernant le récepteur beta, isoforme 2, aux œstrogènes (*er2b*), les données de la littérature ne distinguent pas de différences d'expression entre mâles et femelles témoins avant 600°Cjours [Boyce-Derricott *et al.*, 2010], ni plus tard dans la différenciation sexuelle des gonades [Guiguen *et al.*, 1999]. Néanmoins ce récepteur est surexprimé lors de traitements masculinisants aux androgènes ou par l'utilisation d'un inhibiteur de l'aromatase [Vizziano *et al.*, 2008]. Dans nos expériences réalisées autour de cette période (environ 700°Cjours), nous n'observons aucune différence d'expression d'*er2b* à 12°C et ce quels que soient les lots, ni entre les mâles et les femelles témoins, ni avec les familles XXmal. Mais sous l'influence de forte température, nous observons une surexpression d'*er2b* chez les familles XXmal sauf la famille mal7 qui est masculinisée à 96% à 18°C. La surexpression d'*er2b* observée ne serait donc pas due à la masculinisation mais plutôt une conséquence des dérégulations sous-jacentes. Ces dérégulations pourraient être différentes d'une

famille à l'autre comme nous l'avons vu précédemment dans le microarray. S'il existe plusieurs dérégulations différentes, il est envisageable qu'il existe plusieurs combinaisons d'allèles pour différents gènes au sein des familles XXmal, certaines étant plus favorables à la masculinisation que d'autres selon les croisements. Un modèle similaire a d'ailleurs été proposé chez le poisson zèbre dont le déterminisme du sexe est polygénique [Anderson *et al.*, 2012].

Concernant les marqueurs de cellule germinale et de la méiose, respectivement *vasa* et *sycp3*, les données à 12°C présentées dans l'**article n°1** suggéraient que les animaux des familles XXmal présentent moins de cellules germinales à 60 jpf par rapport aux femelles et aux mâles témoins. La faible expression de *sycp3* peut être imputée soit à un faible nombre de cellules germinales entrant en méiose en comparaison avec les femelles témoins, soit à une signature de masculinisation puisque les mâles n'entrent pas en méiose avant plusieurs mois. Néanmoins, le fait que l'expression de *sycp3* chez les XXmal soit aussi plus faible en comparaison avec les animaux contrôles mâles suggère que cette perturbation ne soit pas que la résultante de la masculinisation. De façon intéressante les données histologiques ne montrent pas de méiose à 61 jpf, aussi bien chez les animaux témoins femelles que mâles. L'accumulation des transcrits *sycp3* est donc probablement le reflet d'une transcription anticipée dans des cellules germinales qui n'entreront en méiose que quelques jours plus tard chez les femelles témoins et beaucoup plus tard chez les mâles. Alors que nous détectons chez les mâles témoins une expression de base faible de *sycp3*, celle-ci n'a pas forcément d'impact physiologique puisque la méiose ne se produira que quelques mois plus tard, voir l'année suivante chez des mâles témoins à puberté tardive. Bien que les populations XXmal ne soient pas entièrement masculinisées, le niveau d'expression est plus faible que celui observé chez les mâles témoins, renforçant l'hypothèse du faible nombre de cellule germinale dans ces populations. De plus, les observations histologiques à 90 jpf (**article n°1**) indiquent que ces populations présentent un retard de différenciation mâle et femelle. Si des gonades se différencient en ovaire à 60 jpf, il est fort probable que l'entrée en méiose des cellules germinales soient également retardée et non encore détectable par l'expression de *sycp3* dans les gonades retardées.

L'augmentation de l'expression de ces marqueurs chez les femelles témoins et les XXmal à 18°C contraste avec les effets connus de la température sur les cellules germinales chez les poissons, car nos données suggèrent plutôt une augmentation de ces cellules germinales et/ou de leur entrée en méiose. Parmi les effets associés à une masculinisation par la température, il y a été observé une réduction de la prolifération des cellules germinales [Selim *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Kitano *et al.*, 2012] mais également du développement ovocytaire [Selim *et al.*, 2009] chez le médaka, ainsi qu'un retard de méiose chez le cardeau hirame [Yamaguchi and Kitano, 2012] et la dégénération des cellules germinales chez l'Athérine d'Argentine [Ito *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2008; Fernandino *et al.*, 2011]. Chez le Fugu, qui ne change pas de sexe en fonction de la température, la hausse de

température induit également la dégénérescence de cellules germinales [Lee *et al.*, 2009]. Le faible nombre de cellules germinales ne semble donc pas être la cause de la masculinisation chez nos animaux XXmal, car nous n’observons pas de diminution de ces marqueurs *vasa* et *sycp3* sous effet de la température. Le faible nombre de cellules germinales apparaît plutôt comme un témoin du retard de développement de la gonade de ces truites. Contrairement aux poissons cités précédemment comme par exemple le médaka [Herpin *et al.*, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007], lors du développement de la gonades le nombre de cellules germinales augmente dans les 2 sexes chez la truite arc-en-ciel [Nagler *et al.*, 2011] avec une prolifération plus intense chez les femelles après 700°Cjours [Lebrun *et al.*, 1982]. Il s’agirait plutôt d’un facteur lié à la dérégulation globale de ces animaux en comparaison aux femelles témoins. La hausse observée à 18°C pour les femelles témoins et les animaux XXmal serait dû à l’effet positif sur le métabolisme de l’élevage à forte température [Brett, 1979].

La température aurait pu avoir un effet sur l’apoptose, des cellules germinales dans les gonades des animaux XXmal comme cela a été montré chez l’Athérine d’Argentine [Ito *et al.*, 2008], le poisson zèbre [Uchida *et al.*, 2004] ou le Fugu [Lee *et al.*, 2009]. Cependant l’expression d’un marqueur de l’apoptose, la *caspase 3*, qui n’est pas différente entre les lots ni entre les conditions de température, suggère que l’augmentation de la température n’induit pas une apoptose plus marquée chez ces animaux XXmal. Des expériences spécifiques de quantification de l’apoptose seraient néanmoins nécessaires pour écarter définitivement l’hypothèse d’une apoptose accrue dans les gonades XXmal sous action de la température. Lors de la description histologique à 90 jpf à 12°C (**article n°1**) et à 18°C (données non présentées), nous avons observé des gonades XXmal avec peu de cellules germinales et des lacunes sans différences entre les conditions d’élevage. Ce phénotype pourrait résulter d’une dégénérescence ou d’un problème de prolifération des cellules germinales dans les gonades XXmal, comme semble l’indiquer les faibles niveaux d’expression de *vasa* et *sycp3*. Mais ces résultats ne sont pas étayés par les expériences de traitements à forte température pour lesquels on observe à la fois une augmentation du taux de masculinisation et de l’expression des marqueurs de cellules germinales.

Poids moyens des individus et concentration protéique des gonades

Les mesures de poids moyens réalisées regroupent le poids de toutes les expériences réalisées à 90 jpf soit environ 240 truites par lots et complètent les données observées entre 9 et 11 mois présentées dans l'**article n°2**. Le poids moyens des individus XXmal est inférieur à celui des animaux témoins mâles et femelles à un âge où il n'y a pas de différence de poids entre les sexes [Van den Hurk and Slof, 1981; Crandell and Gall, 1993; Kause *et al.*, 2003]. Même si, ici, nous ne pouvons pas relier cette baisse de poids à un phénotype gonadique comme la masculinisation, car les gonades ont été broyées pour les expériences, cette différence de poids apparaît une fois de plus comme une caractéristique des lignées XXmal.

Pour comparer l'effet de l'exposition à 12°C et à 18°C *in vivo* sans le biais dû au développement accéléré à 18°C, nous avons prélevé les gonades en degrés jours équivalents, soit à 1140°Cjours pour 97 jpf à 12°C et 74 jpf à 18°C. Les mesures de quantité de protéine, qui reflètent très probablement le poids de ces gonades, montrent que les animaux de la famille mal5 ont des gonades plus petites que celles des femelles témoins, et que ces gonades sont beaucoup plus petites à 18°C qu'à 12°C. Ce résultat indique soit que la compensation en degrés-jours que nous avons appliquée n'est pas appropriée pour compenser l'écart de développement global entre 12°C et 18°C, soit que les gonades grandissent moins à 18°C. Les expériences d'élevage de truites à différentes températures montrent que l'optimum de croissance se situe entre 6 et 17°C [Brett, 1979]. L'augmentation de la température d'élevage au-delà de 17°C se traduit par le raccourcissement des périodes clefs de développement comme l'éclosion et la résorption du sac vitellin ainsi qu'une réduction de la taille des animaux, du nombre de vertèbres et de somites [Garside, 1966b; Kwain, 1975; From and Rasmussen, 1991]. Notre traitement « température » n'a débuté qu'à partir de l'éclosion et nous avons effectivement observé une résorption du sac vitellin plus rapide chez les animaux soumis à des températures plus fortes. Il est donc possible que l'augmentation de la température ait affecté négativement le développement gonadique. De façon un peu similaire, mais à un stade de développement très différent, il a été montré que le RGS (pourcentage de la masse des gonades par rapport à la masse du poisson) de femelles de saumons Atlantique exposées à de fortes température durant la vitellogenèse était plus faible que celles des lots élevés à température normale [Watts *et al.*, 2004].

Enfin, bien que nous ignorons le *sex-ratio* final des familles mal8 et mal9, la différence de poids, de concentrations protéiques, ainsi que la sécrétion d'E2 plus faible pour la famille mal8, semble marquer une masculinisation plus forte dans cette famille.

Stéroïdes sexuels

La culture de gonades *in vitro* nous a permis de mesurer la production de stéroïdes sécrétés par les gonades à 3 mois (20 gonades par réplicat). En 48h à 12°C, l'androstènedione (précurseur de l'œstrone et de la testostérone) s'est fortement accumulée dans les milieux de culture des testicules témoins et peu dans celui des ovaires témoins, et inversement pour l'œstradiol-17 β (E2). Ce résultat pourrait être attribué à une forte conversion de l'androstènedione (Δ 4) en œstradiol par les ovaires et une plus faible conversion en testostérone ou 11 β -Hydroxyandrostènedione par les testicules. Cette hypothèse prévaut si la quantité de précurseurs de l'androstènedione et enzymes associées est équivalente entre ovaires et testicules à ce moment-là. Or si on se réfère aux transcrits de gènes de la stéroïdogénèse en amont de la production d'androstènedione, par exemple *cyp17a1* et *hsd3b1*, leurs niveaux sont beaucoup plus faibles chez les femelles entre 60 et 113 jpf (voir partie précédente et [Baron *et al.*, 2005b; Vizziano *et al.*, 2008; Vizziano *et al.*, 2007]). On peut donc supposer que le taux circulant de précurseurs est plus faible chez les femelles témoins à cette période-là.

À 12°C, Les gonades XXmal sécrètent moins de Δ 4 que les testicules témoins mais plus que les ovaires témoins et inversement pour l'E2. Ces données sont cohérentes avec une masculinisation partielle de ces familles, ce qui nous amène à supposer qu'une partie de la Δ 4 a été transformée en E2 et expliquerait les niveaux intermédiaires de ces 2 stéroïdes. Les expériences de mesure de l'activité aromatasé réalisées dans des conditions égales de substrats exogènes, ainsi que les profils stéroïdiens à 2 ans (**chapitre 1-II**), indiquent que les gonades XXmal (même les ovotestis) sont capables d'aromatiser les androgènes en œstrogènes. Ces informations suggèrent que la masculinisation des animaux XXmal n'est pas due à un défaut d'efficacité enzymatique de la protéine aromatasé. Comme la sécrétion d'E2 est moins importante dans les gonades XXmal que dans les ovaires témoins, cette plus faible capacité de synthèse d'œstrogènes serait probablement à relier à un effet négatif au niveau de la transcription du gène *cyp19a1a* qui aurait en conséquence un effet limitant sur la quantité de protéine *Cyp19a1a* dans les gonades XXmal.

L'aromatase gonadique, *cyp19a1a*

Chez plusieurs espèces de poissons, l'aromatase gonadique joue un rôle prédominant dans la différenciation ovarienne [Guiguen *et al.*, 2010]. L'inhibition de son expression est un point commun entre différents traitements masculinisant soit par les androgènes [Guiguen *et al.*, 2010], soit par le cortisol [Hayashi *et al.*, 2010] ou la température [Navarro-Martín *et al.*, 2011].

Les résultats obtenus sur des familles peu masculinisées (mal1 et mal2) nous avaient déjà montré une diminution de son expression par rapport aux femelles témoins. Bien que l'expression de *cyp19a1a* ne soit pas affectée par la température dans des ovaires témoins, nous retrouvons cette expression plus faible de *cyp19a1a* chez des familles très masculinisées (mal5, mal6 et mal7) à 12°C et encore plus à 18°C. Cette transcription plus faible du gène *cyp19a1a* est probablement associée à une plus faible quantité de la protéine aromatase, mais nous n'avons pas pu disposer d'anticorps anti-*Cyp19a1a* chez la truite qui nous aurait permis de vérifier cette hypothèse. Néanmoins nous avons pu mesurer l'activité enzymatique aromatase [Monod *et al.*, 1993] qui reflète à la fois le potentiel enzymatique (les quantités d'enzymes présentes) et l'efficacité enzymatique. Dans les élevages à 12°C, les animaux des familles « mal » ont des gonades qui présentent une activité enzymatique aromatase plus faible que celle des ovaires témoins mais néanmoins plus forte que celle des testicules témoins. Ces résultats vont dans le sens d'une quantité d'enzyme aromatase moindre chez ces animaux. Dans les élevages à 18°C, cette activité aromatase chute dans les ovaires témoins et devient presque indétectable. Mais comme discuté précédemment la taille des gonades est beaucoup plus petite à cette température suggérant soit que le développement gonadique est fortement diminué aux fortes températures, soit que l'équivalence en degrés jours est insuffisante pour compenser les différences de développement entre les deux températures. Toutefois le même type d'équivalence en °Cjours a été utilisé à 2 mois pour l'analyse des transcrits sans effet sur l'expression de *cyp19a1a* dans les ovaires témoins. Il est possible que la traduction de la protéine *Cyp19a1a*, sa dégradation ou bien son activité enzymatique soit altérée à 3 mois sous action de la température. Pour les gonades XXmal, nous ne pouvons pas dire si l'activité enzymatique a diminué ou non sous l'effet de la température forte car l'activité enzymatique à 12°C était déjà trop faible pour être détectée.

Dans les cultures *in vitro* où nous évaluons l'effet direct de la température sur les gonades pendant 60h, le traitement thermique n'a pas modifié l'activité enzymatique aromatase dans les gonades témoins ou XXmal. Au contraire, la température a eu un effet positif sur la quantité de 17 β -œstradiol (E2) sécrétée dans le milieu de culture des ovaires témoins et d'au moins une famille XXmal, et par conséquent sur l'activité de l'aromatase au cours des 60h. A l'inverse le niveau de testostérone sécrétée n'est pas affecté par la température pour aucun des lots, la sécrétion de testostérone étant faible et proche du seuil de sensibilité pour les femelles et animaux XXmal,

contrairement aux mâles témoins. Le paradoxe entre les résultats d'activité aromatasase et la sécrétion d'œstradiol s'explique par la technique utilisée. La mesure d'activité évalue l'activité enzymatique à un moment précis à 12°C pour tous les échantillons et en conditions contrôlées de substrats pendant 4h, alors que les dosages de stéroïdes quantifient la sécrétion cumulée de stéroïdes durant les 60 h de cultures à 12 et 18°C et donc l'activité de l'enzyme à 12°C ou 18°C. Dans le cas des quantifications d'E2 celles-ci reflètent donc l'activité aromatasase effective pendant 60h à 12 ou 18°C dans les gonades entières. Cette accumulation de l'E2 indique donc que l'efficacité de l'enzyme varie selon la température de façon similaire à une étude d'optimisation de la mesure d'activité aromatasase chez le bar [Gonzalez and Piferrer, 2002]. Cette étude a montré qu'une augmentation de la température de réaction *in vitro* sur microsomes était positivement corrélée à l'efficacité de l'enzyme.

Ceci semble en contradiction avec l'effet négatif d'une hausse de la température sur la sécrétion d'E2 observée *in vivo* sur le poisson zèbre [Uchida *et al.*, 2004], et *in vitro* sur des follicules ovariens isolés chez le saumon atlantique [Watts *et al.*, 2004] ou chez la truite arc-en-ciel [Pankhurst *et al.*, 1996]. Les différences entre les études *in vitro* sur gonades de truite et de saumon par rapport à notre étude sont multiples. Premièrement au niveau des stades de gonadogenèse/gamétogenèse, ces études ayant été réalisées à partir de follicules isolés pendant la vitellogenèse ou peu avant l'ovulation qui sont des stades très différents d'une gonade en différenciation. Deuxièmement l'enclenchement de la vitellogenèse se fait au printemps et l'ovulation à l'automne, soit 2 périodes où la température de l'eau évolue [Billard and Breton, 1977]. Les gonades ne répondent pas à la température de la même façon selon la période du cycle comme le montrent les travaux de [Watts *et al.*, 2004]. De plus, en travaillant *in vitro*, nous ne prenons pas en compte la régulation par les autres organes comme le foie qui participe au catabolisme de la testostérone [Kime and Saksena, 1980], ou bien la réponse du système nerveux central à la température.

L'effet masculinisant observé dans les populations XXmal à 18°C aurait pu être dû à un effet inhibiteur sur l'expression du gène de l'aromatasase, ou directement sur son activité. Nous observons une inhibition de l'expression de *cyp19a1a* *in vivo*, mais pas une inhibition directe de l'activité enzymatique *in vitro*. La hausse de température, dans les limites physiologiques, accroît l'activité, donc l'efficacité de conversion de l'enzyme, mais il y a aussi d'autres processus qui peuvent intervenir en amont sur la disponibilité des précurseurs ou en aval sur le catabolisme des œstrogènes. Il est probable que la hausse de température réprime *in vivo* l'activité de l'aromatasase chez les XXmal indirectement par la répression de sa transcription, ou par d'autres mécanismes qui ne sont pas pris en compte lors de culture de gonades seules. Quel que soit le mécanisme d'action responsable de la masculinisation des individus XXmal à 18°C, il agit d'abord sur l'expression de *cyp19a1a* et indirectement sur son activité enzymatique.

Conclusion sur l'effet de la température au niveau moléculaire

Pour comparer nos données d'élevage à des températures différentes nous avons choisi de réaliser les expériences en degrés jours équivalent (°Cjours). Cependant l'effet de la température sur le métabolisme accélère le développement au dépend de la croissance comme nous le remarquons pour les données protéiques entre 12°C et 18°C *in vivo*. Néanmoins ces résultats permettent de dégager plusieurs conclusions importantes pour une meilleure compréhension de la masculinisation des lignées « *mal* » :

Premièrement au niveau des transcrits à 2 mois, l'augmentation de la température s'est traduite *in vivo* par une signature moléculaire de la masculinisation chez les animaux XXmal uniquement. Ceci comprend une inhibition de l'expression de l'aromatase et au contraire une augmentation de *cyp11b2* et *tbx1a*, des marqueurs de stéroïdogénèse et testiculaire. La diminution de *cyp19a1a* et l'augmentation de *cyp11b2* en température masculinisante ont déjà été montrées chez l'athérine d'Argentine, le Tilapia et le Bar.

Deuxièmement au niveau protéique à 3 mois, nous nous attendions à une diminution de l'activité enzymatique de l'aromatase qui expliquerait la masculinisation à 18°C, mais cela n'a pas pu être confirmé ou invalidé *in vivo*. Au contraire, les données de cultures *in vitro* indiquent que la température stimule la production d'E2 chez les femelles témoins et au moins une famille XXmal. Comme nous pouvions le supposer à partir des profils stéroïdiens (**chapitre 1-II**), les gonades XXmal sécrètent des hormones stéroïdes en moindres quantités, mais avec un niveau basal intermédiaire entre les sécrétions testiculaires et ovariennes, probablement en relation avec la masculinisation des gonades. Par contre *in vitro* à court terme, une élévation de la température a favorisé la sécrétion d'E2 au lieu de la diminuer comme attendu pour un traitement masculinisant, et a été sans effet sur la production de T.

Troisièmement, contrairement aux autres travaux sur la masculinisation induite par une augmentation de la température, nous n'observons pas de diminution des cellules germinales dans les gonades suite aux traitements thermiques. Nous ne pouvons donc pas attribuer le faible nombre de cellules germinales à la cause de la masculinisation des lignées « *mal* » lors de la hausse de température. Ce phénotype serait alors juste une conséquence d'un retard de croissance plus que la cause de la masculinisation.

Quatrièmement, dans l'**article n°2**, une différence de poids moyen entre animaux masculinisés ou non avait été observée à un moment où il n'y a pas encore de différences de poids entre mâles et femelles [Crandell and Gall, 1993; Kause *et al.*, 2003; Van den Hurk and Slof, 1981]. Dans l'article nous ne pouvions pas comparer le poids de familles de la lignée « *mal* » à celui de témoins. Or nous observons ici que le poids moyen des familles XXmal est plus faible que celui des mâles et femelles témoins pendant la différenciation du sexe, ce qui confirme que la perturbation induite par « *mal* » ne concerne pas que le sexe des individus. Ces données associées à un faible taux protéiques et à l'histologie perturbée des gonades (**article n°2**) appuient la théorie d'un retard de croissance dans les lignées « *mal* ».

L'ensemble de ces résultats indique donc que la masculinisation résulterait de la répression de l'expression de *cyp19a1a* et non pas directement de la répression de l'activité enzymatique. Par ailleurs la fonctionnalité de la protéine aromatasase ne semble pas affectée par la température d'après les travaux *in vitro*.

III. CONCLUSION SUR L'EFFET DE LA TEMPÉRATURE

Notre principal résultat montre une augmentation de la masculinisation des animaux XXmal avec la hausse de température en cohérence avec les données chez les espèces de poissons à TSD ou GSD+TE [Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008]. Les différences de masculinisation et d'amplitude de réponse à la température entre les familles s'expliquent difficilement par la dérégulation d'un seul gène. La 1^{ère} expérience a comparé des animaux issus du même père et élevés dans le même bac, pourtant nous observons des différences entre familles pour ces 2 critères. Dans la 2^{ème} expérience d'exposition à différentes températures, nous retrouvons une hausse de la masculinisation avec des familles, issues de parents différents, élevées dans des bacs séparés à 12 et 18°C. Ces 2 expériences indiquent que, non seulement le phénotype masculinisé de la lignée « mal » est sensible à la température, mais également que le fond génétique est déterminant pour l'amplitude de la réponse. D'autres travaux effectués sur des truites arc-en-ciel ont démontrés une déviation du *sex-ratio* vers le sexe mâle ou femelle à 18°C [Magerhans *et al.*, 2009; Magerhans and Hörstgen-Schwark, 2010]. Dans nos expériences il n'est pas impossible qu'en sélectionnant le phénotype masculinisé lors de l'entretien de la lignée « mal », nous ayons également favorisé un fond génétique favorable à la masculinisation par la température.

L'action de la température peut agir à plusieurs niveaux : sur le métabolisme général, sur l'action des enzymes, sur la méthylation de gènes clefs, en tant que facteurs de stress ou bien via une apoptose ou une diminution du nombre de cellules germinales. Cette dernière hypothèse semble pouvoir être écartée car nous observons une augmentation de l'expression de marqueurs de cellules germinales à 18°C la condition la plus masculinisante. Nous pouvons également écarter l'hypothèse d'une action défavorable de la température sur l'efficacité de l'enzyme aromatase car celle-ci augmente au contraire à 18°C. En revanche il nous reste encore à explorer les autres voies, car même si l'hypothèse de l'action de la température sur le métabolisme est cohérente avec un effet dose d'E2 nécessaire à la différenciation femelle, nous n'avons pas d'information sur la production de cortisol et ou la méthylation du promoteur aromatase.

D'autre part, le poids moyens des individus XXmal est plus faible chez les animaux masculinisés (**article n°2**), mais également chez les femelles présentant un retard de gamétogénèse (**Données complémentaires article n°2**). L'hypothèse était que le poids moyens diminue en fonction du degré de perturbation en comparaison des femelles, et non pas seulement en fonction de la masculinisation. Cette hypothèse est soutenue par des poids moyens inférieurs aux femelles et aux mâles témoins pendant la différenciation sexuelle. Nous avons donc un nouveau phénotype associé à « *mal* » en plus de la masculinisation qui est probablement un retard de croissance de ces animaux XXmal.

Au vu des résultats, la mutation d'un seul et unique gène ne suffit pas à expliquer l'ensemble des phénotypes associés à « *mal* » aussi bien les différences de taux de masculinisation, la croissance et l'influence de la température dans la masculinisation des lignées « *mal* ».



DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif initial de mon travail de thèse était de caractériser le phénotype gonadique associé à la mutation « *mal* » chez la truite arc-en-ciel. Nous avons tenté de répondre à cet objectif en nous posant les quelques questions suivantes: Quel est le phénotype associé à « *mal* » ? Comment des populations génétiquement femelles se développent en mâles phénotypiques ? Quelle est la part de l'environnement, et plus précisément de la température, dans cette masculinisation ?

Au travers des différentes approches expérimentales que nous avons mises en place, nous avons découvert que ce phénotype est beaucoup plus complexe que le « simple » phénotype de masculinisation initialement décrit. Bien qu'à l'heure actuelle, le (ou les) perturbations géniques(s) initialement responsable(s) de la masculinisation de ces populations XXmal ne soit(ient) toujours pas connu(s), mes résultats permettent de dégager quelques nouvelles hypothèses intéressantes sur les causes physiologiques possibles de cette masculinisation.

Les phénotypes associés à « *mal* »

Parmi les phénotypes associés, la masculinisation tardive des animaux porteurs de « *mal* » est le phénotype le plus caractéristique et le plus facilement détectable à l'âge adulte. Notre approche a permis de mieux caractériser cette masculinisation qui est un phénotype à pénétrance incomplète [Quillet *et al.*, 2002], puisque l'ensemble des animaux ne sont pas masculinisés à l'état adulte. Ces taux de masculinisation varient d'un croisement à l'autre et sont donc sous dépendance d'effets génétiques parentaux comme nous l'avons observé pour toutes les familles que nous avons analysées (cf. en particulier l'**article n°2**).

Nos observations montrent que la plupart des animaux masculinisés sont des animaux intersexués [Quillet *et al.*, 2004], et plus particulièrement que leurs gonades sont majoritairement des ovotestis, c'est-à-dire comportant à la fois des territoires testiculaires et ovariens. Plus rarement, un ovaire et un testicule sont observés chez le même individu. Du point de vue physiologique, il est intéressant de remarquer que même si elle est parfois incomplète, cette masculinisation est fonctionnelle et que ces ovotestis produisent des œstrogènes et des androgènes 11-oxygénés en accord avec leur phénotype gonadique (**Chapitre 1-II**). Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas d'antagonisme entre les fonctions testiculaires et ovariennes au sein d'un même ovotestis à l'âge adulte chez les XXmal. Ce constat peut paraître étonnant chez un poisson gonochorique, mais le développement synchrone des parties ovariennes et testiculaires des ovotestis est un mécanisme présent chez certains poissons hermaphrodites synchrones, comme par exemple chez le serran écriture, *Serranus scriba* [Abd-el-Aziz and Ramadan, 1990].

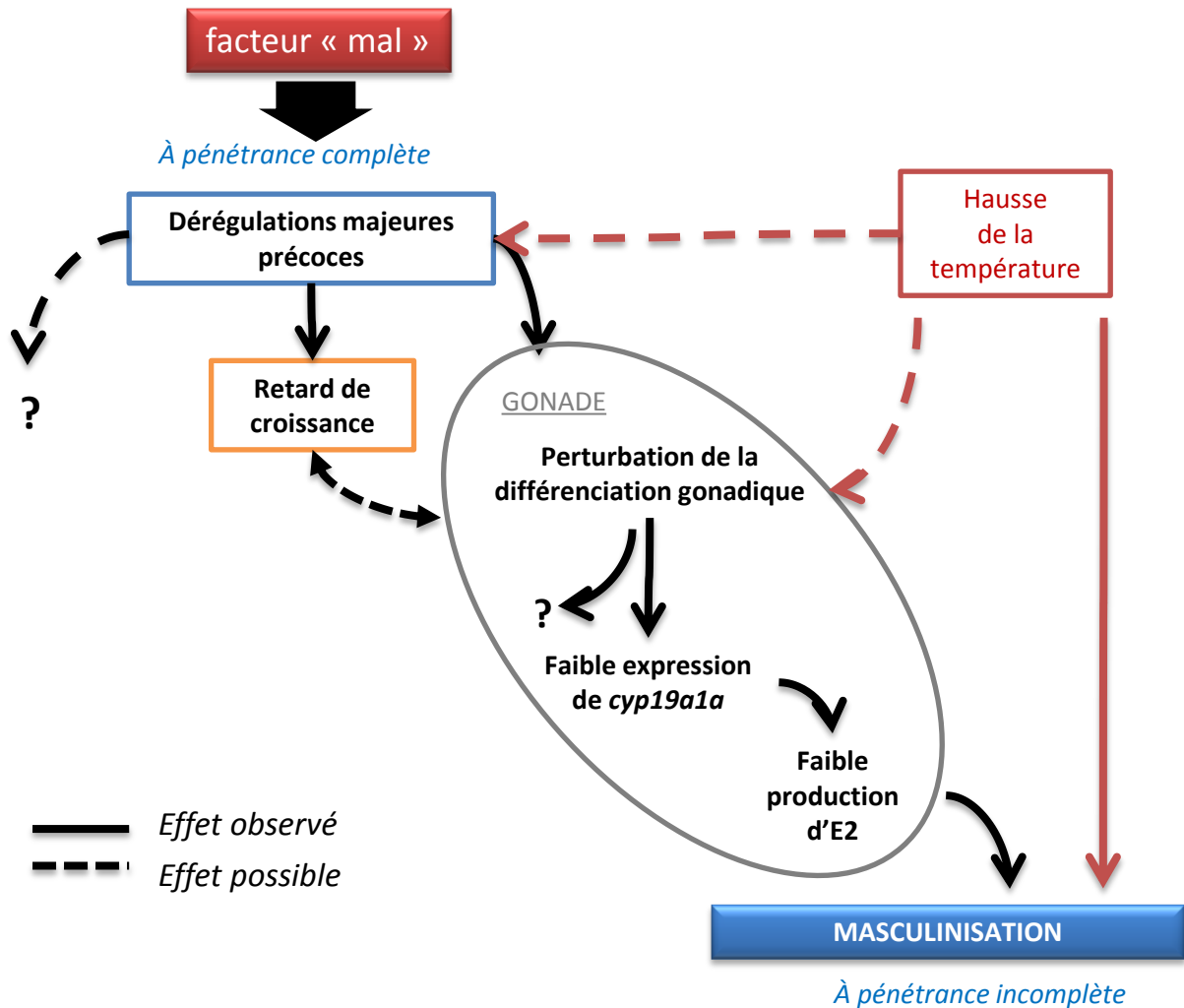


Fig. 1: Bilan des phénotypes observés : le phénotype associé au facteur « mal » est un ensemble de dérégulations affectant à la fois les gonades, la croissance et probablement d'autres organes. Ces dérégulations se répercutent au niveau de la gonade sous plusieurs formes : une perturbation de la différenciation gonadique (nombre de cellules germinales, groupes d'expressions de gènes dérégulés, ..) dont une des conséquences est l'altération de l'expression de *cyp19a1a* et de la production d'œstrogènes aboutissant à la masculinisation de certains individus. La hausse de la température pourrait intervenir à plusieurs niveaux pour au final favoriser ces dérégulations dont la masculinisation.

Un résultat inattendu de nos travaux a été la mise en évidence d'une différence de poids entre les animaux XXmal en fonction de leur phénotype gonadique (**article n°2, et données supplémentaires**), et en comparaison avec des animaux témoins mâles et femelles (**Chapitre2-II**). Ce phénotype ne semble pas lié à la masculinisation puisque chez la truite à ces stades il n'y a pas de dimorphisme de poids entre les mâles et les femelles. Nos résultats montrent donc que cette croissance plus faible des animaux XXmal est probablement un phénotype supplémentaire et non induit par la masculinisation.

Nous avons aussi montré que les animaux XXmal présentent une différenciation gonadique retardée associée à un faible nombre de cellules germinales (**article n°1**). Ces données complétant l'observation de poids moyens plus faibles et de tailles plus petites des gonades chez les XXmal, par rapport à des femelles normales, sont cohérentes avec l'hypothèse d'un retard de croissance global de ces animaux, y compris pour les gonades.

L'analyse des transcrits a révélé des dérégulations globales qui ne peuvent être attribuées strictement, ou tout du moins directement, à la masculinisation de ces animaux (**Chapitre 1-III**). De la même manière nos analyses histologiques montrent aussi des perturbations qui ne sont pas toutes reliées directement au seul phénotype de masculinisation. L'ensemble de ces résultats confortent l'hypothèse d'une dérégulation précoce plus large qu'une seule induction de masculinisation.

Le retard de la croissance corporelle et de la différenciation sexuelle de la gonade, ainsi que la dérégulation globale du développement précoce des gonades sont des caractéristiques phénotypiques jusqu'alors insoupçonnées des populations porteuses de « mal » (**Fig. 1**). Il semble alors que le phénotype associé à « mal » résulte de la somme de dérégulations non nécessairement toutes liées à la différenciation sexuelle. Ce phénotype précoce pourrait être, lui, à pénétrance complète et aboutir à une instabilité de la différenciation ovarienne qui se traduirait, ensuite, par la masculinisation d'une partie seulement des animaux conduisant à un phénotype de masculinisation tardive à pénétrance incomplète.

Le poids, un critère de sélection précoce des animaux masculinisés

Une des difficultés d'analyse de populations hétérogènes est de pouvoir analyser dès les premiers stades du développement et/ou de la différenciation sexuelle les animaux qui vont effectivement se masculiniser quelques mois plus tard. En effet, bien que la perturbation par le facteur « *mal* » semble affecter précocement l'ensemble de la population XXmal, certains des animaux vont tout de même se différencier en femelle. Il serait pourtant intéressant de pouvoir comparer ces deux types d'animaux pour comprendre quelles sont les raisons d'une pénétrance incomplète de la masculinisation dans la population XXmal.

Chez le bar, une espèce avec un déterminisme du sexe polygénique sous influence de la température [Vandeputte *et al.*, 2007], la relation entre une croissance précoce rapide et la différenciation femelle a été mise en évidence [Blázquez *et al.*, 1999; Saillant *et al.*, 2001]. En conséquence, à partir du critère de croissance, il est possible de sélectionner les poissons à croissance rapide (future femelles) versus ceux à croissance lente (futurs mâles). Ainsi une étude montre que bien avant les premiers signes de différenciation sexuelle, cette sélection sur le poids permet de détecter de façon cohérente les expressions des marqueurs de la différenciation sexuelle [Piferrer *et al.*, 2012].

Cette technique, appliquée à la population XXmal, permettrait d'isoler précocement des animaux à futur phénotype femelle utilisables comme témoin interne pour l'étude de la masculinisation. Pour cela il faudrait, au préalable, faire des tris sur la croissance et vérifier si les poissons dont la croissance précoce est la plus affectée seront également les plus masculinisés à l'âge adulte.

La corrélation entre la différence de poids et les différents degrés de perturbation de la différenciation ovarienne ouvre donc de nouvelles possibilités d'investigation concernant les mécanismes impliqués par la ou les mutations « *mal* ».

Aromatase gonadique et phénotype masculinisé «mal»

Tous nos résultats suggèrent fortement que l'altération de l'expression de l'aromatase gonadique est une des hypothèses les plus simples pour expliquer la masculinisation de la lignée « mal ». Cette hypothèse est étayée par le fait que les hormones stéroïdiennes jouent un rôle prédominant dans la différenciation sexuelle des poissons [Devlin and Nagahama, 2002], et plus particulièrement les œstrogènes et l'aromatase qui sont des acteurs clefs de la différenciation ovarienne [Guiguen *et al.*, 2010]. Or dans nos différentes expériences, nous avons pu constater que l'expression de *cyp19a1a* était particulièrement perturbée dans les gonades XXmal, même dans les populations peu masculinisées (chapitre 1-III et 2-II). Cette faible expression de *cyp19a1a* dans les gonades XXmal est de plus associée à la fois à une baisse de l'activité enzymatique aromatase et à des capacités de synthèses d'œstrogènes plus faibles qui sont probablement une des raisons de la masculinisation de ces populations XXmal. Le fait que cette dérégulation précoce de l'expression de *cyp19a1a* affecte une proportion plus grande d'animaux que celle qui sera masculinisée tardivement conforte l'hypothèse d'une instabilité de la différenciation ovarienne avec une pénétrance complète de la mutation « mal ». Cette instabilité précoce sera ensuite suivie par une masculinisation effective d'une partie variable de la population XXmal.

Les animaux XXmal présentent donc une inhibition de l'expression de *cyp19a1a* qui pourrait être la cause de la masculinisation partielle ou totale de ces animaux. Nos résultats sur l'action de la température vont aussi dans ce sens puisque nos traitements à fortes températures augmentent le taux de masculinisation de ces populations XXmal et inhibent aussi cette expression de *cyp19a1a*. Par contre, la perturbation de la synthèse des œstrogènes ne serait pas responsable du retard de croissance pondéral puisqu'il n'est pas observé de dimorphisme de croissance précoce chez des animaux normaux. Ces résultats suggèrent donc que la ou les mutations « mal » affecte(nt) la cascade de différenciation du sexe en amont de la régulation du gène *cyp19a1a*.

Une autre explication de l'insuffisance d'expression du gène *cyp19a1a* pourrait être due à une altération de la boucle de régulation positive avec les œstrogènes évoquée dans Guiguen *et al.*, 2010. La réceptivité aux signaux œstrogéniques pourrait être défailante ne permettant pas la stimulation de la transcription de *cyp19a1a* en retour. Il serait intéressant de tester cette réceptivité aux œstrogènes *in vivo* en traitant les animaux XXmal durant la période de différenciation sexuelle avec des œstrogènes. Si le taux de masculinisation décroît suite au traitement, nous pourrions expliquer la masculinisation des animaux XXmal par un défaut d'œstrogènes et dans le cas contraire, il faudrait tester les récepteurs aux œstrogènes des gonades *in vitro*. Toutefois, le défaut de réceptivité ne semble pas provenir du taux de transcription des gènes (tout du moins *er2b*) comme nous l'avons observé dans les dernières expériences de PCR en temps réelle, mais cela n'exclue pas qu'il pourrait se situer au niveau de la protéine.

Action de la température

La truite arc-en-ciel est une espèce gonochorique dont le déterminisme sexuel est connu pour être strictement génétique. Cependant des déviations du sexe ratio par la température ont déjà été observées chez cette espèce [Magerhans *et al.*, 2009; Magerhans and Hörstgen-Schwark, 2010]. Nos résultats indiquent toutefois une absence de masculinisation des femelles témoins par de fortes températures dans nos conditions d'élevage et sur notre souche de truite. L'augmentation des taux de masculinisation par la température de la lignée « *mal* » que nous mettons en évidence est donc un phénomène différent qui s'apparente plutôt à une amplification des dérégulations globales préexistantes chez ces animaux particuliers.

L'un des principaux mécanismes connus pouvant expliquer la masculinisation de poissons par des fortes températures est la répression de l'aromatase [Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette action de la température sur l'aromatase.

La truite arc-en-ciel est un animal poïkilotherme dont la croissance optimale se situe entre 6-8°C et 16-17°C [Brett, 1979], et au-delà la dépense énergétique augmente au détriment de la croissance. Donc paradoxalement, même si les truites se développent plus vite à 18°C, elles grandissent moins à cause d'un métabolisme accéléré. Mais cette accélération de la croissance et du développement à fortes températures pourrait à lui-seul être explicatif de l'augmentation des taux de masculinisation des animaux de la lignée XXmal. Ainsi à partir de nos résultats qui montrent que l'aromatase est perturbée chez les animaux « *mal* » à température normale, nous pouvons faire l'hypothèse que cette dérégulation a pour conséquence un abaissement de la synthèse d'œstrogènes ne permettant pas la mise en place d'une différenciation ovarienne complète chez tous les animaux (**Fig. 2**). Si pour être féminisée activement la gonade doit recevoir une imprégnation œstrogénique suffisante sur une période donnée (de sensibilité aux œstrogènes), alors l'accélération du développement à des températures fortes, en réduisant cette période de sensibilité, diminuerait cette imprégnation œstrogénique favorisant ainsi une augmentation de la masculinisation. Cette hypothèse expliquerait non seulement l'augmentation du taux de masculinisation des populations XXmal mais également la masculinisation plus complète des gonades des individus XXmal (**article n°2**).

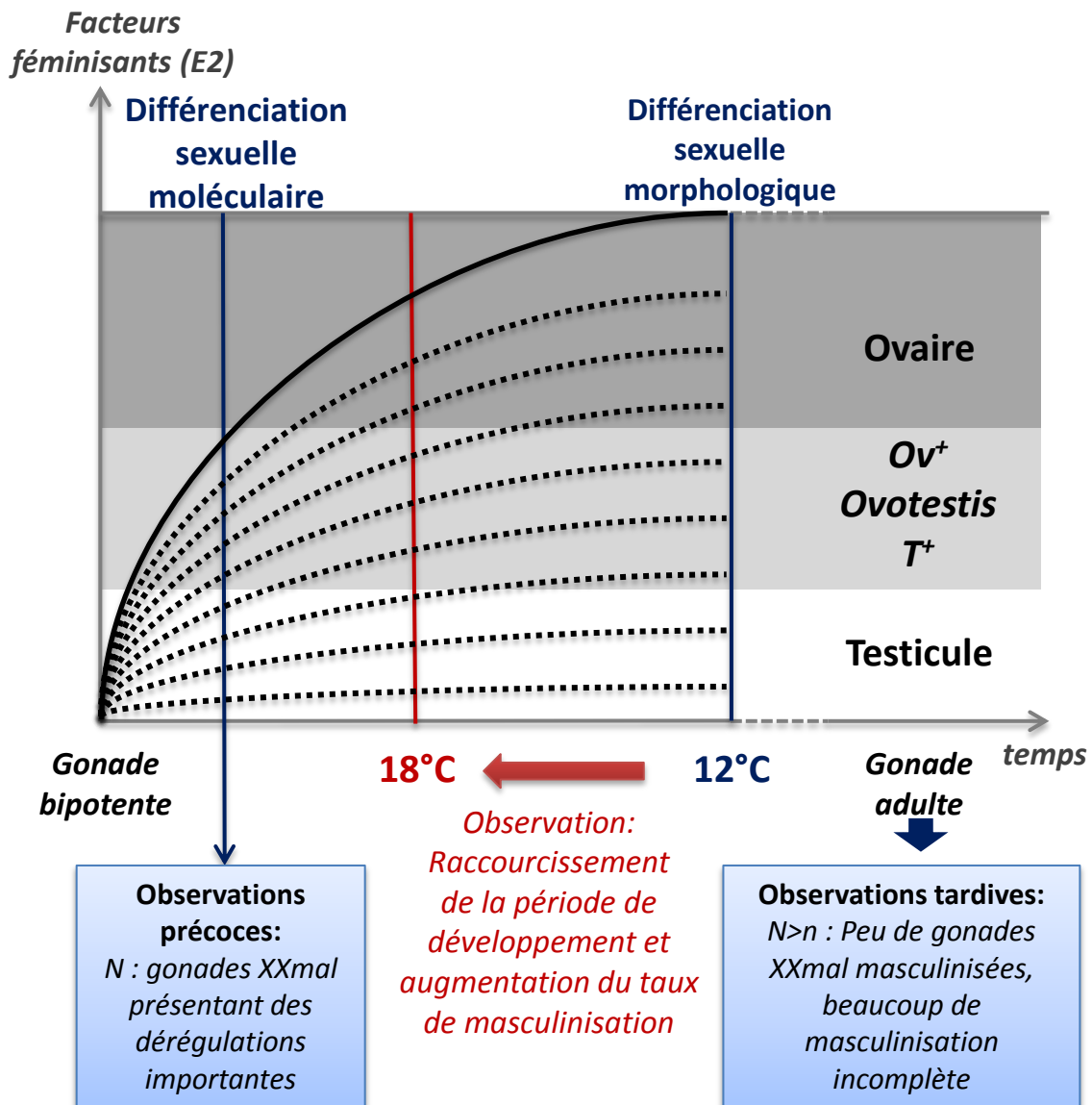


Fig. 2: Hypothèse de formation des ovotestis pendant la différenciation sexuelle et de l'effet de la température. Les ovaires XX témoins (trait plein) produisent beaucoup d'E2 contrairement aux gonades XXmal (trait pointillé). Pour expliquer la masculinisation partielle des gonades, nous supposons qu'il existe un seuil d'E2 (ici en gris foncé) nécessaire à la formation d'un ovaire. Lorsque la production d'E2 est faible (gris clair), la gonade ne serait pas suffisamment imprégnée de ce facteur pour se féminiser au moment de la différenciation morphologique et se développerait en ovotestis. L'effet dose d'E2 expliquerait les différents types de masculinisation observés.

Une augmentation de la température raccourcit la période de développement et peut altérer la croissance. Si l'accélération du développement à 18°C affecte le taux d'E2 produit, celui-ci serait tout de même trop important chez les femelles témoins pour passer sous un seuil (le seuil d'E2) nécessaire à la différenciation ovarienne. À l'inverse, les gonades XXmal produisant peu d'E2 seraient (encore) moins exposées au facteur féminisant ce qui expliquerait l'augmentation du taux de masculinisation à 18°C.

La hausse de la température pourrait aussi être assimilée à un stress comme cela a été démontré chez le cardeau hirame [Yamaguchi *et al.*, 2010], le médaka [Hayashi *et al.*, 2010] et l'Athérine d'Argentine [Hattori *et al.*, 2009]. D'ailleurs chez le cardeau hirame, la hausse de température, via le cortisol [Yamaguchi *et al.*, 2010], retarde l'entrée en méiose et induit une masculinisation [Yamaguchi and Kitano, 2012]. Cette hypothèse aurait pu s'appliquer au cas des animaux XXmal, qui présentent eux aussi un retard d'entrée en méiose en condition de température normale, mais l'augmentation de la température ne semble pas retarder d'avantage l'entrée en méiose, et au contraire nous observons une hausse de l'expression du marqueur de méiose *sycp3*. Néanmoins pour écarter complètement cette hypothèse, il faudrait compléter notre étude par un traitement au cortisol à 12°C et l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse ou de l'action du cortisol à 18°C comme cela a été fait chez le médaka [Hayashi *et al.*, 2010].

Enfin la température pourrait également avoir un effet direct sur l'expression de *cyp19a1a* en modulant la méthylation du promoteur comme cela a été démontré chez le bar [Navarro-Martín *et al.*, 2011]. Dans ce cas, il serait intéressant de voir s'il existe des méthylations du promoteur de l'aromatase explicatives de la masculinisation à fortes températures des animaux XXmal.

La masculinisation, un problème de dosage

L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer la masculinisation des animaux XXmal serait donc à relier à une synthèse trop faible d'œstrogènes (**Fig. 2**). Pour s'orienter vers une différenciation ovarienne, les gonades embryonnaires nécessiteraient une dose seuil d'œstrogènes. Chez des femelles normales qui présentent de fort niveau d'expression du gène *cyp19a1a* cette dose serait très largement au-dessus du seuil minimum nécessaire pour maintenir une différenciation ovarienne. La température en accélérant le développement et/ou en diminuant l'expression de *cyp19a1a* ne pourrait pas diminuer cette dose d'œstrogènes en-dessous du seuil minimum nécessaire pour contrecarrer cette différenciation ovarienne. Les animaux XXmal à 12°C, du fait de leur perturbation de la synthèse d'œstrogènes, auraient une dose variable suivant les individus mais très proche de ce seuil de féminisation. Certains animaux très en dessous du seuil seraient donc complètement masculinisés, d'autres avec des doses autour du seuil développeraient des gonades de type ovotestis, et ceux au-dessus du seuil resteraient femelles. À haute température, l'accélération du développement et/ou la diminution de l'expression de *cyp19a1a* feraient passer un plus grand nombre d'animaux sous cette dose seuil aboutissant à une masculinisation plus complète en nombre et en qualité (davantage de testicules) (**Fig. 2**).

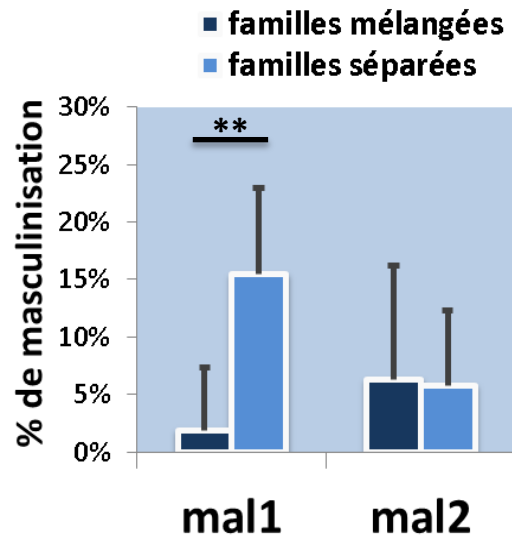


Fig. 3 : Les conditions d'élevage influence la masculinisation indépendamment de la température. Pour chacune de ces deux familles mal, une partie des animaux a été élevée en bassins séparés par famille à 12°C, et utilisée pour les expériences d'analyses moléculaires et histologiques (article 1), tandis que l'autre partie a été mélangée à partir de la 1ere alimentation (50-55dpf) à 3 autres familles mal du même âge pour les expériences sur l'effet de la température (article 2) qui comportait un témoin à 12°C. Ainsi pour une même température de 12°C, nous observons des différences de masculinisation finales dû à l'environnement, ici en particulier social.

Cet effet dose explique également l'asymétrie de masculinisation. Il y a naturellement des asymétries sous-jacentes discutées dans l'**article n°1**. La gonade gauche étant fréquemment plus grande produirait plus d'œstradiol et serait moins proche du seuil critique de différenciation ovarienne, donc moins sensible à une masculinisation. L'action de la température en accélérant le développement au détriment de la croissance et de la taille des gonades (**Chapitre 2-II**), avancerait le moment critique de la différenciation morphologique et de ce fait moins de gonades auraient été suffisamment imprégnées d'œstradiol, ce qui expliquerait la hausse de masculinisation et la perte de l'asymétrie gauche/droite à 18°C.

Quelle que soit l'origine de la masculinisation, il semblerait qu'elle agisse donc en amont de la transcription du gène *cyp19a1a*.

Au vu de nos résultats, il est difficile de résumer la mutation « *mal* » à une mutation d'un seul locus. Notre approche a permis de mieux détailler le phénotype associé à « *mal* » et de montrer que les taux de masculinisation varient d'un croisement à l'autre ce qui traduit l'importance des effets parentaux, et potentiellement l'implication d'autres facteurs génétiques.

Parmi tous les facteurs externes possibles, nous nous sommes intéressés à la température car c'est le facteur environnemental agissant sur la différenciation des gonades le mieux caractérisé chez les poissons [Devlin and Nagahama, 2002; Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008]. Mais d'autres facteurs pourraient éventuellement être pris en compte. De façon intéressante, les différences de taux de masculinisation à 12°C que nous avons observées pour des familles identiques élevées soit dans des bacs séparées, soit regroupées avec d'autres familles (**Fig. 3 et article n°1 et 2**), vont dans ce sens. En effet, ni la génétique de ces animaux ou la température d'élevage ne peuvent être ici le facteur explicatif de ces différences. Nous pouvons donc supposer que d'autres facteurs comme l'accès à la nourriture, la densité du nombre de poissons, ou des phénomènes comportementaux pourraient expliquer ces différences de masculinisation.

Perspectives appliquées de l'étude des populations XXmal

Sur la base de notre description fine du phénotype des populations porteuses de « *mal* », les applications immédiates de notre travail pourraient être de proposer une analyse approfondie des phénotypes gonadiques des mâles signalés de manière récurrente dans des populations monosexées femelles en pisciculture et qui, à terme, pourraient poser des problèmes pratiques du fait de leur maturation sexuelle précoce.

Les perspectives aquacoles du projet SEXYTROUT auraient pu être l'utilisation des mâles XXmal à la place des néomâles XX produits par traitement stéroïdiens dans les piscicultures. Bien que la mutation soit récessive, l'utilisation de tels animaux est un pari risqué pour la production. Le facteur « *mal* » demeure inconnu et est probablement présent dans d'autres souches de truite. Il a été découvert par hasard dans des conditions expérimentales très particulières (production d'animaux homozygotes à tous les loci). Non seulement nous ne l'avons pas encore identifié à ce jour, mais il s'avère que les femelles et les mâles XXmal semblent présenter des retards de croissance en comparaison des lots témoins. Le risque pour le pisciculteur serait d'une part de produire des mâles XX au lieu d'une population monosexée femelle (peu probable), mais d'autre part de produire un lot de femelles présentant un retard de croissance

Par contre, la mise en évidence d'une modulation par la température, et peut-être par d'autres facteurs externes, des taux de masculinisation des populations porteuses de « *mal* » en font un modèle original pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ces facteurs externes sur la différenciation de la gonade, que ce soit par voie directe ou en agissant sur le métabolisme général comme nous le suggérons. La connaissance de ces mécanismes d'actions, encore très peu identifiés aujourd'hui, doit aider au développement de stratégies pour la mise au point de méthode de masculinisation excluant l'utilisation de stéroïdes.



**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

- Abd-el-Aziz SH, Ramadan AA: Sexuality and hermaphroditism in fishes. I. Synchronous functional hermaphroditism in the serranid fish *Serranus scriba* L. *Folia Morphol(Praha)* 38:86–100 (1990).
- Abozaid H, Wessels S, Horstgen-Schwark G: Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sex Dev* 5:259–265 (2011).
- Abozaid H, Wessels S, Hörstgen-Schwark G: Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development* 6:201–209 (2012).
- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL: A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *NatGenet* 22:125–126 (1999).
- Anderson JL, Rodriguez MA, Braasch I, Amores A, Hohenlohe P, Batzel P, *et al.*: Multiple Sex-Associated Regions and a Putative Sex Chromosome in Zebrafish Revealed by RAD Mapping and Population Genomics. *PlosOne* 7 (2012).
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P: Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod Biol Endocrinol* 10:13 (2012).

B

- Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, *et al.*: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *NatGenet* 17(4):467–470 (1997).
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, *et al.*: A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7:497–501 (1994).
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A: Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55:910–931 (1999).
- Baroiller JF, D’Cotta H, Saillant E: Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development* 3:118–135 (2009).
- Baron D, Guiguen Y: Gene expression during gonadal sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): from candidate genes studies to high throughout genomic approach. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:119–123 (2003).
- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA: An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J Mol Endocrinol* 33:705–715 (2004).
- Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Cribiu E, *et al.*: Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development* 45:377–382 (2005a).
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y: Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73:959–966 (2005b).
- Baron D, Fostier A, Breton B, Guiguen Y: Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev* 71:471–479 (2005c).
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y: Expression profiling of candidate genes during ovary-to-testis trans-differentiation in rainbow trout masculinized by androgens. *Gen Comp Endocrinol* 156:369–378 (2008a).
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y: Masculinization by 11 beta-hydroxyandrostenedione of female rainbow trout induces a marked dysregulation of gonadal gene expression profiles. *Cybum* 32(2):98 (2008b).
- Billard R, Breton B: Sensibilité à la température des différentes étapes de la reproduction chez la truite arc-en-ciel. *Cahiers du Laboratoire de Montereau* 5:5–24 (1977).
- Blázquez M, Gonzalez A, Papadaki M, Mylonas C, Piferrer F: Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *GenComp Endocrinol* 158(1):95–101 (2008).
- Blázquez M, Carrillo M, Zanuy S, Piferrer F: Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. *Journal of Fish Biology* 55:916–930 (1999).
- Blázquez M, Navarro-Martín L, Piferrer F: Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312:686–700 (2009).

- Boyce-Derricott J, Nagler JJ, Cloud JG: The ontogeny of nuclear estrogen receptor isoform expression and the effect of 17beta-estradiol in embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Cell Endocrinol* 315:277–281 (2010).
- Breton B, Horoszewicz L, Bieniarz K, Epler P: Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. II- The female. *Reproduction Nutrition Développement* 20():1011–1024 (1980).
- Brett JR: 10 Environmental Factors and Growth [Internet], in W.S. Hoar DJR and JRB (ed): *Fish Physiology* (Academic Press, 1979, [cited 2012 Nov 3]), pp 599–675.
- Brusle J, Brusle S: Gonadogenesis in Fish. *Reprod Nutr Dev* 23:453–491 (1983).

C

- Chevassus B, Chourrout D, Jalabert B: Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I - Les populations "monosexes". *Bulletin Français de Pisciculture* :18–31 (1979).
- Chevassus B, Devaux A, Chourrout D, Jalabert B: Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J Hered* 79:89–92 (1988).
- Chourrout D: [Gynogenesis in vertebrates]. *Reprod Nutr Dev* 22:713–734 (1982).
- Comes N, Buie LK, Borrás T: Evidence for a role of angiopoietin-like 7 (ANGPTL7) in extracellular matrix formation of the human trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Genes to Cells* 16(2):243–259 (2011).
- Conover DO, Kynard BE: Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213:577–579 (1981).
- Craig JK, Foote CJ, Wood CC: Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53:141–147 (1996).
- Crandell PA, Gall GAE: The genetics of body weight and its effect on early maturity based on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 117:77–93 (1993).

D

- D’cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF: Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular reproduction and development* 59:265–276 (2001).
- D’Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF: Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *JExpZool* 290(6):574–585 (2001).
- Davidson WS, Huang T-K, Fujiki K, Von Schalburg KR, Koop BF: The sex determining loci and sex chromosomes in the family salmonidae. *Sex Dev* 3:78–87 (2009).
- De Santa BP, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, *et al.*: Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *MolCell Biol* 18(11):6653–6665 (1998).
- Devlin RH, Nagahama Y: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364 (2002).
- Duffy TA, Picha ME, Won ET, Borski RJ, McElroy AE, Conover DO: Ontogenesis of gonadal aromatase gene expression in atlantic silverside (*Menidia menidia*) populations with genetic and temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313:421–431 (2010).

E

- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:14863–14868 (1998).
- Espinosa E, Josa A, Gil L, González N: Sex Steroid Levels in XY Males and Sex-Reversed XX Males, of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), During the Reproductive Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 46:8–14 (2011).
- Espinosa E, Josa A, Gil L, Malo C, Mitjana O: Comparing sex steroid levels during the annual cycles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diploid female (XX) and triploid female (XXX) genotypic sex. *Reprod Domest Anim* 48:149–155 (2013).

F

- Fernandino JI, Hattori RS, Shinoda T, Kimura H, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA, *et al.*: Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 2:316–324 (2008).
- Fernandino JI, Popescu JT, Paul-Prasanth B, Xiong H, Hattori RS, Oura M, *et al.*: Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of pejerrey *Odontesthes bonariensis* using a heterologous microarray. *Sex Dev* 5:89–101 (2011).
- Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A, Strüssmann CA, Somoza GM: The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* 153:6003–6011 (2012).
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, *et al.*: Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506):525–530 (1994).
- Fostier A, Weil C, Terqui M, Breton B: Plasma estradiol 17 beta and gonadotropin during ovulation in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *AnnBiolAnim BiochimBiophys* 18:929–936 (1978).
- Fostier A, Billard R, Breton B, Legendre M, Marlot S: Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Gen Comp Endocrinol* 46:428–434 (1982).
- Fostier A, Billard R, Breton B: Plasma 11-oxotestosterone and gonadotrophin in relation to the arrest of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 54:378–381 (1984).
- Fostier A, Jalabert B: Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *FishPhysiol Biochem* 2(1):87–99 (1986).
- Francis RC, Barlow GW: Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid. *ProcNatlAcadSciUSA* 90(22):10673–10675 (1993).
- Fricke H, Fricke S: Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. *Nature* 266:830–832 (1977).
- From J, Rasmussen G: Growth of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) related to egg size and temperature. *Dana* 9:31–38 (1991).

G

- Gabillard J-C, Rescan P-Y, Fauconneau B, Weil C, Le Bail P-Y: Effect of temperature on gene expression of the Gh/Igf system during embryonic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol* 298:134–142 (2003).
- Garside ET: Developmental rate and vertebral number in salmonids. *JFishResBdCanada* 23:1537–1551 (1966a).
- Garside ET: Effects of Oxygen in Relation to Temperature on the Development of Embryos of Brook Trout and Rainbow Trout. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 23:1121–1134 (1966b).
- Godwin J, Luckenbach JA, Borski RJ: Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *EvolDev* 5(1):40–49 (2003).
- Gonzalez A, Piferrer F: Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *JExpZool* 293(5):500–510 (2002).
- Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard J-P, Couty I, *et al.*: Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn* 231:859–870 (2004).
- Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y: Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* 7:196 (2006).
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, *et al.*: A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245–250 (1990).
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA, *et al.*: Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev* 54:154–162 (1999).
- Guiguen Y: Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Curr Topics Steroid Res* 3:127–143 (2000).

Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang C-F: Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165:352–366 (2010).

H

Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, Oura M, et al.: Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS ONE* 4:e6548 (2009).

Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, et al.: A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:2955–2959 (2012).

Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, et al.: High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development* 77:679–686 (2010).

Herpin A, Schindler D, Kraiss A, Hornung U, Winkler C, Schartl M: Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene *Dmrt1bY*. *BMC Developmental Biology* 7(1) (2007).

Herpin A, Schartl M: *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal* 278(7):1010–1019 (2011).

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J: Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet* 87(4):349–353 (1999).

Huertas M, Cerdà J: Stocking density at early developmental stages affects growth and sex ratio in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biol Bull* 211:286–296 (2006).

I

Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang D-S, Sakai F, Paul-Prasanth B, et al.: Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78:333–341 (2008).

Ito LS, Yamashita M, Strüssmann C: Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 297(2):169–179 (2003).

Ito LS, Yamashita M, Takashima F, Strüssmann CA: Dynamics and histological characteristics of gonadal sex differentiation in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) at feminizing and masculinizing temperatures. *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol* 303:504–514 (2005).

Ito LS, Takahashi C, Yamashita M, Strüssmann CA: Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiol Biochem Zool* 81:762–774 (2008).

J

Jager RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G: A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene *SRY*. *Nature* 348(6300):452–454 (1990).

Jalabert B, Billard R, Chevassus B: Preliminary experiments on : production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 15:19–28 (1975).

Jalabert B, Fostier A: La truite arc-en-ciel. *De la Biologie à l'élevage* :1–320 (2010).

Jiménez R, Barrionuevo FJ, Burgos M: Natural exceptions to normal gonad development in mammals. *Sex Dev* 7:147–162 (2013).

Johnstone R, Simpson TH, Youngson AF, Whitehead C: Sex reversal in salmonid culture: Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture* 18:13–19 (1979).

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, D,lot E, Chen XN, Dewing P, et al.: Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans. *The American Journal of Human Genetics* 68:1102–1109 (2001).

Josso N, Belville C, di CN, Picard JY: AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome. *Human Reproduction Update* 11(4):351–356 (2005).

K

- Kanda H, Okubo T, Omori N, Niihara H, Matsumoto N, Yamada K, *et al.*: Transcriptional regulation of the rainbow trout CYP19a gene by FTZ-F1 homologue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99:85–92 (2006).
- Karube M, Fernandino JI, Strobl-Mazzulla P, Strüssmann CA, Yoshizaki G, Somoza GM, *et al.*: Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307A:625–636 (2007).
- Katoh Y, Katoh M: Comparative integromics on Angiopoietin family members. *IntJMolMed* 17(6):1145–1149 (2006).
- Kause A, Ritola O, Paananen T, Mäntysaari E, Eskelinen U: Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture* 228:53–68 (2003).
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P: A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813–2822 (1996).
- Kime DE, Saksena DN: The effect of temperature on the hepatic catabolism of testosterone in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the goldfish (*Carassius auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 42:228–234 (1980).
- Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe SI: Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Mol Endocrinol* 23:167–176 (1999).
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI: Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev* 56:1–5 (2000).
- Kitano T, Yoshinaga N, Shiraishi E, Koyanagi T, Abe S: Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Mullerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *MolReprodDev* 74(9):1171–1177 (2007).
- Kitano T, Hayashi Y, Shiraishi E, Kamei Y: Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Mol Reprod Dev* 79:719–726 (2012).
- Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, *et al.*: Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7:709–714 (1998).
- Komen J, Eding EH, Bongers ABJ, Richter CJJ: Gynogenesis in Common Carp (*Cyprinus-Carpio*) .4. Growth, Phenotypic Variation and Gonad Differentiation in Normal and Methyltestosterone-Treated Homozygous Clones and F(1) Hybrids. *Aquaculture* 111(1-4):271–280 (1993).
- Komen J, Boer P de, Richter CJJ: Male Sex Reversal in Gynogenetic XX Females of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) by a Recessive Mutation in a Sex-Determining Gene. *J Hered* 83:431–434 (1992a).
- Komen J, Yamashita M, Nagahama Y: Testicular Development Induced by a Recessive Mutation during Gonadal Differentiation of Female Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Development, Growth & Differentiation* 34:535–544 (1992b).
- Koop BF, Von Schalburg KR, Leong J, Walker N, Lieph R, Cooper GA, *et al.*: A salmonid EST genomic study: genes, duplications, phylogeny and microarrays. *BMC Genomics* 9:545 (2008).
- Koopman P, Wilhelm D: Insights into the Aetiology of Ovotesticular DSD from Studies of Mouse Ovotestes Hormonal and Genetic Basis of Sexual Differentiation Disorders and Hot Topics in Endocrinology: Proceedings of the 2nd World Conference 707:55–56 (2011).
- Kuchtey J, Kallberg ME, Gelatt KN, Rinkoski T, Komaromy AM, Kuchtey RW: Angiopoietin-like 7 secretion is induced by glaucoma stimuli and its concentration is elevated in glaucomatous aqueous humor. *Invest OphthalmolVisSci* 49(8):3438–3448 (2008).
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, *et al.*: Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proceedings.of.theNationalAcademy.of.Sciences* 104:16958–16963 (2007).
- Kwain W: Embryonic Development, Early Growth and Meristic Variation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Exposed to Combinations of Light Intensity and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32:397–402 (1975).
- Kwon J: Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *Journal of Fish Biology* 60:625–636 (2002).

L

- Lagomarsino IV, Conover DO: Variation in Environmental and Genotypic Sex-Determining Mechanisms Across A Latitudinal Gradient in the Fish, *Menidia-Menidia*. *Evolution* 47(2):487–494 (1993).
- Lala DS, Rice DA, Parker KL: Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6:1249–1258 (1992).
- Lebrun C, Billard R, Jalabert B: Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *ReprodNutrDev* 22(2):405–412 (1982).
- Lee KH, Yamaguchi A, Rashid H, Kadomura K, Yasumoto S, Matsuyama M: Germ cell degeneration in high-temperature treated pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Sex Dev* 3(4):225–232 (2009).
- Leet JK, Gall HE, Sepúlveda MS: A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *Journal of Applied Toxicology* 31:379–398 (2011).
- Liedtke D, Erhard I, Scharf M: snail gene expression in the medaka, *Oryzias latipes*. *Gene Expr Patterns* 11:181–189 (2011).
- Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, *et al.*: Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Human MolecularGenetics* 2(3):259–264 (1993).
- Lo KH, Hui MNY, Yu RMK, Wu RSS, Cheng SH: Hypoxia impairs primordial germ cell migration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *PLoS ONE* 6:e24540 (2011).
- Ludbrook LM, Harley VR: Sex determination: a “window” of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab* 15:116–121 (2004).

M

- Magerhans A, Müller-Belecke A, Hörstgen-Schwark G: Effect of rearing temperatures post hatching on sex ratios of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. *Aquaculture* 294:25–29 (2009).
- Magerhans A, Hörstgen-Schwark G: Selection experiments to alter the sex ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 306:63–67 (2010).
- Mank JE, Avise JC: Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex Dev* 3:60–67 (2009).
- Marchand O, Govoroun M, D’Cotta H, McMeel O, Lareyre JJ, Bernot A, *et al.*: DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1493:180–187 (2000).
- Martinerie L, Bouvattier C, Lombes M: SF-1, un acteur majeur de la différenciation surrénalienne et sexuelle : implications dans les dysgénésies gonadiques et l’insuffisance ovarienne prématurée. *Annales d’Endocrinologie* 70, Supplement 1(0):S26–S32 (2009).
- Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, *et al.*: Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res* 20(1):163–176 (2012).
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, *et al.*: DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888):559–563 (2002).
- Matsuda M: Sex determination in fish: Lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Development, growth & differentiation* 45:397–403 (2003).
- McClelland K, Bowles J, Koopman P: Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian JAndrol* 14(1):164–171 (2012).
- Meeks JJ, Russell TA, Jeffs B, Huhtaniemi I, Weiss J, Jameson JL: Leydig cell-specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *BiolReprod* 69(1):154–160 (2003a).
- Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL: Dax1 is required for testis determination. *NatGenet* 34(1):32–33 (2003b).
- Mello MP, Coeli FB, Assumpcao JG, Castro TM, Maciel-Guerra AT, Marques-de-Faria AP, *et al.*: Novel DMRT1 3’UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. *Arq BrasEndocrinolMetabol* 54(8):749–753 (2010).
- Monod G, De MA, Fostier A: Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 35:153–157 (1993).
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, *et al.*: The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9691–9696 (2007).

-
- Morrish BC, Sinclair AH: Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124:447–457 (2002).
- Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Récan D, Meindl A, *et al.*: Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372:672–676 (1994).
- Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, *et al.*: Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191(1):163–170 (2012).

N

-
- Nagler JJ, Cavileer T, Hunter S, Drew R, Okutsu T, Sakamoto T, *et al.*: Non-sex specific genes associated with the secondary mitotic period of primordial germ cell proliferation in the gonads of embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* 78:181–187 (2011).
- Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, Picard J-Y, Toyoda A, Taniguchi Y, *et al.*: Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development* 139:2283–2287 (2012).
- Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, Díaz N, Gutiérrez A, Di Croce L, *et al.*: DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (*cyp19a*) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLoS Genetics* 7:e1002447 (2011).
- Nicol B, Yano A, Jouanno E, Branthonne A, Fostier A, Guiguen Y: Follistatin is expressed along with aromatase in female gonads during sex differentiation in rainbow trout [Internet](Indian Society for Education and Environment, 2011), p 74.

O

-
- Olney PN, Kean LS, Graham D, Elsas LJ, May KM: Campomelic syndrome and deletion of SOX9. *AmJMedGenet* 84(1):20–24 (1999).
- Ospina-Álvarez N, Piferrer F: Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE* 3:e2837 (2008).
- Ozisk G, Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL: SF1 in the development of the adrenal gland and gonads. *Horm Res* 59 Suppl 1:94–98 (2003).

P

-
- Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, Furet JP, *et al.*: A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* 29:453–458 (2001).
- Pandian TJ, Sheela SG: Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138:1–22 (1995).
- Pankhurst NW, Purser GJ, Van Der Kraak G, Thomas PM, Forteach GNR: Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146(3-4):277–290 (1996).
- Pannetier M, Pailhoux E: [FOXL2, the gatekeeper of ovarian identity]. *MedSci(Paris)* 26(5):470–473 (2010).
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, *et al.*: R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *NatGenet* 38(11):1304–1309 (2006).
- Paul C, Teng S, Saunders PTK: A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod* 80:913–919 (2009).
- Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM: Brief Treatment with An Aromatase Inhibitor During Sex-Differentiation Causes Chromosomally Female Salmon to Develop As Normal, Functional Males. *JExpZool* 270(3):255–262 (1994).
- Piferrer F: Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197(1-4):229–281 (2001).
- Piferrer F, Blázquez M: Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31:215–226 (2005).
- Piferrer F, Ribas L, Díaz N: Genomic Approaches to Study Genetic and Environmental Influences on Fish Sex Determination and Differentiation. *Marine Biotechnology* 14:591–604 (2012).

Q

-
- Quillet E, Aubard G, Quéau I: Mutation in a Sex-Determining Gene in Rainbow Trout: Detection and Genetic Analysis. *J Hered* 93:91–99 (2002).

- Quillet E, Labbe L, Queau I: Asymmetry in sexual development of gonads in intersex rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 64:1147–1151 (2004).
- Quinn A, Koopman P: The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. *Semin Reprod Med* 30:351–363 (2012).

R

- Rodríguez-Marí A, Cañestro C, Bremiller RA, Nguyen-Johnson A, Asakawa K, Kawakami K, *et al.*: Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PLoS Genet* 6:e1001034 (2010).
- Rodríguez-Marí A, Postlethwait JH: The role of Fanconi anemia/BRCA genes in zebrafish sex determination. *Methods Cell Biol* 105:461–490 (2011).
- Römer U, Beisenherz W: Environmental determination of sex in Apistogrammai (*Cichlidae*) and two other freshwater fishes (Teleostei). *JFishBiol* 48(4):714–725 (1996).
- Ruane NM, Lambert JGD, Goos HJT, Komen J: Hypocorticism and interrenal hyperplasia are not directly related to masculinization in XX mas(-1)/mas(-1) carp, *Cyprinus carpio*. *Gen Comp Endocrinol* 143:66–74 (2005).

S

- Saillant E, Fostier A, Menu B, Haffray P, Chatain B: Sexual growth dimorphism in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 202:371–387 (2001).
- Saldanha AJ: Java Treeview - extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 20(17):3246–3248 (2004).
- Sandra GE, Norma MM: Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20(1):101–121 (2010).
- Sato Y, Shinka T, Sakamoto K, Ewis A, Nakahori Y: The male-determining gene SRY is a hybrid of DGCR8 and SOX3 and is regulated by the transcription factor CP2. *Molecular and Cellular Biochemistry* 337(1):267–275 (2010).
- Sekido R, Lovell-Badge R: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453:930–934 (2008).
- Selim KM, Shinomiya A, Otake H, Hamaguchi S, Sakaizumi M: Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquaculture* 289:340–349 (2009).
- Shang EH, Yu RM, Wu RS: Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *EnvironSciTechnol* 40(9):3118–3122 (2006).
- Shapiro DY: Differentiation and Evolution of Sex-Change in Fishes. *Bioscience* 37(7):490–497 (1987).
- Siegfried KR: In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *Journal of Fish Biology* 76:1879–1902 (2010).
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, *et al.*: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244 (1990).
- Singh AK: Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *Gen Comp Endocrinol* 181:146–155 (2013).
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, *et al.*: The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461(7261):267–271 (2009).
- Strüssmann C, Takashima F, Toda K: Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139:31–45 (1996).
- Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F: Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *JExpZool* 278:167–177 (1997).
- Strüssmann CA, Saito T, Takashima F: Heat-induced Germ Cell Deficiency in the Teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Cellular Physiology* 119(2):637–644 (1998).

T

- Takashima F, Patino R, Nomura M: Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 6(11):1317–1322 (1980).

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(9):5116–5121 (2001).

U

Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T: An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137:11–20 (2004).

V

Vaiman D, Pailhoux E: Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet* 16:488–494 (2000).

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP: Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405–409 (1999).

Van den Hurk R, Slof GA: A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res* 218:487–497 (1981).

Van den Hurk R, Van Oordt PG: Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol* 57:216–222 (1985).

Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, Chatain B: A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* 176:1049–1057 (2007).

Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, *et al.*: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7) (2002).

Veitia RA, Salas-Cortés L, Ottolenghi C, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M: Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 179:3–16 (2001).

Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y: Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236:2198–2206 (2007).

Vizziano D, Baron D, Randuineau G, Mahè S, Cauty C, Guiguen Y: Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biol Reprod* 78:939–946 (2008).

Vizziano-Cantonnet D, Baron D, Mahè S, Cauty C, Fostier A, Guiguen Y: Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *J Mol Endocrinol* 41:277–288 (2008).

W

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, *et al.*: Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6):1111–1120 (1994).

Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, *et al.*: Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Molecular Endocrinology* 21(3):712–725 (2007).

Wang D-S, Zhou L-Y, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F, *et al.*: Doublesex- and Mab-3-Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a Possible Mechanism Favoring the Male Pathway in Tilapia. *Endocrinology* 151:1331–1340 (2010).

Watts M, Pankhurst NW, King HR: Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* 135:381–390 (2004).

Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, Naish K, *et al.*: Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Res* 13(2):272–280 (2003).

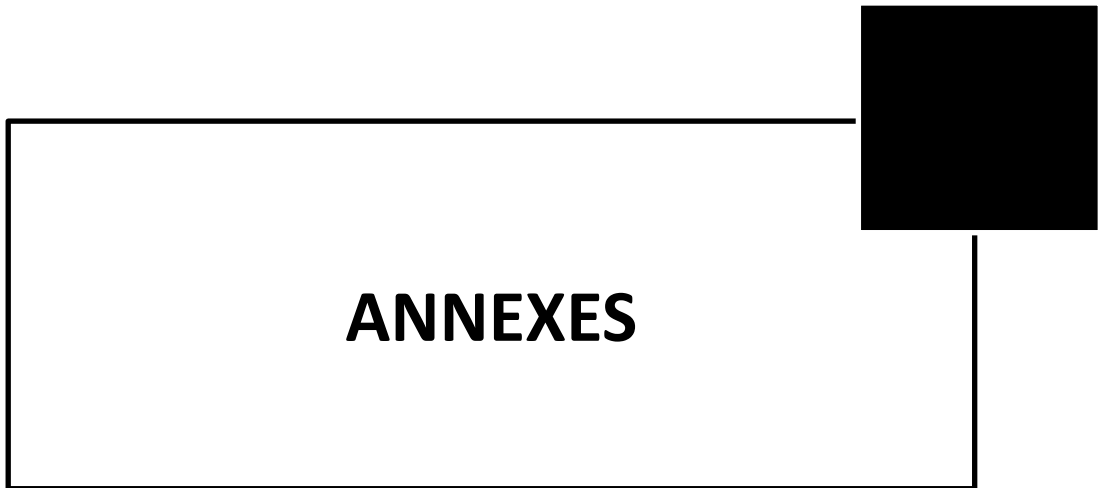
Wright TJ, Costa JL, Naranjo C, Francis-West P, Altherr MR: Comparative Analysis of a Novel Gene from the Wolf-Hirschhorn/Pitt-Rogers-Danks Syndrome Critical Region. *Genomics* 59(2):203–212 (1999).

Y

- Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, Kitano T: Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *BiochemBiophysResCommun* 359(4):935–940 (2007).
- Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T, Gen K, Kitano T: Cortisol Is Involved in Temperature-Dependent Sex Determination in the Japanese Flounder. *Endocrinology* 151:3900–3908 (2010).
- Yamaguchi T, Kitano T: High temperature induces cyp26b1 mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419:287–292 (2012).
- Yamamoto T-O: 3 Sex Differentiation [Internet], in W.S. Hoar and D.J. Randall (ed): *Fish Physiology* (Academic Press, 1969, [cited 2013 Jan 16]), pp 117–175.
- Yano A, Nicol B, Guerin A, Guiguen Y: The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. *Molecular Reproduction and Development* 78:172–180 (2011).
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, *et al.*: An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* 22:1423–1428 (2012a).
- Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, *et al.*: The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*. *Evolutionary Applications* in press (2012b).
- Yoshimoto S, Ito M: A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS Journal* 278(7):1020–1026 (2011).
- Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y: Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim Reprod* 7:187–196 (2010a).
- Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, Iwasaki Y, Miwa M, Shikina S, *et al.*: Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137:1584–1584 (2010b).

Z

- Zhang D, Komen J, Richter C, Chen Y: The effect of feeding level and genetic background on sex determination in XX; mas - 1/mas - +common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of JilinAgriculturalUniversity* 24(3):96–101 (2002).
- Zhao L, Koopman P: SRY protein function in sex determination: thinking outside the box. *ChromosomeResearch* 20(1):153–162 (2012).



ANNEXES

I. ANNEXE 1 : LISTE DES GÈNES ANNOTÉS DU MICROARRAY

Tableau 1 : listes des gènes annotés du microarray.

Annotation: * BBH (Best blast hit), Source de référence : S SWISSPROT ; R REFSEQ_RNA ; P REFSEQ_PROTEIN.

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|--|-----|--------------|
| 1 | TC100761 | CA347750.s.om.10 * | Noelin | S | NOE1_MOUSE |
| 1 | TC101381 | BX085423.s.om.10 | 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1 | S | AAKB1_PONAB |
| 1 | TC101580 | BX077630.s.om.10 | Pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor B | S | PDPFB_DANRE |
| 1 | TC101846 | BX885907.s.om.10 | Protein NLRC3 | S | NLRC3_MOUSE |
| 1 | TC102122 | BX875847.s.om.10 | Hydroxyindole O-methyltransferase | S | HIOM_CHICK |
| 1 | TC102468 | CX149653.s.om.10 * | Nattectin | S | NATTE_THANI |
| 1 | TC103084 | BX309700.s.om.10 | 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | S | FTHFD_XENTR |
| 1 | TC103742 | CA362057.s.om.10 * | Protein FAM166B | S | F166B_DANRE |
| 1 | TC104827 | CX250653.s.om.10 | NADPH oxidase activator 1 | S | NOXA1_HUMAN |
| 1 | TC105341 | BX306089.s.om.10 | Receptor-interacting serine threonine-protein kinase 3 | S | |
| 1 | TC105463 | CX247778.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> RMD5 homolog B (rmd5b) | R | |
| 1 | TC105555 | CA373623.s.om.10 | Iroquois-class homeodomain protein irx-5 | S | IRX5_XENTR |
| 1 | TC105658 | BX317667.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7 (ptn7) | R | |
| 1 | TC106504 | CA346006.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> cAMP-responsive element modulator (crem) | R | |
| 1 | TC106842 | BX306005.s.om.10 | ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 | S | ATPF1_DANRE |
| 1 | TC108065 | CA351011.s.om.10 * | Glutamine synthetase | S | GLNA_CANFA |
| 1 | TC108424 | BX865001.s.om.10 | Protein cornichon homolog | S | CNIH_PONAB |
| 1 | TC108764 | BX086871.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> insulin-like growth factor binding protein 3 (igfbp3) | R | |
| 1 | TC108935 | BX299141.s.om.10 | Lymphocyte antigen 75 | S | LY75_MESAU |
| 1 | TC109220 | CX255792.s.om.10 | Solute carrier family 35 member F2 | S | S35F2_HUMAN |
| 1 | TC109530 | DV198581.s.om.10 | Serum albumin 2 | S | ALBU2_SALSA |
| 1 | TC110037 | BX304011.s.om.10 | Uncharacterized protein C9orf117 homolog | S | CI117_DANRE |
| 1 | TC110409 | BX890524.s.om.10 | Uncharacterized protein C17orf105 | S | CQ105_HUMAN |
| 1 | TC110491 | CU072385.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> CC chemokine with stalk CK2 (LOC100135979) | R | |
| 1 | TC110595 | AU081029.s.om.10 * | Alanine aminotransferase 2-like | S | ALAT2_DANRE |
| 1 | TC110816 | CA350250.s.om.10 | Mus musculus pantothenate kinase 2 (Hallervorden-Spatz syndrome) (Pank2) | R | |
| 1 | TC111596 | CA349196.s.om.10 | Transposable element Tcb1 transposase | S | TCB1_CAEBR |
| 1 | TC111606 | BX297180.s.om.10 | Angiopoietin-related protein 3 | S | ANGL3_MOUSE |
| 1 | TC111643 | CX261135.s.om.10 | Group 10 secretory phospholipase A2 | S | PA2GX_RAT |
| 1 | TC111651 | CX146056.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Hydroxyacylglutathione hydrolase (glo2) | R | |
| 1 | TC112225 | CU072561.s.om.10 | E3 ubiquitin-protein ligase CBL | S | CBL_MOUSE |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|------------------------|--|-----|--------------|
| 1 | TC112257 | CX249778.s.om.10 | PREDICTED: Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 1 | TC112643 | BX086536.s.om.10 | 6-phosphofructokinase, muscle type | S | K6PF_BOVIN |
| 1 | TC113003 | CA347267.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Chloride channel CLIC-like protein 1 (clcc1) | R | |
| 1 | TC113057 | BX856001.s.om.10 | Rho GTPase-activating protein 4 | S | RHG04_HUMAN |
| 1 | TC113431 | DV193688.s.om.10 | Angiotensinogen | S | ANGT_SHEEP |
| 1 | TC114263 | CA359824.s.om.10 * | Cytoplasmic protein NCK2 | S | NCK2_HUMAN |
| 1 | TC114319 | CA373628.s.om.10 | Zinc finger protein ZIC 4 | S | ZIC4_XENLA |
| 1 | TC114520 | CA354441.s.om.10 * | KLRAQ motif-containing protein 1 | S | KRLAQ_CHICK |
| 1 | TC114665 | BX871522.s.om.10 | Hepatocyte growth factor-like protein | S | HGFL_HUMAN |
| 1 | TC114698 | CX724521.s.om.10 | Fibulin-7 | S | FBLN7_HUMAN |
| 1 | TC114918 | BX856760.s.om.10 | Metalloreductase STEAP1 | S | STEAP1_MOUSE |
| 1 | TC115048 | BX303930.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Synuclein (syu) | R | |
| 1 | TC115412 | BX087074.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4 (imp4) | R | |
| 1 | TC115596 | CA360980.s.om.10 | Very long-chain acyl-CoA synthetase | S | S27A2_HUMAN |
| 1 | TC115667 | BX086536.s.om.10 | 6-phosphofructokinase, muscle type | S | K6PF_BOVIN |
| 1 | TC116084 | CX139217.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> NaK ATPase alpha subunit isoform 3 (atp1a3) | R | |
| 1 | TC116165 | BX085462.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Ran-binding protein 9 (ranb9) | R | |
| 1 | TC116370 | CA341790.s.om.10 * | Legumain | S | LGMN_BOVIN |
| 1 | TC116941 | GB5RBPX01A5P20.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Neuron-specific protein family member 1 (nsg1) | R | |
| 1 | TC117075 | CA344482.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Probable arylformamidase (afmid) | R | |
| 1 | TC117505 | BX863868.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Endothelial lipase (lipe) | R | |
| 1 | TC117523 | CA347272.s.om.10 | E3 ubiquitin-protein ligase MARCH9 | S | MARH9_HUMAN |
| 1 | TC117965 | CA369737.s.om.10 | Transcription initiation factor TFIID subunit 12 | S | TAF12_MOUSE |
| 1 | TC118691 | BX311079.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> proprotein convertase subtilisin kexin type 5b (pcsk5b) | R | |
| 1 | TC119124 | BX310965.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> CD59-like protein (cd59) | R | |
| 1 | TC119273 | CA353026.s.om.10 | Transmembrane protease serine 3 | S | TMPS3_HUMAN |
| 1 | TC119338 | BX320694.s.om.10 | Guanine nucleotide-binding protein-like 3 | S | GNL3_DANRE |
| 1 | TC119772 | CA380158.s.om.10 | Chemokine receptor-like 1 | S | CML1_HUMAN |
| 1 | TC120511 | BX877629.s.om.10 | GDP-L-foce synthase | S | FCL_PONAB |
| 1 | TC120826 | BX297104.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Transmembrane protein 163 (tm163) | R | |
| 1 | TC121062 | CA379810.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> canopy 4 (cnpy4) | R | |
| 1 | TC122534 | BX305550.s.om.10 | PREDICTED: similar to ZNF16 [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>] | P | |
| 1 | TC122618 | CA346156.s.om.10 | Leucine-rich repeat LGI family member 3 | S | LGI3_HUMAN |
| 1 | TC122884 | AJ579373.s.om.10 | Angiotensinogen | S | ANGT_RAT |
| 1 | TC122948 | CX026097.s.om.10 | Indian hedgehog B protein | S | IHH_DANRE |
| 1 | TC123419 | | Capucin | S | TM90A_HUMAN |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|--------------------|---|-----|--------------|
| 1 | TC123648 | CA358020.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Acyl-CoA desaturase (acod) | R | |
| 1 | TC123669 | CX029235.s.om.10 | PREDICTED: wu:fc28f08 [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 1 | TC123767 | CX137928.s.om.10 | LWamide neuropeptides | S | LWA_HYDEC |
| 1 | TC124046 | CA374041.s.om.10 | Protein zwilch homolog | S | ZWILC_DANRE |
| 1 | TC124679 | CA376479.s.om.10 | Period circadian protein homolog 2 | S | PER2_CHICK |
| 1 | TC125058 | CA373479.s.om.10 | Neuron-specific protein family member 1 | S | NSG1_CHICK |
| 1 | TC125723 | CA356877.s.om.10 | Connective tissue growth factor | S | CTGF_HUMAN |
| 1 | TC125896 | CX248257.s.om.10 | Disks large homolog 4 | S | DLG4_DANRE |
| 1 | TC126433 | CX253195.s.om.10 | Protein quaking | S | QKI_RAT |
| 1 | TC126641 | CA354504.s.om.10 | Interferon regulatory factor 4 | S | IRF4_HUMAN |
| 1 | TC126706 | CB495913.s.om.10 | PREDICTED: <i>Taeniopygia guttata</i> cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (LOC100229697) | R | |
| 1 | TC126743 | CX248516.s.om.10 | Paired box protein Pax-9 | S | PAX9_HUMAN |
| 1 | TC127383 | BX297346.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Parvalbumin alpha (prva) | R | |
| 1 | TC127787 | CA368742.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> NaK ATPase alpha subunit isoform 3 (atp1a3) | R | |
| 1 | TC129209 | CA363555.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Major facilitator superfamily domain-containing protein 2 (mfsd2) | R | |
| 1 | TC129459 | BX864777.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Sulfate transporter (s26a2) | R | |
| 1 | TC129602 | BX304123.s.om.10 | Hepcidin (Fragment) | S | HEPC_ONCMY |
| 1 | TC129779 | CA354502.s.om.10 * | Beta-secretase 2 | S | BACE2_MOUSE |
| 1 | TC130014 | BX080652.s.om.10 | Cytochrome P450 2K1 | S | CP2K1_ONCMY |
| 1 | TC130026 | BX859591.s.om.10 | PREDICTED: <i>Danio rerio</i> si:ch211-11c15.3 (si:ch211-11c15.3), miscRNA | R | |
| 1 | TC130302 | CX148957.s.om.10 | Cytadherence high molecular weight protein 3 | S | HMW3_MYCPN |
| 1 | TC130456 | BX082138.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Stannin (snn) | R | |
| 1 | TC130571 | BX871986.s.om.10 | WD repeat-containing protein 75 | S | WDR75_DANRE |
| 1 | TC130650 | CA342570.s.om.10 * | CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4 | S | CKLF4_HUMAN |
| 1 | TC130726 | CX259128.s.om.10 * | Homeobox protein Hox-A11a | S | HXABA_TAKRU |
| 1 | TC131337 | CA364638.s.om.10 | RING finger and transmembrane domain-containing protein 2 | S | RNFT2_MOUSE |
| 1 | TC131568 | CA370960.s.om.10 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2 | S | UB2E2_HUMAN |
| 1 | TC94766 | AJ242740.s.om.10 * | Estrogen receptor | S | ESR1_ONCMY |
| 1 | TC94846 | BX078879.s.om.10 | Transposable element Tc1 transposase | S | TC1A_CAEL |
| 1 | TC94953 | BX079372.s.om.10 | Myelin-associated glycoprotein | S | MAG_MOUSE |
| 1 | TC95245 | BX879335.s.om.10 | Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosyltransferase 1 | S | PMGT1_RAT |
| 1 | TC95515 | FP323574.s.om.10 | Neuronal migration protein doublecortin | S | DCX_MOUSE |
| 1 | TC95732 | BX889116.s.om.10 | PREDICTED: similar to CD81 molecule [<i>Ciona intestinalis</i>] | P | |
| 1 | TC96119 | BX088161.s.om.10 | PREDICTED: similar to reverse transcriptase-like protein [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>] | P | |
| 1 | TC96368 | CA344858.s.om.10 | Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial | S | HMGCL_BOVIN |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-------------------|---|-----|--------------|
| 1 | TC96901 | BX306154.s.om.10 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] | S | GPDA_TAKRU |
| 1 | TC97568 | CA357692.s.om.10 | Neuronal membrane glycoprotein M6-b | S | GPM6B_HUMAN |
| 1 | TC98030 | BX879863.s.om.10 | Glycolipid transfer protein domain-containing protein 2 | S | GLTD2_MOUSE |
| 1 | TC98191 | BX873553.s.om.10 | TLC domain-containing protein 1 | S | TLCD1_HUMAN |
| 1 | TC98498 | BX873532.s.om.10 | PREDICTED: <i>Danio rerio</i> chromodomain helicase DNA binding protein 2 (chd2), miscRNA | R | |
| 1 | TC98690 | CR369026.s.om.10 | PREDICTED: ubinuclein 2-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 1 | TC99228 | BX077264.s.om.10* | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B | S | EIF3B_BOVIN |
| 1 | TC99355 | CA344013.s.om.10 | Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 | S | IF4E2_MOUSE |
| 2 | TC100014 | BX080284.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide (atp7a) | R | |
| 2 | TC100451 | CX259899.s.om.10 | Beta-2-microglobulin | S | B2MG ICTPU |
| 2 | TC100635 | CX150424.s.om.10 | Iroquois-class homeodomain protein irx-1 | S | IRX1_XENTR |
| 2 | TC100927 | BX861129.s.om.10 | Protein FAM195A | S | F195A_HUMAN |
| 2 | TC101286 | CA353390.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> unc-119 homolog (un119) | R | |
| 2 | TC101292 | BX302744.s.om.10 | Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 | S | PAIP1_XENLA |
| 2 | TC101405 | CA354926.s.om.10 | Semaphorin-5A | S | SEM5A_HUMAN |
| 2 | TC101921 | BX306731.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Double-strand-break repair protein rad21 homolog (rad21) | R | |
| 2 | TC102210 | CA362402.s.om.10 | Apolipoprotein O | S | APOO_HUMAN |
| 2 | TC102389 | BX073478.s.om.10 | Phosphoglucomutase-2 | S | PGM2_MOUSE |
| 2 | TC102762 | CA362240.s.om.10 | Ceramide kinase | S | CERK1_HUMAN |
| 2 | TC103204 | CR363229.s.om.10 | Transcription elongation factor SPT4 | S | SPT4H_DANRE |
| 2 | TC103646 | BX875043.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Hormone-sensitive lipase (lips) | R | |
| 2 | TC103935 | BX300087.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Diamine acetyltransferase 2 (sat2) | R | |
| 2 | TC104558 | BX881955.s.om.10 | Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha | S | GNAI3_CAVPO |
| 2 | TC104718 | CA366431.s.om.10 | Micromal glutathione S-transferase 3 | S | MGST3_BOVIN |
| 2 | TC104771 | CA366431.s.om.10 | Micromal glutathione S-transferase 3 | S | MGST3_BOVIN |
| 2 | TC105061 | BX858112.s.om.10* | Glutaminyl-peptide cyclotransferase | S | QPCT_HUMAN |
| 2 | TC105213 | BX866313.s.om.10 | homeodomain leucine zipper [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 2 | TC105460 | BX076978.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> ADP-ribosylation factor-like protein 15 (arl15) | R | |
| 2 | TC105522 | CA367493.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Zinc transporter SLC39A11 (s39ab) | R | |
| 2 | TC105970 | BX876871.s.om.10 | Serine threonine-protein kinase ppk4 | S | |
| 2 | TC106274 | BX871121.s.om.10 | Cell division cycle-associated protein 7 | S | CDCA7_RAT |
| 2 | TC106626 | CX037626.s.om.10 | 5'-3' exoribonuclease 1 | S | XRN1_MOUSE |
| 2 | TC106920 | CA378108.s.om.10* | Prefoldin subunit 3 | S | PFD3_PONAB |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|---|-----|--------------|
| 2 | TC107185 | CA359859.s.om.10 * | Aspartate aminotransferase, mitochondrial | S | AATM_MOUSE |
| 2 | TC107253 | CA381945.s.om.10 | Probable glutamate receptor | S | GLRK_CHICK |
| 2 | TC108397 | BX299491.s.om.10 | Fructe-bisphosphate aldolase A | S | ALDOA_RABIT |
| 2 | TC108450 | CA382547.s.om.10 | Sialomucin core protein 24 | S | MUC24_RAT |
| 2 | TC108504 | BX083906.s.om.10 * | Angiopoietin-related protein 7 | S | ANGL7_HUMAN |
| 2 | TC109641 | CA356796.s.om.10 * | Zinc finger FYVE domain-containing protein 27 | S | ZFY27_PONAB |
| 2 | TC109682 | CA372433.s.om.10 | CD97 antigen | S | CD97_HUMAN |
| 2 | TC109746 | BX073670.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> RING finger protein 10 (rnf10) | R | |
| 2 | TC110063 | CA345443.s.om.10 * | Solute carrier family 22 member 2 | S | S22A2_RABIT |
| 2 | TC110657 | CX142780.s.om.10 * | 60S ribosomal protein L35a | S | RL35A_ICTPU |
| 2 | TC110974 | CA351971.s.om.10 * | Mitochondrial uncoupling protein 4 | S | UCP4_HUMAN |
| 2 | TC111105 | CR943862.s.om.10 * | CDP-diacylglycerol--initol 3-phosphatidyltransferase | S | CDIPT_MOUSE |
| 2 | TC112359 | CX257452.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> NaK ATPase alpha subunit isoform 2 (LOC100136182) | R | |
| 2 | TC112526 | BX314282.s.om.10 | Agmatinase, mitochondrial | S | SPEB_RAT |
| 2 | TC112757 | BX316995.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> GTP-binding protein era homolog (eral) | R | |
| 2 | TC113022 | CX260236.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 (ergi3) | R | |
| 2 | TC113523 | CA345448.s.om.10 * | COP9 signalome complex subunit 1 | S | CSN1_MOUSE |
| 2 | TC114267 | BX890490.s.om.10 | ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial | S | ABCB8_DANRE |
| 2 | TC114376 | CX251886.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> eukaryotic translation initiation factor 5 (eif5) | R | |
| 2 | TC115309 | CA343322.s.om.10 | Leucine-rich repeat-containing protein KIAA1731 | S | K1731_HUMAN |
| 2 | TC115703 | CU073683.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 2 | TC116269 | CA364431.s.om.10 | von Willebrand factor A domain-containing protein 5A | S | VMA5A_HUMAN |
| 2 | TC117179 | CX262031.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 2 | TC118895 | BX311489.s.om.10 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 | S | PSD13_HUMAN |
| 2 | TC118979 | CX718272.s.om.10 | Cytochrome P450 2D16 | S | CP2DG_CAVPO |
| 2 | TC119063 | BX311428.s.om.10 | Probable glutamyl-tRNA synthetase, mitochondrial | S | SYEM_CHICK |
| 2 | TC119196 | CX066153.s.om.10 | PREDICTED: reverse transcriptase-like protein-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>] | P | |
| 2 | TC119300 | BX318519.s.om.10 | Rab GDP dissociation inhibitor beta | S | GDIB_RAT |
| 2 | TC119705 | CX245973.s.om.10 | Transmembrane 7 superfamily member 3 | S | TM7S3_HUMAN |
| 2 | TC119806 | CA369214.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3 (ddx3) | R | |

| Cluster | TC ID | Contig Sigena | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|------------------------|--|-----|--------------|
| 2 | TC120361 | CA358587.s.om.10 | von Willebrand factor A domain-containing protein 5A | S | VMA5A_MOUSE |
| 2 | TC120772 | CA355090.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> Guanine nucleotide-binding protein alpha-13 subunit (gna13) | R | |
| 2 | TC120844 | CA347310.s.om.10 | Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein | S | PAIRB_MOUSE |
| 2 | TC121024 | BX086843.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Adiponectin receptor protein 1 (adr1) | R | |
| 2 | TC121481 | FYV3OTN01DCVJI.s.om.10 | 60S ribosomal protein L14 | S | RL14_MOUSE |
| 2 | TC121579 | CX248033.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Monoglyceride lipase (mgll) | R | |
| 2 | TC121922 | CA378183.s.om.10 | Plasminogen activator inhibitor 1 | S | PAI1_RAT |
| 2 | TC122355 | BX304977.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> calcium polyvalent cation receptor 3 (LOC100136912) | R | |
| 2 | TC122894 | BX872422.s.om.10* | Fatty acid synthase | S | FAS_CHICK |
| 2 | TC122959 | BX308384.s.om.10 | Glycine amidinotransferase, mitochondrial | S | GATM_BOVIN |
| 2 | TC123853 | BX078216.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Complement C1q-like protein 4 (c1ql4) | R | |
| 2 | TC124012 | BX078992.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Proline-rich protein 5 (prp5) | R | |
| 2 | TC126103 | CT564361.s.om.10 | Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial | S | ALDH2_RAT |
| 2 | TC126944 | FYV3OTN01A32QS.s.om.10 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | S | AN32A_DANRE |
| 2 | TC127922 | BX889308.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> Ribonuclease H2 subunit C (rnh2c) | R | |
| 2 | TC128215 | CA345917.s.om.10 | Guanidinoacetate N-methyltransferase | S | GAMT_DANRE |
| 2 | TC129170 | CA357753.s.om.10* | Ethanolamine kinase 1 | S | EKI1_HUMAN |
| 2 | TC129923 | BX081979.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Chitinase domain-containing protein 1 (chid1) | R | |
| 2 | TC129934 | CX253513.s.om.10 | Zinc finger protein 250 | S | ZN250_HUMAN |
| 2 | TC130007 | BX080384.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> ST2L protein-like (st2) | R | |
| 2 | TC130709 | CA371178.s.om.10 | BTB POZ domain-containing protein KCTD10 | S | |
| 2 | TC131376 | CA347174.s.om.10* | Transmembrane emp24 domain-containing protein 1 | S | TMED1_XENTR |
| 2 | TC94740 | AF287490.s.om.10 | BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7 | S | HA1B_BOVIN |
| 2 | TC96988 | BX315556.s.om.10* | PRELI domain-containing protein 1, mitochondrial | S | PRLD1_CHICK |
| 2 | TC97111 | BX869852.s.om.10 | Ribonucleases PMRP protein subunit POP1 | S | |
| 2 | TC97198 | FYV3OTN02I3VPX.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Gametogenetin-binding protein 2 (ggnb2) | R | |
| 2 | TC97881 | BX877264.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> transposase-like (LOC100194703) | R | |
| 2 | TC98011 | BX299360.s.om.10* | Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 | S | G3BP2_PONAB |
| 2 | TC98595 | BX301643.s.om.10* | Probable 28S ribosomal protein S10, mitochondrial | S | RT10_DANRE |
| 2 | TC99456 | BX074609.s.om.10 | H-2 class II histocompatibility antigen, A-R alpha chain | S | HA2R_MOUSE |

| Cluster | TC ID | Contig Sigena | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|----------------------------|--|-----|--------------|
| 2 | TC99981 | CA352338.s.om.10 * | Atlastin-3 | S | ATLA3_HUMAN |
| 3 | TC10009 | CA386190.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Collectrin (tmm27) | R | |
| 3 | TC101116 | BX299483.s.om.10 | Natterin-3 | S | NATT3_THANI |
| 3 | TC102223 | BX305636.s.om.10 | Dickkopf-related protein 4 | S | DKK4_HUMAN |
| 3 | TC102482 | BX076163.s.om.10 * | Neutrophil cytol factor 2 | S | NCF2_HUMAN |
| 3 | TC102801 | FYV3OTN01BSLOD.s .om.10 | Cysteine and histidine-rich domain- containing protein 1 | S | CHRD1_MOUSE |
| 3 | TC102997 | BX304102.s.om.10 * | INO80 complex subunit C | S | IN80C_MOUSE |
| 3 | TC103887 | BX298744.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 3 | TC104352 | BX308450.s.om.10 * | Probable proline racemase | S | PRCM_XENTR |
| 3 | TC105064 | BX861016.s.om.10 | WD repeat domain phosphoinide- interacting protein 2 | S | WIPI2_RAT |
| 3 | TC105176 | CA368191.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (tnr5) | R | |
| 3 | TC105192 | BX866308.s.om.10 * | Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | S | ACAD8_HUMAN |
| 3 | TC106040 | BX298495.s.om.10 | Protein FAM76B | S | FA76B_DANRE |
| 3 | TC107298 | BX863305.s.om.10 | Spartin | S | SPG20_BOVIN |
| 3 | TC107848 | CT572194.s.om.10 | Endonuclease domain-containing 1 protein | S | ENDD1_HUMAN |
| 3 | TC109302 | CA347545.s.om.10 | envelope protein [Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus] | P | |
| 3 | TC109819 | CA353708.s.om.10 | 40S ribosomal protein S8 | S | RS8_RAT |
| 3 | TC110210 | CA341936.s.om.10 | Serine threonine-protein kinase D3 | S | |
| 3 | TC110223 | CA373610.s.om.10 * | Tubulin polyglutamylase complex subunit 2 | S | TPGS2_RAT |
| 3 | TC110239 | CA372479.s.om.10 * | OX-2 membrane glycoprotein | S | OX2G_HUMAN |
| 3 | TC110786 | BX086608.s.om.10 | Histone-lysine N-methyltransferase SETD8 | S | SETD8_BOVIN |
| 3 | TC111693 | CU074150.s.om.10 | Zinc finger protein 585B | S | Z585B_HUMAN |
| 3 | TC111964 | BX869634.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> guanylate-binding protein (gbp) | R | |
| 3 | TC112056 | BX295314.s.om.10 | Charged multivesicular body protein 4c | S | CHM4C_DANRE |
| 3 | TC112650 | CA385169.s.om.10 | Sialin | S | S17A5_HUMAN |
| 3 | TC113437 | CX261062.s.om.10 | Retrovirus-related Pol polyprotein from transpon 297 | S | POL2_DROME |
| 3 | TC113621 | CA350235.s.om.10 | PREDICTED: similar to T-lymphocyte surface antigen precursor CD2 [<i>Gallus gallus</i>] | P | |
| 3 | TC113903 | BX084278.s.om.10 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2 | S | UBP2_HUMAN |
| 3 | TC114313 | BX913580.s.om.10 | Protein C-ets-2 | S | ETS2_CHICK |
| 3 | TC114335 | BX304795.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal (accn2) | R | |
| 3 | TC114462 | BX313593.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> heat shock protein 70a (hsp70a) | R | |
| 3 | TC114947 | BX859292.s.om.10 | Aryl hydrocarbon receptor | S | AHR_RAT |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------------|---|-----|--------------|
| 3 | TC115333 | BX074188.s.om.10 | Metalloproteinase inhibitor 2 | S | TIMP2_BOVIN |
| 3 | TC115891 | CA368218.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> TAP2a protein (tap2a) | R | |
| 3 | TC116261 | CX036379.s.om.10 * | E3 SUMO-protein ligase NSE2 | S | NSE2_RAT |
| 3 | TC116779 | BX297535.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> fast myotomal muscle troponin-T-1 (LOC100194658) | R | |
| 3 | TC117184 | BX910702.s.om.10 | Actin-related protein complex subunit 1A | S | |
| 3 | TC117236 | CX722037.s.om.10 | Fibroblast growth factor 12 | S | FGF12_RAT |
| 3 | TC117296 | CA348241.s.om.10 | C-X-C motif chemokine 9 | S | CXCL9_MOUSE |
| 3 | TC117469 | CA343026.s.om.10 | Zinc finger protein 135 | S | ZN135_HUMAN |
| 3 | TC118550 | BX877927.s.om.10 | Alpha-N-acetylgalactaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 | S | SIA7A_MOUSE |
| 3 | TC119018 | BX857790.s.om.10 | Death-associated protein kinase 2 | S | DAPK2_HUMAN |
| 3 | TC119538 | CX258116.s.om.10 | Interferon-induced guanylate-binding protein 1 | S | GBP1_CERAE |
| 3 | TC120767 | BX312657.s.om.10 | Gamma-glutamyl hydrolase | S | GGH_HUMAN |
| 3 | TC120958 | BX864112.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> cAMP-responsive element-binding protein-like 2 (crbl2) | R | |
| 3 | TC121162 | BX306157.s.om.10 | PREDICTED: <i>Danio rerio</i> Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1-like (LOC100149497) | R | |
| 3 | TC121419 | BX319897.s.om.10 | Radial spoke head protein 3 homolog | S | RSPH3_HUMAN |
| 3 | TC122143 | BX864809.s.om.10 | Protein FAM73A | S | FA73A_HUMAN |
| 3 | TC122147 | BX887699.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Septin-8 (sept8) | R | |
| 3 | TC122300 | CA358997.s.om.10 * | Lipid phosphatase-related protein type 3 | S | LPPR3_RAT |
| 3 | TC123127 | CA347331.s.om.10 | Syntaxin-2 | S | STX2_MOUSE |
| 3 | TC123188 | CA351614.s.om.10 | Acyl-CoA desaturase | S | ACOD_CYPCA |
| 3 | TC123519 | CA379989.s.om.10 * | Exocyst complex component 3-like protein 2 | S | EX3L2_HUMAN |
| 3 | TC123905 | CN211063.s.om.10 | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase | S | PIMT_DANRE |
| 3 | TC124117 | CA365024.s.om.10 | Biorientation of chromosomes in cell division protein 1 | S | BOD1_MOUSE |
| 3 | TC124570 | FYV3OTN01A0BNF.s. .om.10 | E3 SUMO-protein ligase NSE2 | S | NSE2_HUMAN |
| 3 | TC125703 | CU074003.s.om.10 | Proto-oncogene serine threonine-protein kinase m | S | |
| 3 | TC127003 | CA375410.s.om.10 | UPF0363 protein C7orf20 | S | CG020_HUMAN |
| 3 | TC128196 | F6VG15V01AUFY.s. .om.10 | <i>Salmo salar</i> Integral membrane protein GPR137 (g137a) | R | |
| 3 | TC128965 | BX086608.s.om.10 | Histone-lysine N-methyltransferase SETD8 | S | SETD8_BOVIN |
| 3 | TC129087 | CX143253.s.om.10 | DNA polymerase delta subunit 4 | S | DPOD4_BOVIN |
| 3 | TC129342 | CA370599.s.om.10 * | 60S ribosomal protein L32 | S | RL32_ICTPU |
| 3 | TC129612 | BX304102.s.om.10 * | INO80 complex subunit C | S | IN80C_MOUSE |
| 3 | TC129712 | CB494951.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 (acsl4) | R | |
| 3 | TC129760 | BX081555.s.om.10 | Kinesin-like protein KIF23 | S | KIF23_HUMAN |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|--|-----|--------------|
| 3 | TC131078 | CA352414.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (mprd) | R | |
| 3 | TC131752 | BX085088.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Transmembrane protein 149 (tm149) | R | |
| 3 | TC95959 | CA350896.s.om.10 * | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | S | EIF3I_DANRE |
| 3 | TC96036 | BX886919.s.om.10 * | Carboxymethylenebutenolidase homolog | S | CMBL_RAT |
| 3 | TC96086 | BX889344.s.om.10 * | Optic atrophy 3 protein homolog | S | OPA3_DANRE |
| 3 | TC96326 | BX858812.s.om.10 * | Putative uncharacterized protein C10orf122 | S | CJ122_HUMAN |
| 3 | TC97281 | CU074070.s.om.10 | ADP-ribylation factor-like protein 2-binding protein | S | AR2BP_DANRE |
| 3 | TC97810 | BX871009.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 3 | TC98184 | BX855812.s.om.10 | Coiled-coil domain-containing protein 66 | S | CCD66_HUMAN |
| 3 | TC98440 | BX074548.s.om.10 | DNA-directed RNA polymerases I, II and III subunit RPABC3 | S | RPAB3_MOUSE |
| 3 | TC98496 | BX084280.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> archease (arch) | R | |
| 3 | TC98864 | BX869873.s.om.10 | PREDICTED: dual specificity phosphatase 19-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 4 | TC100585 | CR372476.s.om.10 | RING finger protein 4 | S | RNF4_RAT |
| 4 | TC101018 | BX862823.s.om.10 | Tumor protein p63-regulated gene 1-like protein | S | TPRGL_RAT |
| 4 | TC101114 | BX306302.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Mps one binder kinase activator-like 1A (mol1a) | R | |
| 4 | TC101282 | CB490766.s.om.10 | Growth arrest-specific protein 6 | S | GAS6_RAT |
| 4 | TC102039 | CB496692.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Hormone-sensitive lipase (lips) | R | |
| 4 | TC102948 | CA344368.s.om.10 | PREDICTED: myelin basic protein isoform 3 [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 4 | TC103677 | CA351190.s.om.10 | Forkhead box protein L2 | S | FOXL2_PIG |
| 4 | TC104052 | BX073141.s.om.10 | Extracellular matrix protein 1 | S | ECM1_RAT |
| 4 | TC104088 | CA375803.s.om.10 | Ryanodine receptor 1 | S | RYR1_HUMAN |
| 4 | TC104378 | CX148467.s.om.10 | ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8 | S | IRK8_HUMAN |
| 4 | TC104548 | CA364214.s.om.10 | Uncharacterized protein C7orf30 | S | CG030_HUMAN |
| 4 | TC104550 | CA375452.s.om.10 * | Protein-tyrosine phosphatase-like member B | S | PTPLB_MOUSE |
| 4 | TC104646 | BX871650.s.om.10 | Cytochrome P450 19A1 | S | CP19A_ORYLA |
| 4 | TC104669 | CA380617.s.om.10 | WD repeat-containing protein 82 | S | WDR82_DANRE |
| 4 | TC106332 | BX302182.s.om.10 | GSK-3-binding protein | S | GBP_XENLA |
| 4 | TC106440 | BX081186.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Zona pellucida-like domain-containing protein 1 (zpld1) | R | |
| 4 | TC107141 | CX152572.s.om.10 | Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial | S | COQ5_DANRE |
| 4 | TC107353 | CA381612.s.om.10 | Cysteine-rich protein 2 | S | CRIP2_MOUSE |
| 4 | TC107973 | BX312536.s.om.10 * | Homeobox-containing protein 1 | S | HMBX1_MOUSE |
| 4 | TC108028 | BX319246.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>] | P | |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|--|-----|--------------|
| 4 | TC109252 | BX086156.s.om.10 | Anthrax toxin receptor 2 | S | ANTR2_HUMAN |
| 4 | TC109416 | BX087631.s.om.10 | Protein SFRS12IP1 | S | S12IP_DANRE |
| 4 | TC109626 | BX314453.s.om.10 * | Ubiquinone biynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial | S | COQ5_DANRE |
| 4 | TC109882 | CA375022.s.om.10 | Protein NDRG1 | S | NDRG1_BOVIN |
| 4 | TC110110 | CA355700.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> Toll-like-receptor (tlr) | R | |
| 4 | TC110354 | CA344311.s.om.10 | Parvalbumin beta 1 | S | PRVB1_SALSA |
| 4 | TC110393 | CR373565.s.om.10 | Tryptophan-rich protein | S | WRB_DANRE |
| 4 | TC110651 | CA344311.s.om.10 | Parvalbumin beta 1 | S | PRVB1_SALSA |
| 4 | TC111322 | BX304992.s.om.10 | Uncharacterized protein C15orf57 homolog | S | CO057_RAT |
| 4 | TC111944 | CX137658.s.om.10 | Gamma-crystallin M2 | S | CRGM2_CYPKA |
| 4 | TC113265 | BX320450.s.om.10 | SPARC-like protein 1 | S | SPRL1_COTJA |
| 4 | TC114500 | CA388257.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Sorting nexin-18 (snx18) | R | |
| 4 | TC114936 | BX889591.s.om.10 | UPF0687 protein C20orf27 homolog | S | CT027_MOUSE |
| 4 | TC115522 | BX085267.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> DNA replication complex GINS protein PSF3 (psf3) | R | |
| 4 | TC115913 | CX251129.s.om.10 | Extracellular matrix protein 1 | S | ECM1_RAT |
| 4 | TC116096 | BX304516.s.om.10 | Syntaxin-2 | S | STX2_HUMAN |
| 4 | TC118004 | CA347005.s.om.10 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial | S | PPIF_RAT |
| 4 | TC118200 | FP318948.s.om.10 | Iroquois-class homeodomain protein IRX- 5 | S | IRX5_MOUSE |
| 4 | TC118337 | BX075230.s.om.10 | Eukaryotic translation initiation factor 4E- binding protein 3-like | S | 4EB3L_DANRE |
| 4 | TC118633 | BX874543.s.om.10 | Transmembrane protein 79 | S | TMM79_RAT |
| 4 | TC119067 | CR376499.s.om.10 | hypothetical protein LOC541425 [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 4 | TC119329 | BX304891.s.om.10 | Noggin | S | NOGG_CHICK |
| 4 | TC119813 | CX245267.s.om.10 | Protein Shroom3 | S | SHRM3_HUMAN |
| 4 | TC120935 | CA359898.s.om.10 * | Glycyltransferase-like domain-containing protein 1 | S | GTDC1_DANRE |
| 4 | TC121669 | BX077479.s.om.10 | Cysteine and histidine-rich domain- containing protein 1 | S | CHRD1_DANRE |
| 4 | TC122237 | BX082519.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>] | P | |
| 4 | TC122539 | BX864293.s.om.10 * | Junctional adhesion molecule A | S | JAM1_HUMAN |
| 4 | TC122880 | BX313096.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Syntaxin-10 (stx10) | R | |
| 4 | TC123155 | CA347545.s.om.10 | envelope protein [Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus] | P | |
| 4 | TC123189 | BX912135.s.om.10 | PREDICTED: tetratricopeptide repeat domain 16-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 4 | TC124457 | BX083420.s.om.10 | Gamma-glutamyl hydrolase | S | GGH_HUMAN |
| 4 | TC125012 | CA367007.s.om.10 | Tubulin alpha-1 chain (Fragment) | S | TBA1_CHICK |
| 4 | TC125726 | CB494434.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> urotensin-I protein (urotensin-i) | R | |
| 4 | TC125861 | DV192898.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> urotensin-I protein (urotensin-i) | R | |
| 4 | TC126277 | BX317407.s.om.10 | Cell division cycle 5-like protein | S | CDC5L_BOVIN |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|---|-----|--------------|
| 4 | TC126534 | BX909224.s.om.10 | R3H domain-containing protein 1 | S | R3HD1_HUMAN |
| 4 | TC126540 | AY507927.s.om.10 | Forkhead box protein L2 | S | FOXL2_HUMAN |
| 4 | TC127468 | CB490766.s.om.10 | Growth arrest-specific protein 6 | S | GAS6_RAT |
| 4 | TC127725 | CD810961.s.om.10 | ETS-related transcription factor Elf-3 | S | ELF3_RAT |
| 4 | TC128022 | BX889910.s.om.10 | Epiphycan | S | EPYC_HUMAN |
| 4 | TC128505 | CB490766.s.om.10 | Growth arrest-specific protein 6 | S | GAS6_RAT |
| 4 | TC128739 | BX075016.s.om.10 * | Putative ferric-chelate reductase 1 | S | FRRS1_XENLA |
| 4 | TC129382 | AM259379.s.om.10 | Cytochrome P450 19A1 | S | CP19A_ORYLA |
| 4 | TC130706 | BX317661.s.om.10 | Janus kinase and microtubule-interacting protein 1 | S | JKIP1_HUMAN |
| 4 | TC130983 | BX874762.s.om.10 | SS complex subunit C | S | SOSSC_SALSA |
| 4 | TC131809 | CA350862.s.om.10 | Desmoplakin | S | DESP_HUMAN |
| 4 | TC95029 | FP323606.s.om.10 | Protein RD3 | S | RD3_MOUSE |
| 4 | TC95193 | BX085698.s.om.10 | Phenazine biynthesis-like domain-containing protein | S | PBLD_RAT |
| 4 | TC95359 | BX077457.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (dcam) | R | |
| 4 | TC95478 | BX079982.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Caveolin-3 (cav3) | R | |
| 4 | TC95563 | BX074064.s.om.10 * | Factor in the germline alpha | S | FIGLA_HUMAN |
| 4 | TC95697 | BX868104.s.om.10 | Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic | S | SYDC_PONAB |
| 4 | TC97121 | BX874204.s.om.10 | Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like protein 1 | S | PI5L1_BOVIN |
| 4 | TC97170 | BX867226.s.om.10 * | 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD+] | S | PGDH_MOUSE |
| 4 | TC97602 | BX073034.s.om.10 | Transposable element Tcb1 transposase | S | TCB1_CAEBR |
| 4 | TC97691 | BX878658.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Sulfate transporter (s26a2) | R | |
| 4 | TC98110 | BX310503.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Tumor-associated calcium signal transducer 2 (tacd2) | R | |
| 4 | TC98186 | BX087289.s.om.10 | F-box WD repeat-containing protein 2 | S | |
| 4 | TC98373 | BX080727.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> rhamnose binding lectin STL3 (stl3) | R | |
| 4 | TC98530 | BX073600.s.om.10 | Transgelin-2 | S | TAGL2_RAT |
| 4 | TC98658 | CA358600.s.om.10 | Dihydroorotate dehydrogenase, mitochondrial | S | PYRD_PONAB |
| 4 | TC98795 | BX088274.s.om.10 | Vitamin K-dependent protein S | S | PROS_BOVIN |
| 4 | TC99958 | CA342034.s.om.10 * | Iroquois-class homeodomain protein IRX-5 | S | IRX5_MOUSE |
| 5 | TC100259 | CA364741.s.om.10 | Complement receptor type 2 | S | CR2_HUMAN |
| 5 | TC100730 | CA387749.s.om.10 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] | S | GPDA_TAKRU |
| 5 | TC100956 | BX302211.s.om.10 | Putative transmembrane protein LOC100289255 | S | YQ041_HUMAN |
| 5 | TC100989 | BX298786.s.om.10 * | Small muscular protein | S | SMPX_HUMAN |
| 5 | TC102176 | CA353436.s.om.10 | Transgelin-3 | S | TAGL3_RAT |
| 5 | TC102980 | BX872126.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Stannin (snn) | R | |
| 5 | TC103687 | BX077265.s.om.10 | Angiopoietin-related protein 7 | S | ANGL7_HUMAN |
| 5 | TC108064 | CA343586.s.om.10 | OX-2 membrane glycoprotein | S | OX2G_HUMAN |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-------------------------|--|-----|--------------|
| 5 | TC108929 | CA370471.s.om.10 | FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6 | S | FGD6_HUMAN |
| 5 | TC109058 | BX087722.s.om.10 | EGF, latrophilin and seven transmembrane domain-containing protein 1 | S | ELTD1_HUMAN |
| 5 | TC110629 | CA343301.s.om.10 | Chemokine receptor-like 1 | S | CML1_MOUSE |
| 5 | TC111171 | CA366651.s.om.10* | G-protein coupled receptor 182 | S | GP182_HUMAN |
| 5 | TC111387 | CB498456.s.om.10 | Homeobox protein Nkx-3.2 | S | NKX32_HUMAN |
| 5 | TC111989 | FODLFKL01CA79J.s.om.10 | Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 | S | BGH3_PIG |
| 5 | TC112066 | CA374915.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Quinone oxidoreductase-like 1 (qorl) | R | |
| 5 | TC112270 | CA376792.s.om.10* | Carbonic anhydrase 6 | S | CAH6_HUMAN |
| 5 | TC113380 | GBPNQUD02H9CE9.s.om.10 | Astacin-like metalloendopeptidase | S | ASTL_COTJA |
| 5 | TC113991 | FYV3OTN02FKTKE.s.om.10 | Zinc finger protein SNAI2 | S | SNAI2_MOUSE |
| 5 | TC115721 | CX041280.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> heat shock protein 70a (hsp70a) | R | |
| 5 | TC116462 | BX084149.s.om.10 | Non-syndromic hearing impairment protein 5 homolog | S | DFNA5_HORSE |
| 5 | TC118327 | CA367457.s.om.10* | DENN domain-containing protein 2A | S | DEN2A_MOUSE |
| 5 | TC118364 | CA348027.s.om.10 | Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor-like protein | S | RERGL_DANRE |
| 5 | TC119168 | FYV3OTN01BFN9X.s.om.10 | Calsequestrin-1 | S | CASQ1_CHICK |
| 5 | TC122717 | BX076233.s.om.10 | Serine threonine-protein kinase mTOR | S | |
| 5 | TC122977 | CA373158.s.om.10* | Uncharacterized protein ML1136 | S | Y1136_MYCLE |
| 5 | TC124102 | BX879326.s.om.10 | Beta gamma crystallin domain-containing protein 3 | S | |
| 5 | TC124600 | CA385736.s.om.10 | CD97 antigen | S | CD97_HUMAN |
| 5 | TC129258 | CX140829.s.om.10* | BAG family molecular chaperone regulator 2 | S | BAG2_MOUSE |
| 5 | TC129518 | CX147891.s.om.10 | Krueppel-like factor 4 | S | KLF4_MOUSE |
| 5 | TC129540 | CA373746.s.om.10* | Serine protease hepsin | S | HEPS_HUMAN |
| 5 | TC129819 | CT572381.s.om.10 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 | S | MED8_MOUSE |
| 5 | TC130039 | BX867098.s.om.10* | T-box transcription factor TBX1 | S | TBX1_DANRE |
| 5 | TC132059 | FYV3OTN01AH CJ9.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> Indian hedgehog homolog b (ihhb) | R | |
| 5 | TC94754 | AF179894.s.om.10 | Cytochrome P450 11B, mitochondrial | S | CP11B_RANCA |
| 5 | TC94767 | AF091784.s.om.10 | Major histocompatibility complex class I-related gene protein | S | HMR1_RAT |
| 5 | TC95559 | BX312015.s.om.10* | Histamine N-methyltransferase | S | HNMT_HUMAN |
| 5 | TC95669 | CA344511.s.om.10 | Tyrine-protein kinase FRK | S | FRK_HUMAN |
| 5 | TC95791 | CA341654.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> prion-like protein (LOC100136172) | R | |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-------------------------|--|-----|--------------|
| 5 | TC95822 | FP319502.s.om.10 | Claudin-15 | S | CLD15_HUMAN |
| 5 | TC95846 | BX887972.s.om.10 * | Uncharacterized protein C1orf158 | S | CA158_HUMAN |
| 5 | TC96679 | CA366575.s.om.10 * | Neutrophil cytol factor 4 | S | NCF4_MOUSE |
| 5 | TC98195 | BX077265.s.om.10 | Angiopoietin-related protein 7 | S | ANGL7_HUMAN |
| 5 | TC98303 | BX873560.s.om.10 * | Transcription factor 23 | S | TCF23_HUMAN |
| 5 | TC99140 | CA363935.s.om.10 | BNIP2 motif-containing molecule at the C-terminal region 1 | S | BMCC1_HUMAN |
| 6 | TC101889 | CA351260.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Leukotriene A-4 hydrolase (lkha4) | R | |
| 6 | TC102018 | CB492541.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus] | P | |
| 6 | TC104673 | CA341719.s.om.10 * | Periodic tryptophan protein 2 homolog | S | PWP2_HUMAN |
| 6 | TC105270 | BX087043.s.om.10 * | Cysteine and glycine-rich protein 2 | S | CSRP2_MOUSE |
| 6 | TC106901 | CX140490.s.om.10 | Coiled-coil domain-containing protein 126 | S | CC126_HUMAN |
| 6 | TC107318 | CX252580.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 2 protein (herp2) | R | |
| 6 | TC108334 | BX300399.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> zinc-fingers and homeoboxes 2 (zhx2) | R | |
| 6 | TC109011 | CX244832.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Sorting nexin-18 (snx18) | R | |
| 6 | TC109140 | BX083336.s.om.10 | Tubulin alpha chain | S | TBA_TORMA |
| 6 | TC109261 | BX308613.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> heat shock protein 70a (hsp70a) | R | |
| 6 | TC113631 | BX087548.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Transmembrane protein 34 (tmm34) | R | |
| 6 | TC114803 | CX246552.s.om.10 | Rho GTPase-activating protein 15 | S | RHG15_CHICK |
| 6 | TC114885 | CA346704.s.om.10 * | DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 | S | RPA2_MOUSE |
| 6 | TC119446 | GD3412002GMU0 M.s.om.10 | WD repeat-containing protein 34 | S | WDR34_HUMAN |
| 6 | TC121049 | BX083336.s.om.10 | Tubulin alpha chain | S | TBA_TORMA |
| 6 | TC121834 | BX311011.s.om.10 | Signal recognition particle receptor subunit beta | S | SRPRB_MOUSE |
| 6 | TC124194 | CA361596.s.om.10 | Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4A | S | M4A4A_HUMAN |
| 6 | TC124342 | CA348390.s.om.10 | Ras-related protein Rab-1A | S | RAB1A_RAT |
| 6 | TC124481 | CA358831.s.om.10 | Parvalbumin alpha | S | PRVA_ESOLU |
| 6 | TC125684 | DV200830.s.om.10 | Beta-crystallin B1 | S | CRBB1_BOVIN |
| 6 | TC126813 | BX315756.s.om.10 * | Translation initiation factor IF-2, mitochondrial | S | IF2M_BOVIN |
| 6 | TC127484 | BX298442.s.om.10 | hypothetical protein BRAFLDRAFT_232052 [Branchiostoma floridae] | P | |
| 6 | TC94768 | AY523667.s.om.10 | Major histocompatibility complex class I-related gene protein | S | HMR1_HUMAN |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|------------------------|--|-----|--------------|
| 6 | TC94772 | AY523659.s.om.10 | BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-6 | S | HA1A_BOVIN |
| 6 | TC95890 | AY773715.s.om.10 | Ig mu chain C region membrane-bound form | S | MUCM_RABIT |
| 6 | TC97187 | BX313078.s.om.10 | T-complex protein 1 subunit theta | S | TCPQ_CHICK |
| 6 | TC98873 | BX297673.s.om.10 | T-complex protein 1 subunit theta | S | TCPQ_PONAB |
| 7 | TC100145 | CX145087.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Ras-related protein Rab-31 (rab31) | R | |
| 7 | TC100273 | CA349705.s.om.10 | Tumor necris factor receptor superfamily member 6B | S | TNF6B_HUMAN |
| 7 | TC100493 | BX302294.s.om.10 * | Glutamyl aminopeptidase | S | AMPE_PIG |
| 7 | TC100700 | BX872743.s.om.10 * | Leucine-rich repeat-containing protein 3B | S | LRC3B_DANRE |
| 7 | TC100991 | BX865257.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> SOX9 alpha2 (sox9) | R | |
| 7 | TC100996 | CA350359.s.om.10 | CD9 antigen | S | CD9_FELCA |
| 7 | TC101337 | CA361370.s.om.10 | hypothetical protein LOC561073 [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 7 | TC103240 | CR373289.s.om.10 | Cytochrome P450 2M1 | S | CP2M1_ONCMY |
| 7 | TC103260 | BX073998.s.om.10 | Radial spoke head-like protein 1 | S | RSHL1_XENTR |
| 7 | TC103383 | BX857812.s.om.10 | Mullerian-inhibiting factor | S | MIS_HUMAN |
| 7 | TC103949 | BX082066.s.om.10 | Protein LBH | S | LBH_CHICK |
| 7 | TC104016 | FYV3OTN01CCYQM.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> SLC26A1-like protein (LOC100136215) | R | |
| 7 | TC104932 | FP319032.s.om.10 | CD9 antigen | S | CD9_FELCA |
| 7 | TC105933 | CX137990.s.om.10 | Latrophilin-2 | S | LPHN2_HUMAN |
| 7 | TC106072 | BX888249.s.om.10 | Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1 | S | GBRA1_PONAB |
| 7 | TC106075 | BX312762.s.om.10 | Neuron navigator 1 | S | NAV1_MOUSE |
| 7 | TC107193 | CA349500.s.om.10 | Claudin-6 | S | CLD6_HUMAN |
| 7 | TC107566 | CF753016.s.om.10 | Pleckstrin homology domain-containing family A member 1 | S | PKHA1_MOUSE |
| 7 | TC107788 | BX320988.s.om.10 | Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 | S | LRP2_HUMAN |
| 7 | TC108315 | BX308211.s.om.10 * | DnaJ homolog subfamily C member 28 | S | DJC28_MOUSE |
| 7 | TC108812 | GD3412001ASD22.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> synaptotagmin Ia (syt1a) | R | |
| 7 | TC109287 | CB487851.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 7 | TC110632 | BX080518.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> akirin 1 (LOC100316864) | R | |
| 7 | TC110881 | CR364113.s.om.10 * | Gamma-aminobutyric acid receptor subunit delta | S | GBRD_HUMAN |
| 7 | TC111035 | BX885469.s.om.10 | C-factor | S | CSGA_MYXXA |
| 7 | TC111932 | CX258654.s.om.10 | Alpha-tectorin | S | TECTA_MOUSE |
| 7 | TC114297 | BX856196.s.om.10 | PREDICTED: MGC84670 protein-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 7 | TC114759 | BX080641.s.om.10 * | Protein FAM189A2 | S | F1892_HUMAN |
| 7 | TC115621 | CA380143.s.om.10 * | Thrombpondin-4-B | S | TSP4B_DANRE |

| Cluster | TC ID | Contig Siganae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|------------------------|---|-----|--------------|
| 7 | TC115838 | CA364073.s.om.10 | Xin actin-binding repeat-containing protein 2 | S | XIRP2_MOUSE |
| 7 | TC116130 | CA357000.s.om.10 | Poliovirus receptor-related protein 3-like | S | PVRL3_DANRE |
| 7 | TC116185 | CA354802.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (lamp1) | R | |
| 7 | TC116332 | CA380143.s.om.10 * | Thrombpondin-4-B | S | TSP4B_DANRE |
| 7 | TC118554 | CA342172.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Claudin domain-containing protein 1 (cldnd) | R | |
| 7 | TC118963 | CA351893.s.om.10 | Uncharacterized threonine-rich GPI-anchored glycoprotein PJ4664.02 | S | YHU2_SCHPO |
| 7 | TC119468 | CA348947.s.om.10 | Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles | S | TNNC1_CHICK |
| 7 | TC119631 | CA366247.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> matrix metalloproteinase (mmp) | R | |
| 7 | TC120716 | BX307865.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus] | P | |
| 7 | TC121034 | CX251662.s.om.10 | Transposable element Tcb2 transposase | S | TCB2_CAEBR |
| 7 | TC121811 | CA385894.s.om.10 | 60S ribosomal protein L22 | S | RL22_ICTPU |
| 7 | TC122344 | CX248602.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 (plcb3) | R | |
| 7 | TC122605 | CR370793.s.om.10 * | ATP-binding cassette sub-family G member 2 | S | ABCG2_RAT |
| 7 | TC123162 | BX861759.s.om.10 | Beta-crystallin A2 | S | CRBA2_CHICK |
| 7 | TC123415 | CA385736.s.om.10 | CD97 antigen | S | CD97_HUMAN |
| 7 | TC124158 | CA343763.s.om.10 * | Large proline-rich protein BAT3 | S | BAT3_MOUSE |
| 7 | TC125082 | CA345574.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Uridine 5-monophosphate synthase (pyr5) | R | |
| 7 | TC125228 | BX297726.s.om.10 | Iroquois-class homeodomain protein IRX-5 | S | IRX5_MOUSE |
| 7 | TC125267 | CB493630.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> vitellogenin receptor (LOC100136065) | R | |
| 7 | TC125779 | FYV3OTN01AHRPQ.s.om.10 | ATP-binding cassette sub-family A member 1 | S | ABCA1_HUMAN |
| 7 | TC126207 | CA354975.s.om.10 * | Popeye domain-containing protein 3 | S | POPD3_CHICK |
| 7 | TC127641 | CR374252.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> Acyl-coenzyme A thioesterase 8 (acot8) | R | |
| 7 | TC127679 | CR362803.s.om.10 | BTB POZ domain-containing protein 9 | S | |
| 7 | TC128546 | CX723182.s.om.10 | Cytochrome P450 2M1 | S | CP2M1_ONCMY |
| 7 | TC129845 | CA377628.s.om.10 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> Guanine nucleotide-binding protein GIGO gamma-12 subunit (gbg12) | R | |
| 7 | TC130561 | CX249915.s.om.10 | PREDICTED: selenoprotein M-like [<i>Danio rerio</i>] | P | |
| 7 | TC131275 | CX042625.s.om.10 | PREDICTED: hypothetical protein XP_002342505 [Homo sapiens] | P | |
| 7 | TC131327 | CA343670.s.om.10 | Neuron navigator 2 | S | NAV2_HUMAN |
| 7 | TC131334 | CA345450.s.om.10 | Transposable element Tcb1 transposase | S | TCB1_CAEBR |
| 7 | TC131595 | CX248648.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> DnaJ homolog subfamily C member 5 (dnjc5) | R | |

| Cluster | TC ID | Contig Sigenae | Annotation (nom de la protéine) | Réf | ID Swissprot |
|---------|----------|-----------------------|---|-----|--------------|
| 7 | TC131722 | CA357180.s.om.10 | <i>Salmo salar</i> 15.5 kDa protein (us420) | R | |
| 7 | TC131953 | CA343670.s.om.10 | Neuron navigator 2 | S | NAV2_HUMAN |
| 7 | TC94817 | DQ204869.s.om.10 * | Gap junction alpha-1 protein | S | CXA1_DANRE |
| 7 | TC95110 | AF361437.s.om.10 * | Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 | S | I13R2_HUMAN |
| 7 | TC95396 | CA353496.s.om.10 * | Insulin-like growth factor-binding protein 7 | S | IBP7_HUMAN |
| 7 | TC95560 | S72665.s.om.10 * | 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Delta 5-->4-isomerase | S | 3BHS_CANFA |
| 7 | TC95641 | BX875847.s.om.10 | Hydroxyindole O-methyltransferase | S | HIOM_CHICK |
| 7 | TC95856 | BX077656.s.om.10 | Sialoadhesin | S | SN_MOUSE |
| 7 | TC96342 | BX308899.s.om.10 | Cytochrome P450 2M1 | S | CP2M1_ONCMY |
| 7 | TC97374 | AF209095.s.om.10 | Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (Fragment) | S | DMRT1_CHICK |
| 7 | TC98018 | BX857659.s.om.10 | Growth arrest-specific protein 1 | S | GAS1_MOUSE |
| 7 | TC98436 | BX073998.s.om.10 | Radial spoke head-like protein 1 | S | RSHL1_XENTR |
| 7 | TC99403 | BX861469.s.om.10 | <i>Danio rerio</i> solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2b (slc1a2b) | R | |
| 7 | TC99688 | BX085837.s.om.10 | Phosphoglycerate mutase 2 | S | PGAM2_BOVIN |
| 7 | TC99999 | CA346498.s.om.10 * | Delta-like protein B | S | DLLB_DANRE |

II. ANNEXE 2 : POSTER PRÉSENTÉ AU "9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH" À COCHIN, INDE DU 9 AU 14 AOÛT 2011.

Masculinization in rainbow trout carrying the *mal* mutation is temperature sensitive

Valdivia K.⁽¹⁾, Jouanno E.⁽¹⁾, Mouroit B.⁽¹⁾, Quillet E.⁽²⁾, Guyomard R.⁽²⁾, Volff J-N.⁽³⁾, Galiana-Arnoux D.⁽³⁾, Cauty C.⁽¹⁾, Fostier A.⁽¹⁾ and Guiguen Y.⁽¹⁾

⁽¹⁾INRA, SCRIBE UR1037, Sex Differentiation and Oogenesis Group, Rennes, France⁽²⁾INRA, GABIE, Jouy-en-Josas France

⁽³⁾IGFL / ENS, Lyon, France.

yann.guiguen@rennes.inra.fr



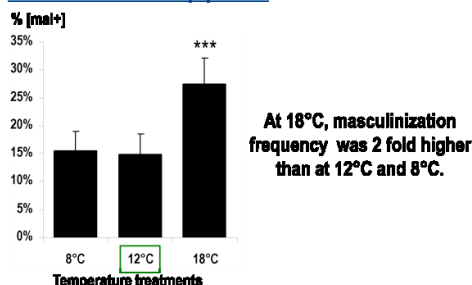
- Gonad masculinization of XX genetic females has been observed in rainbow trout
- This masculinization, which is due to a mutation called "mal", does not concern all individuals.
- External factors could be involved in this variability.
- We investigated the effect of temperature on masculinization of these animals.

Experimental design:

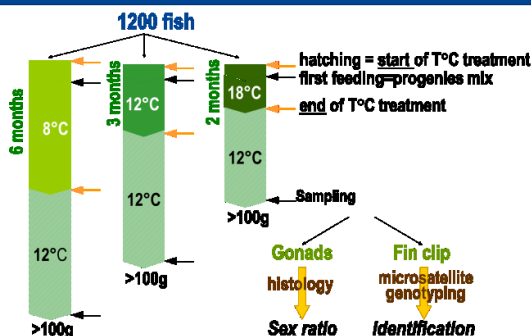
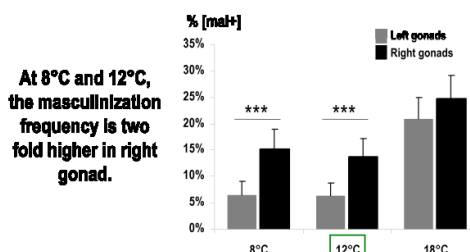
One XXmal male was crossed with 4 XXmal females and the 4 progenies (mal1 to mal4) were mixed at first feeding.

Gonads masculinization depends of the temperature level...

Masculinization in XXmal population:

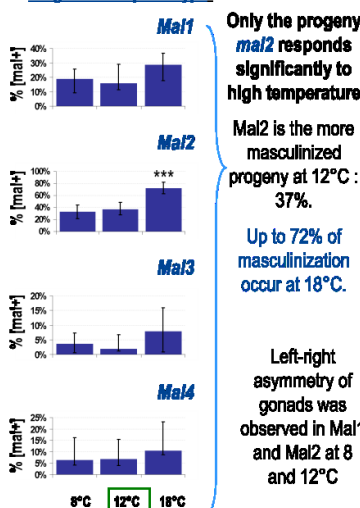


Right versus left gonad masculinization:

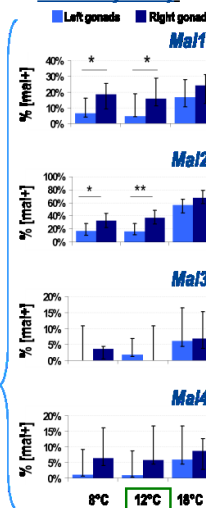


...and of the female parent genotype

Progenies sex phenotype:



Gonads asymmetry:



Masculinization of mal-carrying genotypic females:

- Increases with high temperature treatments applied during sex differentiation period
- Is more frequently observed in the right gonad than the left one at 8°C and 12°C
- Depends on the genotype of the female parent.

III. ANNEXE 3 : RÉSUMÉ POUR PRÉSENTATION ORALE AU « 6TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF VERTEBRATE SEX DETERMINATION » À KONA, HAWAII DU 23 AU 27 AVRIL 2012

Characterization of a masculinizing gonadal phenotype in female rainbow trout : gene expression profiles and implication of temperature

Valdivia K.¹, Jouanno E.¹, Mourot B.¹, Quillet E.², Guyomard R.², Volff J-N.³, Galiana-Arnoux D.³, Cauty C.¹, Fostier A.¹ and Guiguen Y.¹

¹INRA-SCRIBE, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France. Fax: 33 (0) 2 23 48 50 20 , email: karina.valdivia@rennes.inra.fr ²GABIE, INRA, Jouy-en-Josas France ; ³IGFL / ENS, Lyon, France.

Sex determination in rainbow trout is mainly genetic with a XX/XY monofactorial system. However, a maleness phenotype potentially induced by an unknown mutation named « *mal* », was recorded in some all-females (XX) families obtained by endomitotic gynogenesis [1]. This phenotype is quite complex as only some of these XX fish display a functional masculinization of their gonads with various masculinizing phenotypes ranging from a full masculinization of both gonads, to more discrete intersexual gonads with in some case a clear left-right asymmetry of gonadal masculinization [1,2]. To better understand this masculinizing phenotype, we characterized gene expression profiles during gonadal sex differentiation of these *mal*-carrying animals using a microarray approach. In addition as preliminary experiments on these *mal*-carrying families suggested that masculinization could be sensitive to water temperature, we investigated under controlled conditions whether low or high temperatures applied after hatching could affect the masculinization of different *mal*-carrying progenies.

For gene expression profiling all-females (XX) and all-males (XY) genetic control populations were compared to XX *mal*-carrying populations. Gonads from 30 to 100 animals were pooled from each population at different times during the sex differentiation period (53, 60, 71, 85, 98 and 113 days post fertilization or dpf). Global gene expression was analysed by hybridization of an Agilent rainbow trout microarray. Among the genes that were characterized as being differentially expressed in the XX *mal*-carrying animals, some were clearly indicative of the masculinization process as they displayed the same expression profile as in control males. However, the biggest difference was recorded in almost two-thirds of the differentially expressed genes that displayed a expression profile different from both control males and control females.

For the analysis of temperature effects on masculinization of the mal-carrying animals, oocytes from four different mal-carrying females were fertilized with sperm from one XX mal-carrying male (sex inverted by the mal mutation) and these eggs were kept separately at 10°C until hatching when there were mixed (100 animals from each progeny) before the application of the different temperature treatments. These temperature treatments started from hatching (30dpf) for different periods in order to compensate for the development heterogeneity: 6 months at 8°C, 3 at 12°C and 2 at 18°C. For each temperature condition left and right gonads were sampled separately from 9 to 12 months for histological determination of *sex-ratios*. A caudal fin clip was also sampled in each animal for parental assignation using microsatellite genotyping. These analysis showed that the highest temperature treatment (18°C) produced a significant and higher proportion of masculinization (28,3% at 18°C, 14,8% at 12°C and 15,9% at 8°C). This effect was even more pronounced in one of the four families studied in which the 18°C treatment induced a *two* fold increase of masculinization (72%) compared with 8°C and 12°C. These family differences could be explained by a "genetic parental effect" as previously described in Atlantic silverside [4], Nile tilapia [5] and Rainbow trout [6]. In agreement with previous observations in intersexual mal-carrying animals [2], the right gonads was shown to be more frequently masculinized in animals at 8°C and 12°C. However, at the 18°C this left-right asymmetry of masculinization was no more detectable.

In conclusion our results on gene expression indicate that the gonadal gene expression phenotype of these mal-carrying animals is much more complex than a simple masculinization of their transcriptome. We also clearly demonstrated that this masculinizing phenotype can be increase by high temperature with some family differences.

Reference List

- [1] Quillet E, Aubard G, Queau I. 2002. Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: detection and genetic analysis. *J Hered.* 93(2):91-9.
- [2] Quillet E, Labbe L, Queau I. 2004. Asymmetry in sexual development of gonads in intersex rainbow trout. *J Fish Biol.* 64(4):1147-51.
- [3] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology.* 165(3):352-66.
- [4] Conover DO, Kynard BE. 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science.* 213(4507):577-9.
- [5] Baroiller JF, D'Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 153(1):30-8.
- [6] Magerhans A, Horstgen-Schwark G. 2010. Selection experiments to alter the *sex-ratio* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. *Aquaculture.* 306(1-4):63-7.

IV. ANNEXE 4 :

VU :

Le Directeur de Thèse

(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,

Résumé

Chez les poissons téléostéens gonochoriques, les déterminismes du sexe sont soit environnementaux, soit génétiques avec une interaction possible entre ces 2 facteurs. La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, présente un déterminisme sexuel strictement génétique de type XX/XY. Cependant des masculinisations spontanées ont été observées chez des femelles génétiques (XX) obtenues par gynogénèse endomitotique. Ce phénotype « femelle masculinisée » n'affecte pas tous les animaux à l'état adulte et serait dû à une mutation appelée « mal » non caractérisée à ce jour. Afin d'identifier le gène causal porteur de cette mutation, une meilleure caractérisation de ce phénotype « femelle masculinisée » est nécessaire. Pour cela, nous avons caractérisé le phénotype gonadique de ces animaux porteurs de la mutation « mal » (XXmal) en utilisant à la fois des approches histologiques et moléculaires. Nos résultats montrent que l'ensemble des animaux XXmal présente une différenciation sexuelle très perturbée autant sur le plan histologique que sur le plan de leurs profils d'expression génique. Parmi ces perturbations, l'inhibition de l'expression du gène de l'aromatase gonadique, *cyp19a1a*, qui code pour une enzyme de synthèse des œstrogènes pourrait être un facteur explicatif de cette masculinisation des femelles XXmal. Nous avons aussi exploré l'influence de la température d'élevage, et démontré que des températures élevées (18°C) augmentent fortement la masculinisation de ces animaux XXmal. De façon inattendue nous avons aussi mis en évidence que la croissance de ces animaux XXmal était affectée négativement en particulier pour les animaux XXmal qui présentaient un phénotype masculinisé à l'état adulte.

L'ensemble de nos résultats indique que la masculinisation de ces animaux serait le résultat d'une dérégulation profonde en amont de la transcription du gène *cyp19a1a*, avec comme conséquence une instabilité précoce de la différenciation ovarienne suivie par la masculinisation effective d'une partie seulement des animaux XXmal. Cette instabilité de la différenciation ovarienne serait amplifiée par des températures élevées qui affecteraient à la fois le développement global des animaux XXmal et la transcription du gène *cyp19a1a*. Enfin nos résultats suggèrent fortement que le phénotype « mal » est plus complexe qu'un simple phénotype « femelle masculinisée ».

Mots clefs : poisson, masculinisation, mutation, température, poids corporelle.

Abstract

In gonochoristic teleost fish species, sex determination can be either environmental or genetic with potential interactions between these two sex determination systems. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has a strict genetic XX/XY sex determination system. However spontaneous masculinization has been observed in genetic females (XX) obtained through endomitotic gynogenesis. The "masculinized female" phenotype does not affect all adult animals and would be the consequence of an uncharacterized mutation named « mal ». In order to identify the causal gene harboring this mutation, a better characterization of this "masculinized female" phenotype is needed. We then characterized the gonadal phenotype of the animal carrying the « mal » mutation (XXmal) using both histological and molecular approaches. Our results show that all these XXmal animals have a highly disturbed sex differentiation based on results from histology and gene expression profiles. Among these perturbations the inhibition of the expression of ovarian form of aromatase gene, *cyp19a1a* encoding the enzyme needed for estrogen synthesis, could be an explanation for this masculinization of XXmal females. We also explored the effect of rearing temperatures, and demonstrated that high temperatures (18°C) strongly increase the masculinization of these XXmal animals. Surprisingly we also showed that the growth of these XXmal animals was negatively affected especially for those having an adult masculinized phenotype.

All together these results suggest that the XXmal masculinization is the result of a deep perturbation upstream from the transcription of *cyp19a1a* gene, with as consequence a precocious unstable ovarian differentiation followed by an active masculinization of only some of these XXmal animals. This precocious unstable ovarian differentiation would be amplified by high temperatures that would affect the development of the XXmal animals and the transcription of the *cyp19a1a* gene. Finally our results also suggest that the « mal » phenotype is more complex than a simple "masculinized female" phenotype.

Mots clefs : fish, masculinization, mutation, temperature, body weight.