

Régulation de la gamétogenèse et de sa perturbation en lien avec la tripoïdie chez l'huitre creuse Crassostrea gigas

Floriane Maillard

▶ **To cite this version:**

Floriane Maillard. Régulation de la gamétogenèse et de sa perturbation en lien avec la tripoïdie chez l'huitre creuse Crassostrea gigas. Reproduction sexuée. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC219 . tel-03709567

HAL Id: tel-03709567
https://theses.hal.science/tel-03709567

Submitted on 30 Jun 2022

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Régulation de la gamétogenèse et de sa perturbation en lien avec la tripoïdie chez l'huitre creuse Crassostrea gigas

Présentée et soutenue par
Floriane MAILLARD

Thèse soutenue le 29/06/2021 devant le jury composé de		
Mme CAROLINE FABIOUX	Maître de conférences HDR, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur du jury
Mme JULIA MORALES	Directeur de recherche, STATION BIOLOGIQUE de ROSCOFF	Rapporteur du jury
M. PIERRE BOUDRY	Directeur de recherche, IFREMER de PLOUZANE	Membre du jury
Mme Anne-Sophie MARTINEZ	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. JEAN-JACQUES LAREYRE	Directeur de recherche, Université Rennes 1	Président du jury
M. Christophe LELONG	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Christophe LELONG, Oestrogènes, reproduction, cancer (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

GERECA

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie et Biologie des Organismes – Populations – Interactions

Préparée au sein de Normandie Université

Régulation de la gamétogenèse et de sa perturbation en lien avec la triploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Présentée et soutenue par
Floriane MAILLARD

Thèse soutenue publiquement le 29 Juin 2021 devant le jury composé de		
Mme. Caroline FABIOUX	Maître de conférences HDR, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme. Julia MORALES	Directrice de recherche, Station Biologique de Roscoff	Rapporteur
M. Jean-Jacques LAREYRE	Directeur de recherche, INRAE de Rennes	Examinateur
M. Pierre BOUDRY	Directeur de recherche, Ifremer	Examinateur
Mme. Anne-Sophie MARTINEZ	Maître de conférences HDR, Université de Caen Normandie	Examinateur
M. Christophe LELONG	Maître de conférences HDR, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Christophe LELONG, laboratoire Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR BOREA)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE

BOREA Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques

Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE), dans l'Unité Mixte de Recherche Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques (UMR BOREA, MNHN, CNRS 7208, UPMC, IRD 207, UCN, UA), dans le laboratoire de l'Université de Caen Normandie.

Ces travaux de recherche ont été financés par la région Normandie dans le cadre du projet Biligncell et du RIN ECUME : Etude intégrée à multi-échelles d'écosystèmes côtiers.

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué, professionnellement ou personnellement à mes travaux de thèse.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude et ma sympathie à mon directeur de thèse, le Docteur Christophe Lelong qui m'a encadré au cours de mon stage de Master 2 ainsi que pour ces travaux de thèse. Ta très grande disponibilité, ton expertise scientifique, tes conseils et ta bienveillance m'ont été d'une aide précieuse. Merci pour la confiance que tu m'as accordée en me choisissant pour ce sujet de thèse. Je te remercie infiniment d'avoir été un directeur de thèse remarquable.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury, le Docteur Caroline Fabioux et la directrice de recherche Julia Morales d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse. Je remercie également Le directeur de recherche Jean Jacques Lareyre, le Directeur de recherche Pierre Boudry et le Docteur Anne Sophie Martinez d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel, les Professeurs Muriel Bardor et Michel Salzet, le Docteur Arnaud Huvet ainsi que la doctorante Adeline Clergé pour leur accompagnement au cours de ces travaux de thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire BOREA de Caen,

Tout d'abord, le Professeur Pascal Sourdaine et Docteur Céline Zatylny-Gaudin pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres de l'Equipe EMERGE pour m'avoir intégrée au sein de votre équipe et pour vos conseils avisés. Je remercie très chaleureusement le Docteur Anne Sophie Martinez pour son aide précieuse lors des nombreux échantillonnages, son expertise scientifique et ses conseils lors de nos collaborations. Merci, au Docteur Guillaume Rivière pour les discussions et ses conseils sur les mécanismes épigénétiques. Je tiens à remercier le docteur Kristell Kellner pour les discussions et ses conseils sur la technique de cytométrie en flux.

Je remercie Marie Pierre Dubos, ingénieure, pour ses conseils en biologie moléculaire.

Merci à Myriam Tayou, Catherine Eudes et Sylvia Forte pour leur aide et leur implication dans l'ensemble des démarches administratives.

Je remercie l'équipe technique, Sandra Sritharan et Fabienne Marais pour leur aide au quotidien ainsi que Christophe Roger pour son implication lors des sorties terrain. Je tiens à remercier particulièrement Béatrice Adeline, Mélanie Lepoittevin ainsi que Nadège Villain-Naud pour leur aide dans la réalisation des nombreuses coupes histologiques. Enfin, je remercie Bertrand Leroy pour sa bonne humeur communicative et pour nos nombreuses discussions aussi bien scientifiques que personnelles.

Je remercie l'ensemble des doctorants et post doctorants que j'ai pu rencontrer au laboratoire pour tous les bons moments : Louis, Charles, Quentin, Amélie, Maëva, Jérôme, Coralie, Léon, Baptiste.V, Alexandre, Maxime, Baptiste.H, Daniel, Emilie, Stéphanie, Christiane. Je remercie tout particulièrement Julie, la grande Aurore, la petite Aurore et Laura ; avoir partagé votre bureau a été un réel plaisir. Merci beaucoup les filles pour toutes ces discussions professionnelles et personnelles, les week-end partagés, pour les moments de rigolades passés ensemble et pour votre soutien. Un grand merci à Lorane, pour son soutien, son aide dans l'analyse des données bio-informatiques et pour avoir partagé avec moi tous ces bons moments en tant que collègues de bureau. Merci à Angela pour son humour hors pair et d'avoir partagé mes pauses cigarette.

J'exprime mes sincères remerciements à tous les membres extérieurs du laboratoire qui ont participé à la réalisation de ces travaux de thèse.

Au membres du Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABIO), le Docteur Didier Goux et le Docteur Nicolas Elie, pour leur disponibilité, leur expertise scientifique ainsi que leur aide précieuse lors de nos collaborations.

Un grand merci aux membres de la plateforme PROTOGEN, le Docteur Benoit Bernay pour ses conseils, son expertise scientifique et son implication dans l'obtention et l'analyse des données de spectrométrie de masse et à Julien Pontin pour son aide technique.

A Maryline Guillamin, technicienne sur le plateau cytométrie en flux du centre François Baclesse pour ses conseils techniques.

Je tiens à remercier infiniment mes parents, Sandrine et Franck pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Merci de m'avoir soutenu depuis le début de ces longues années d'étude.

Je remercie mon mari, Julien pour son soutien et ses encouragements lors de la réalisation de ces travaux de thèse.

Merci à Raphaël, mon petit garçon pour tout l'amour que tu me donnes au quotidien qui fait de moi une maman comblée.

Je terminerais ces remerciements par une pensée pour mon grand-père Christian, qui m'a donné le goût du « savoir » depuis mon plus jeune âge. Tu me manques, je pense que tu serais fier de ce que j'ai accompli.

Table des matières

Avant-propos *1*

Remerciements *2*

Liste des figures et tableaux *9*

Liste des abréviations *11*

I. L'huître creuse, Crassostrea gigas *14*

A. Le modèle biologique, *Crassostrea gigas* **14**

1. Position phylogénétique 14
2. Cycle de vie et anatomie de l'huître creuse 15

B. La reproduction de l'huître creuse **18**

1. Déterminisme sexuel et hermaphrodisme 18
2. Le développement et la structure gonadique 18
3. Le cycle de reproduction annuel 19

II. Polyploïdie *22*

A. Généralités **22**

B. La polyploïdie en aquaculture **24**

C. La triploïdisation chez l'huître creuse **25**

1. Les méthodes d'induction 25
2. Modifications des caractères reproducteurs induites par la triploïdie 27
   a) Diminution de l'allocation à la reproduction 27
   b) Perturbations de la gamétogenèse 28
   c) Perturbation de la ségrégation chromosomique 33
3. Triploïdie et déterminisme du sexe 33
4. Modification des performances de croissance et de survie 34
   a) Amélioration de la croissance 34
   b) Amélioration de la survie 36
5. Hétérosis et le gigantisme cellulaire 39
6. Réallocation énergétique 40
7. Interaction de la triploïdie avec la transmission des valeurs génétiques parentales 42

III. Objectifs de la thèse *43*

I. La division cellulaire *47*

A. Le cycle cellulaire **47**

B. La division mitotique **48**

C. La division méiotique **52**

II. Machinerie moléculaire du contrôle du cycle cellulaire *54*

A. Cyclines et kinases dépendantes des cyclines **54**

B. Protéolyses des protéines du cycle cellulaire **55**

C. Les points de contrôle 56

III. Les attachements kinétochore-microtubule et le fuseau 58

A. Les microtubules 58

B. Assemblage du fuseau 59

C. Attachement des kinétochores aux microtubules 61

IV. Le point de contrôle du fuseau (SAC ou Spindle Assembly Complex) 63

A. Transition métaphase-anaphase 63

B. Le SAC en mitose 64

C. Le SAC en méiose 65

V. Objectifs 66

VI. Résultats 69

A. Perturbations de la mitose et de la méiose associées à la triploïdie 69

B. Analyses cytogénétiques et transcriptomiques complémentaires. 97

1. Expression des acteurs du SAC dans la branchie au cours du cycle de gamétogénèse 97
2. Expression de facteurs impliqués dans les réparations des dommages à l'ADN 99
3. Analyse de la ploïdie des individus 100
   a) Caryotypes 101
   b) Cytométrie en flux 102

VII. Discussion 103

A. Les stratégies de reproduction des animaux triploïdes sont-elles associées à des états de ploïdie différents ? 103

B. Expression de facteurs impliqués dans les réparations des dommages à l'ADN 104

I. Introduction 109

A. Les régulations épigénétiques 109

B. La chromatine, support dynamique de l'information génétique 111

C. Les différents modifications épigénétiques 114

1. Modifications chimiques de l'ADN 114
2. Modifications épigénétiques des histones 115
   a) Acétylation des histones 116
   b) La méthylation des histones 117
   c) Autres modifications des histones 117
3. ARN non codants 118
   a) Les longs ARNs non codants 118
   b) Les microARN non codants 119

D. L'épigénétique chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* 119

II. Objectifs 120

III. Matériel et méthodes 121

A. Matériel biologique 121

B. Analyse protéomique globale dans l'aire gonadique d'huîtres mâles diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse 121

1. Extraction des protéines totales 121
2. Analyse LC-MS/MS 122
   a) Généralités appliquées à l'analyse protéique 122
   b) Préparation des échantillons pour une analyse de type nanoLC-MS/MS (nano Liquid Chromatography-MS/MS) 123
   c) Analyses fonctionnelles 124

C. Quantification de la méthylation totale de l'ADN 124

1. Extraction de l'ADN génomique 124
2. Mesure du statut global de méthylation de l'ADN 124

IV. Résultats 125

A. L'analyse protéomique globale dans l'aire gonadique d'huîtres diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse mâle 125

1. Analyses des échantillons 125
2. Quantification des protéines identifiées 128

B. Quantification de la méthylation totale dans l'aire gonadique mâle d'huîtres diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse 135

V. Discussion 137

I. Introduction 146

A. Notion d'effort de reproduction 146

B. Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la reproduction 147

C. Covariation des traits physiologiques 150

D. Modifications des caractères reproducteurs induites par la triploïdie. 150

E. Influence des facteurs environnementaux sur la croissance des huîtres triploïdes 151

II. Objectifs 152

III. Résultats 153

A. Etude de la gamétogenèse et de l'effort reproducteur des huîtres diploïdes et triploïdes en conditions environnementales contrastées 153

1. Suivi de la gamétogenèse des individus diploïdes et triploïdes à Cricqueville en Bessin en 2018 .. 153
   a) Etude du sex-ratio 154
   b) Etude du cycle gamétogenétique 155
2. Etude de la gamétogenèse et des capacités reproductives des huîtres diploïdes et triploïdes à Cricqueville en Bessin et Géfosse, deux sites contrastés en 2019 157
   a) Etude du sex-ratio 158
   b) Etude du cycle gamétogenétique 159
   c) Etude de l'effort de reproduction 163
   d) Influence des facteurs environnementaux 165

B. Etude de la croissance d'individus diploïdes et triploïdes en conditions environnementales contrastées en 2019 167

IV. Discussion 193

Conclusion générale et perspectives 196

I. Le tissu gonadique chez les huîtres triploïdes 197

II. Régulations de la spermatogenèse des huîtres triploïdes beta 198

III. Régulations de la spermatogenèse des huîtres triploïdes alpha 199

IV. Régulation de la gamétogenèse et de la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta par les facteurs environnementaux 201

Bilan et perspectives 203

Annexes 204

Bibliographie 239

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Arbre phylogénétique représentant la divergence entre les Protostomiens et les Deutérostomiens..... 15
Figure 2: Cycle de développement du mollusque bivalve, l'huître creuse *Crassostrea gigas* 16
Figure 3: Anatomie du mollusque bivalve, l'huître creuse adulte *Crassostrea gigas* débarrassée de la valve droite. 17
Figure 4 : Organisation générale de l'aire gonadique chez l'huître creuse adulte mâle au stade de prolifération des cellules germinales (stade 1)..... 19
Figure 5: Coupes histologiques transversales d'aire gonadique d'huître creuse *Crassostrea gigas* colorées au trichrome de Prenant-Gabe 21
Figure 6 : Caryotypes à partir des cellules branchiales d'huître creuse, *Crassostrea gigas* diploïde..... 25
Figure 7: Protocoles d'induction de la triploïdie ou de la tétraploïdie au regard de la fécondation d'animaux diploïdes..... 27
Figure 8: Coupe histologique transversale d'un tubule gonadique au stade 1 de prolifération des cellules germinales d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, triploïde mâle beta..... 29
Figure 9 : Coupes histologiques transversales d'aire gonadique d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* triploïdes femelle et mâle..... 32
Figure 10 : Evolution des concentrations de sucres totaux et du glycogène dans la chair des huîtres creuses *Crassostrea gigas*..... 41
Figure 11 : Schéma général du cycle cellulaire..... 47
Figure 12 : Déroulement du cycle cellulaire eucaryote et préparation à la mitose..... 51
Figure 13 : Schéma de la ségrégation chromosomique lors des méioses I et II 52
Figure 14 : Phases du cycle cellulaire et leurs contrôles. 55
Figure 15: Points de contrôle du cycle cellulaire 57
Figure 16 : Structure d'un microtubule 58
Figure 17 : Structure du fuseau mitotique au cours de la métaphase 59
Figure 18 : Le centrosome (centre organisateur des microtubules cellulaires) 61
Figure 19 : Représentation schématique du fuseau mitotique et des chromosomes en métaphase 63
Figure 20 : Recrutement des protéines du SAC et inhibition de l'APC/C^{Cdc20}..... 65
Figure 21 : Description schématique du déroulement de la spermatogenèse chez l'huître creuse diploïdes (2n) et hypothèses sur les régulations mises en jeu chez triploïdes (3n) alpha et beta 67
Figure 22 : Analyse transcriptionnelle de MAD2A, MIS12, CDC20, BUB3 et RAD21 par PCR quantitative dans la branchie et la gonade d'huîtres diploïdes et triploïdes mâles au cours du cycle gamétogénétique 98
Figure 23: Analyse transcriptomique de rad1, rad51b et rad51..... 100
Figure 24 : Caryotypes obtenus à partir de cellules branchiales d'huître creuse diploïdes et triploïdes observés au microscope optique photonique après coloration au Giemsa. 102
Figure 25 : Analyse de la ploïdie des cellules branchiales d'un individu diploïde et triploïde obtenue par cytométrie en flux. 103
Figure 26 : Organisation de compactions successives de la chromatine nucléaire..... 112
Figure 27 : Mécanismes épigénétiques impliqués dans la modulation de l'expression de gènes..... 113
Figure 28 : Méthylation de l'ADN sur le carbone 5 d'un résidu cytosine..... 114
Figure 29 : Modifications post-traductionnelles des histones chez les Mammifères 116
Figure 30 : Diagrammes de Venn représentant le recouvrement des protéines identifiées en spectrométrie de masse dans les gonades mâles d'huîtres diploïdes et triploïdes (alpha et beta) au cours de la gamétogenèse 126
Figure 31 : « Heat map » des niveaux d'expression des protéines différentiellement exprimées dans les gonades mâles d'huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta au stade 1 de prolifération des cellules germinales 129
Figure 32 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes alpha par rapport aux huîtres diploïdes après l'analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales)..... 133

Figure 33 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes beta par rapport aux huîtres diploïdes après analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales)..... 134
Figure 34 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes alpha par rapport aux huîtres triploïdes beta après analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales)..... 135
Figure 35 : Quantification de la méthylation de l'ADN dans l'aire gonadique d'huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3na: alpha et 3nb: beta) mâles au cours de la gamétogenèse 136
Figure 36 : Mesure de l'effort reproducteur à partir d'une coupe histologique transversale d'huître creuse, *Crassostrea gigas* colorée au trichrome de Prenant Gabe..... 147
Figure 37 : Evolution de l'occupation gonadique d'huîtres creuses issues d'un même lot et soumises à trois modalités de conditionnement contrastées 149
Figure 38 : Description de l'échantillonnage des individus diploïdes et triploïdes réalisé à Cricqueville en Bessin (Normandie, France) de décembre 2017 à septembre 2018. 154
Figure 39 : Sex-ratio des individus diploïdes (2n) et triploïdes (3n) échantillonnés de décembre 2017 à septembre 2018. 155
Figure 40 : Evolution de la gamétogenèse chez les individus diploïdes et triploïdes mâles (A) et femelles (B) au cours du cycle gamétogénétique en 2018, déterminée par histologie sur des coupes transversales de coupes gonadiques 156
Figure 41: Localisation des deux sites expérimentaux Normands (France), Cricqueville en Bessin (Concession expérimentale de l'Université de Caen Normandie) et Géfosse (Concession expérimentale de l'IFREMER, Baie des Veys)..... 158
Figure 42 : Sex-ratio des huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3n) sur les sites de Cricqueville en Bessin et Géfosse (Normandie, France) en 2019..... 159
Figure 43 : Répartition des huîtres triploïdes alpha et beta en fonction du sexe et du site d'étude..... 160
Figure 44 : Evolution de la gamétogenèse des huîtres diploïdes femelles et mâles situés sur les sites de Géfosse (gauche) et Cricqueville (droite) de janvier à septembre 2019 161
Figure 45 : Evolution de la gamétogenèse des huîtres triploïdes femelles et mâles situés sur les sites de Géfosse (gauche) et Cricqueville (droite) de janvier à septembre 2019 162
Figure 46 : Mesure de l'effort de reproduction à partir de coupes transversales d'huîtres mâles diploïdes et triploïdes sur les sites de Cricqueville en Bessin et Géfosse au cours du cycle de gamétogenèse 164
Figure 47 : Suivis mensuels des facteurs environnementaux : température journalière moyenne (°C) (A), salinité (‰) (B) et production primaire ($mg.L^{-1}$) (estimée par la concentration en chlorophylle a) (C) à Cricqueville en bessin de janvier à septembre 2018 et 2019..... 166
Figure 48 : Bilan des voies putatives impliquées dans l'altération de la spermatogenèse chez les huîtres triploïdes alpha et beta 201

Tableau 1 : Performance de croissance de différentes espèces d'huîtres triploïdes 36
Tableau 2 : Tableau des études comparant la résistance aux maladies des différentes espèces d'huîtres diploïdes et triploïdes..... 38
Tableau 3 : Résumé des différentes conceptions de l'épigénétique, de leurs définitions, des domaines de recherche concernés et des problèmes qu'elles tentent de résoudre. 110

Liste des abréviations

2n : diploïde

3n : triploïde

5-mC : 5-méthyl-Cytosine

6-DMAP : 6-Diméthylaminopurine

ADNg : ADN génomique

APC/C : Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome

ASF1 : Anti-Silencing Function 1

Bub1, Bub2 et Bub3 : Budding Uninhibited by Benomyl

BubR1 : Budding uninhibited by Related Benomyl 1

CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1

CCAN : Constitutive Centromere Associated Network

Cdc20 : Cell division cycle 20

CDK : Cyclin Dependant Kinases

Cep57 : Centrosomal protein 57

Chk 1 et 2 : Checkpoint kinase

CpG : Cytosine phosphate Guanine

CSPP1 : Centrosome and Spindle Pole-associated Protein 1

DDC : DNA Damage Checkpoint

DDX : Putative ATP-dependent RNA helicase

DNMT : DNA MethylTransferases

DTT : Dithiothreitol

GASP : Gel-Aided Sample Preparation

GDP : Guanosine Diphosphase

GOA : Gene Ontologie Annotation

GTI : Gonadal Tubul Index

GTP : Guanosine Triphosphate

HAT : Histones Acétylases

HDAC : Histones Désacétylases

HMT : Histones Méthytransférases

HP1BP3 : Heterochromatin Protein 1-Binding Protein 3 DNA topoisomerase I

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LFQ : Label Free Quantification

LincRNAs : Long intervening/intergenic non coding RNA

LncRNA : Long non coding RNA

LSD : Lysine Specific histone Demethylase

MAD 1 et 2 : Mitotic Arrest Deficient

MeDIP-seq : Methylated DNA ImmunoPrecipitation Sequencing

miARN : microARN

MSH4 et 5 : MutS Homologs

MTOC : MicroTubule Organizing Complex

NCAPD3 : Condensin-2 complex subunit D3

PKMTs : Protein Lysine Methyltransferase

PRC1 : Protein Regulator of Cytokinesis 1

PRDM9 : PR/SET Domain 9

PRMTs : Protein Arginine Methytransferase

SAC : Spindle Assembly Checkpoint

SAH : S-Adénosyl-Homocystéine

SAM : S-Adénosyl-Méthionine

SCF : Skp1, Culling1, F-box

SMC : Structural Maintenance of Chromosomes

TIMSTOF-Pro : Trapped Ion Mobility Spectrometry – Time of Flight

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography

XIC : Extracted Ion chromatogram

γTURC : γ-Tubulin Ring Complex

Introduction générale

I. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

A. Le modèle biologique, *Crassostrea gigas*

1. Position phylogénétique

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, également appelée huître du Pacifique ou huître japonaise a été décrite par Thunberg en 1793. Cette espèce a été introduite massivement en France entre 1971 et 1975 pour remplacer l'élevage de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* (Grizel et Héral, 1991), pour reconstituer le parc ostréicole français décimé suite à des épizooties virales consécutives de type Iridovirus chez *C. angulata* (Comps et Bonami, 1977). Les bonnes performances de croissance, le succès du captage sur la côte atlantique ainsi qu'une bonne résistance aux infections virales et parasitaires ont permis d'en faire un organisme d'intérêt économique dans le milieu de l'aquaculture (Grizel et Héral, 1991), plaçant la France au premier rang européen avec plus de 125 000 tonnes produites en 2015-2016 (Comité National de la Conchyliculture). Du fait de son importance économique, une bonne maitrise de la production est nécessaire. Il est donc indispensable de développer nos connaissances sur la physiologie, notamment sur la régulation de sa gamétogenèse pour l'amélioration de sa reproduction, mais aussi son développement et sa croissance.

L'huître creuse, est un mollusque, de la classe des bivalves, de l'ordre des filibranches et de la famille des Ostréidés. Elle appartient au clade des Lophotrochozoaires, regroupé avec les Ecdysozoaires dans le groupe des Protostomiens (groupe frère des Deutérostomiens) (Figure 1). Les Lophotrochozoaires se caractérisent par une couronne ciliée autour de la bouche appelé le lophophore et présentant une larve trochophore d'où leur nom (Giribet, 2008). L'étude des Lophotrochozoaires est importante phylogénétiquement en comparaison avec les données disponibles de la majeure partie des organismes modèles étudiés chez les deux autres groupes d'animaux à symétrie bilatérale : les Ecdysozoaires et les Deutérostomiens. Les Deutérostomiens forment un grand groupe modèle en raison de la présence des Vertébrés au sein de ce groupe. Le clade des Ecdysozoaires est bien documenté grâce à la présence en autres des Arthropodes et Nématodes dont les 2 grandes espèces modèles sont respectivement la drosophile, *Drosophila melanogaster* et le nématode, *Caenorhabditis elegans* (Figure 1). Par contre, le clade des Lophotrochozoaires reste peu documenté malgré sa diversité et ses récentes avancées en matière de génomique.

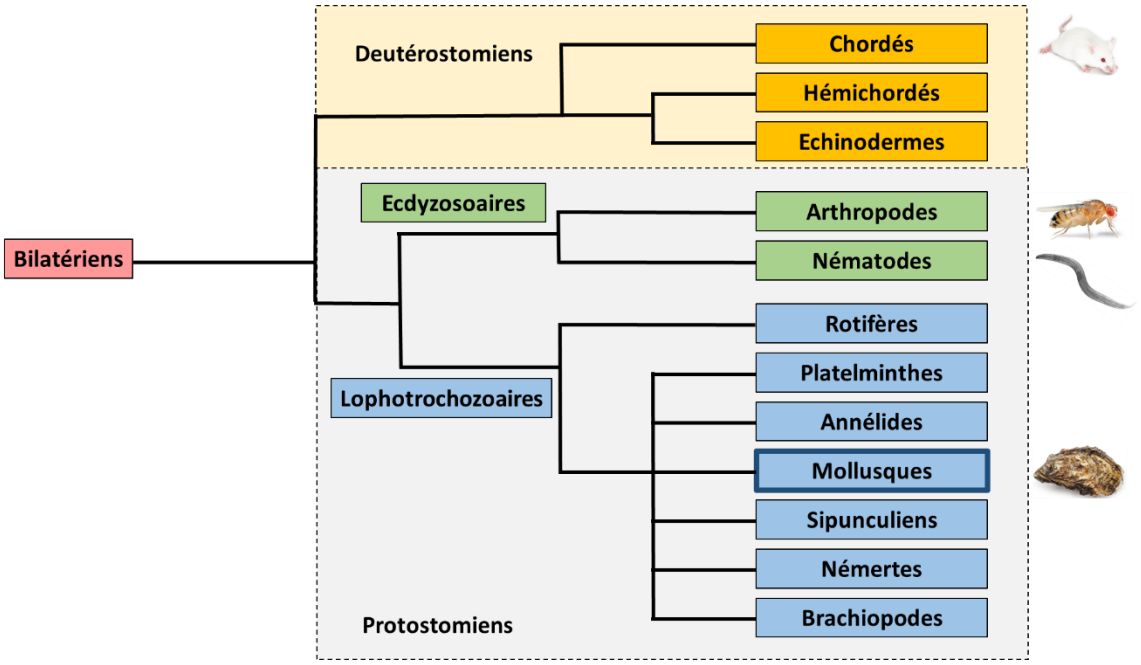


Figure 1: Arbre phylogénétique représentant la divergence entre les Protostomiens et les Deutérostomiens. Le groupe des Protostomiens (en gris) se divise en deux clades, les Ecdyzosoaires (vert) et les Lophotrochozoaires (bleu). Le groupe des Deutérostomiens est représenté en jaune.

2. Cycle de vie et anatomie de l'huître creuse

Le cycle de vie de l'huître creuse comporte deux phases distinctes, une phase larvaire pélagique et une phase adulte benthique (Figure 2). Après la fécondation suite à l'émission des gamètes dans la colonne d'eau, les embryons donnent rapidement naissance à des larves trochophores (16 à 18h après la fécondation). La larve trochophore est une larve nageuse en forme de toupie avec des groupes de cils au niveau apical et en couronne périphérique. Une première ébauche de coquille se développe caractérisée par une forme de « D » (24 à 48h après la fécondation), la larve est alors qualifiée de larve D. Puis deux valves minéralisées se mettent en place, la larve est appelée véligère à umbo (7 jours après la fécondation) puis œillée (14 jours après la fécondation). Le tractus digestif se met en place et devient progressivement fonctionnel, la larve commence à se nourrir. Le velum se développe permettant la locomotion, la respiration ainsi que l'alimentation. La phase pélagique a une durée moyenne de vingt jours selon les conditions de nourriture et de température. A la fin de cette phase, le développement du pied appelé stade pédiveligère (14-20 jours après la fécondation) permet aux larves d'aller se fixer

au substrat pour aller commencer leur métamorphose. La métamorphose marque le début de la phase benthique, les juvéniles et adultes sont fixés à des substrats meubles ou durs en zone intertidale ou infralittorale (Figure 2). L'huître creuse vit dans des milieux soumis à une très forte variabilité spatiale et temporelle pour ses paramètres biotiques et physico-chimiques. Cette hétérogénéité des conditions du milieu s'accompagne d'une plasticité phénotypique importante lui permettant de vivre dans de nombreuses régions du monde.

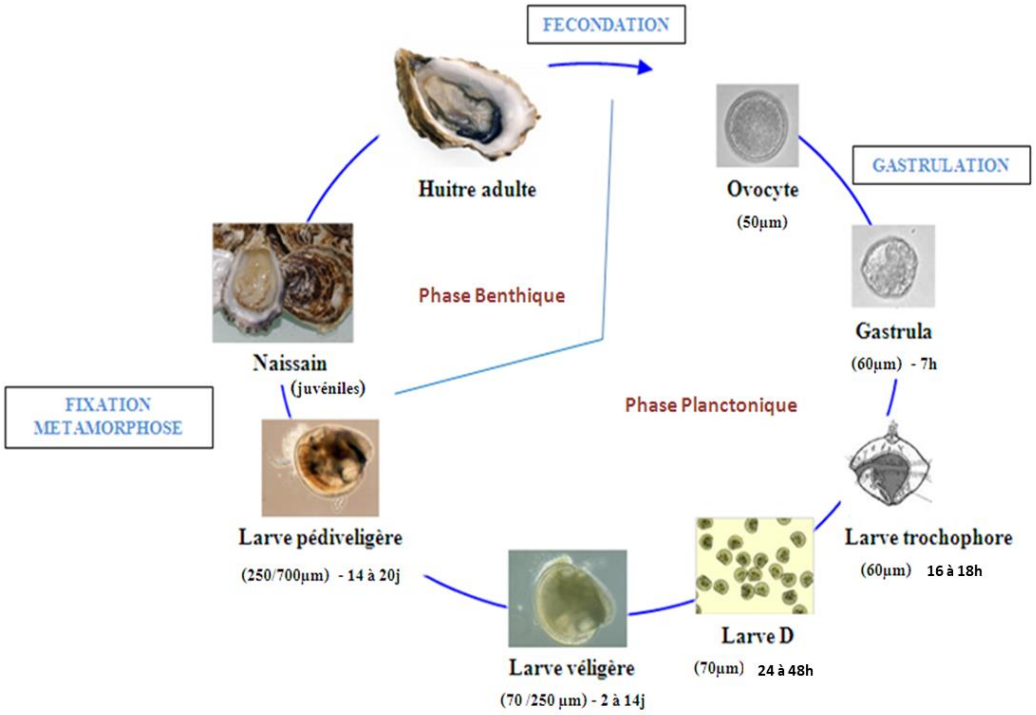


Figure 2: Cycle de développement du mollusque bivalve, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Le développement embryonnaire, puis larvaire est exprimé en jours depuis la fécondation (j) Adapté de (Fleury, 2009).

L'anatomie de l'huître creuse (Figure 3) est semblable à celle de l'huître américaine *Crassostrea virginica*, décrite par Galtsoff (1964). Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimé latéralement et renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques reliées entre elles par un ligament élastique et fermées par un puissant muscle adducteur postérieur. La coquille se compose de trois couches : une couche externe, le periostracum formé de protéines tannées non minéralisées, une couche intermédiaire composée de carbonate de calcium reposant sur une matrice protéique de conchyoline et d'une couche interne formée de cristaux d'aragonite en empilements horizontaux qui donne la nacre.

Le corps de l'animal est composé de différents organes, enveloppés par un autre organe, le manteau, délimitant la cavité interne, appelée cavité palléale. La partie antérieure du manteau forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche. Les huîtres sont acéphales, la bouche et les palpes labiaux sont les seuls vestiges de la partie céphalique. Le système digestif se compose de la bouche, l'œsophage, l'estomac, la glande digestive, l'intestin, le rectum et l'anus. La fonction de respiration est assurée par deux paires de branchies lamellaires. En plus de leur rôle dans la fonction de respiration, elles participent à la fonction de nutrition, leurs filaments ciliés créant un courant d'eau permanent qui assure un apport en oxygène et l'approvisionnement en particules alimentaires. Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Il est composé de vaisseaux et de sinus cœlomiques. Le cœur comporte un ventricule et deux oreillettes et est situé dans une cavité péricardique en avant du muscle adducteur postérieur. Il a pour rôle de pomper le liquide circulant appelé l'hémolymphe vers la masse viscérale de l'animal et le muscle adducteur dans lequel le système veineux la recrute afin de la conduire vers les branchies et le rein. Le système d'excrétion est assuré par le rein, situé sous le muscle adducteur postérieur au niveau de la zone péricardique. Le système reproducteur comprend l'aire gonadique, constituée de tubules gonadiques, le tissu conjonctif vésiculeux et du tissu de réserve permettant le stockage de glycogène. La gonade se développe autour de la glande digestive. La structure de l'aire gonadique varie fortement au cours du cycle de reproduction de l'huître.

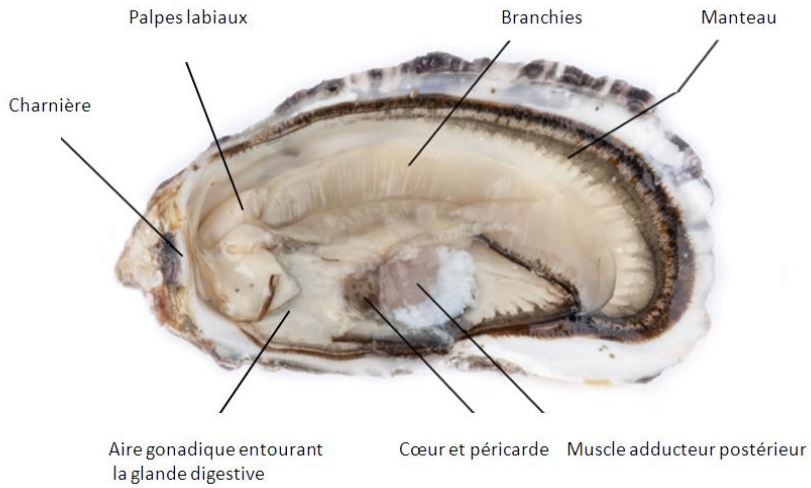


Figure 3: Anatomie du mollusque bivalve, l'huître creuse adulte *Crassostrea gigas* débarrassée de la valve droite.

B. La reproduction de l'huître creuse

1. *Déterminisme sexuel et hermaphrodisme*

L'huître creuse est un hermaphrodite successif irrégulier, souvent cité comme protandre ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors de la première saison de reproduction puis des changements de sexe alternent ensuite de façon irrégulière chez un même individu au cours des cycles suivants. Cependant, certains travaux invalident cette hypothèse de protandrie (Guo et al., 1998, Broquard et al., 2020). Une faible proportion d'individus (fréquence relative de moins de 1%) présentent un hermaphrodisme simultané avec des cellules germinales mâles et femelles dans la gonade chez *Crassostrea gigas* (Guo et al., 1998; Steele et Mulcahy, 1999; Normand et al., 2009; Broquard et al., 2020). Le déterminisme sexuel dépend de la combinaison de l'expression de facteurs génétiques (Naimi et al., 2009a, 2009b) et de l'effet de facteurs environnementaux (Guo et al., 1998). Cependant, ces facteurs génétiques et environnementaux restent peu étudiés, la faible connaissance cytogénétique et la variation du sex ratio au cours des cycles de reproduction sont des handicaps à la compréhension du déterminisme sexuel.

2. *Le développement et la structure gonadique*

La gonade de l'huître creuse adulte est un organe mixte, constitué de glandes génitales acineuses paires ramifiées dont les prolongements s'imbriquent dans le tissu conjonctif vésiculeux. Elle se développe autour de la glande digestive. Les tubules gonadiques s'anastomosent à leur extrémité pour former les canaux évacuateurs ou gonoductes qui débouchent dans la cavité palléale de l'animal (Devauchelle et al., 1998) (Figure 4). Chez l'huître creuse, le premier développement gonadique a lieu dès la première année de vie des animaux. En zone tempérée, le cycle annuel de reproduction de l'huître débute en hiver pour se terminer en été lorsque la maturité sexuelle est atteinte. Lors de la phase de maturité sexuelle, le développement de la gonade est tel qu'elle devient l'organe le plus volumineux de l'animal. La structure de la gonade varie fortement au cours du cycle de reproduction et se développe à chaque cycle de reproduction, puis régresse après l'émission des gamètes. La gamétogenèse se déroule de façon centripète au sein des tubules gonadiques, depuis l'épithélium germinal jusqu'à la lumière centrale. Le diamètre des tubules gonadiques augmente de façon proportionnelle avec la prolifération et la maturation des cellules germinales. Le développement

du tissu conjonctif vésiculeux est inversement corrélé à la progression de la gamétogenèse, où les réserves énergétiques sont mobilisées au cours du cycle gamétogénétique afin de soutenir l'effort de reproduction de l'animal (Berthelin et al., 2000). Une fois la maturité sexuelle atteinte, les gamètes sont émis dans le milieu extérieur depuis les canaux évacuateurs. Après la ponte, les gamètes non émis sont résorbés par phagocytose par les hémocytes s'infiltrant dans l'aire gonadique. Pendant la période de repos sexuel, un faible nombre de cellules germinales souches persistent dans les tubules gonadiques résiduels et celles-ci prolifèreront lors de l'initiation d'un nouveau cycle de reproduction au cours de l'hiver suivant.

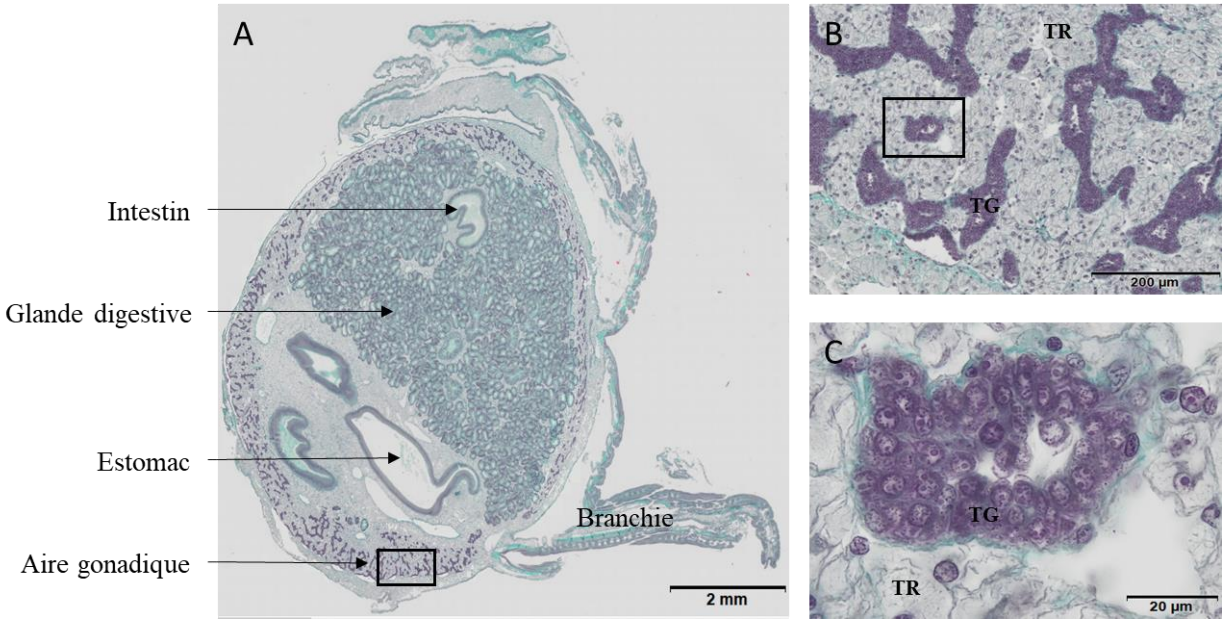


Figure 4 : Organisation générale de l'aire gonadique chez l'huître creuse adulte mâle au stade de prolifération des cellules germinales (stade 1). Photo d'une coupe histologique transversale complète d'huître colorée au trichrome de Prenant-Gabe (A) L'aire gonadique est un tissu mixte composée de tubules gonadiques (TG) et de tissu de réserve (TR) (B et C) (Images personnelles).

3. Le cycle de reproduction annuel

Le cycle de reproduction de l'huître creuse suit un rythme saisonnier qui se caractérise par une succession de quatre stades principaux (Figure 5) (Berthelin et al., 2000).

Le stade 0 ou de repos sexuel correspond à une phase quiescente. Il se déroule de l'automne et perdure jusqu'au début de l'hiver. Au cours de ce stade, les tubules gonadiques sont très peu développés et contiennent un faible nombre de cellules germinales précoces et

cellules somatiques intragonadiques. Le sexe phénotypique de l'animal n'est pas identifiable (Franco et *al.,* 2008).

Le stade I se déroule de l'hiver jusqu'au début du printemps. Il est caractérisé par la prolifération des cellules germinales souches qui se différentient en gonies de type spermatogonies ou ovogonies. Chez les mâles, deux types de spermatogonies sont identifiables : les spermatogonies de type I avec un noyau central clair de grande taille et les spermatogonies de type II, présentant un noyau plus sombre et plus petit. Chez les femelles, les ovogonies présentent un noyau de grande taille et un nucléole bien visible. Les tubules gonadiques grossissent progressivement mais restent peu invasifs dans l'aire gonadique. Le tissu de réserve est reconstitué et forme un réseau conjonctif dense qui occupe la majeure partie de l'aire gonadique.

Le stade II a lieu au cours du printemps. Il correspond à la différenciation des cellules germinales entrainant un fort développement des tubules gonadiques en dépit du tissu de réserve qui régresse progressivement. Chez le mâle, les spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires qui entrent en méiose pour donner successivement les spermatocytes secondaires puis les spermatides et enfin les spermatozoïdes. Chez la femelle, les ovogonies se différencient en ovocytes primaires qui entrent en méiose mais restent bloqués en prophase I. Ces ovocytes entrent ensuite en vitellogenèse, ce qui se traduit par une augmentation du volume de leur cytoplasme.

Le stade III se déroule à la fin du printemps début de l'été. Il correspond au stade de maturité sexuelle, la gonade atteint alors son volume maximal. Ce stade est subdivisé en 3 phases principales. Lors du stade IIIA, les tubules gonadiques sont constitués exclusivement de cellules germinales matures, des spermatozoïdes chez les mâles et des ovocytes matures pédonculés chez les femelles. Le tissu de réserve a entièrement régressé. S'en suit le stade IIIB qui correspond à l'émission des gamètes dans le milieu extérieur. Les gamètes sont acheminés depuis les tubules gonadiques vers les canaux génitaux localisés au niveau de la surface de l'aire gonadique. Les gamètes sont ensuite transportés jusqu'au gonoducte grâce aux mouvements des cils des cellules épithéliales des canaux évacuateurs et à partir duquel ils seront émis. Selon les conditions environnementales, la ponte peut être nulle, partielle ou complète. Le stade IIIC est valable uniquement pour les individus ayant une ponte partielle. En effet, certains animaux sont capables de ré-initier une nouvelle gamétogenèse aboutissant à une seconde émission de gamètes. Enfin, le stade IIID, correspond à la régression des tubules

gonadiques suite à la dernière ponte et à la lyse des gamètes résiduels non émis par des hémocytes qui envahissent la gonade. Ce stade conduira progressivement l'animal au stade 0 de repos sexuel.

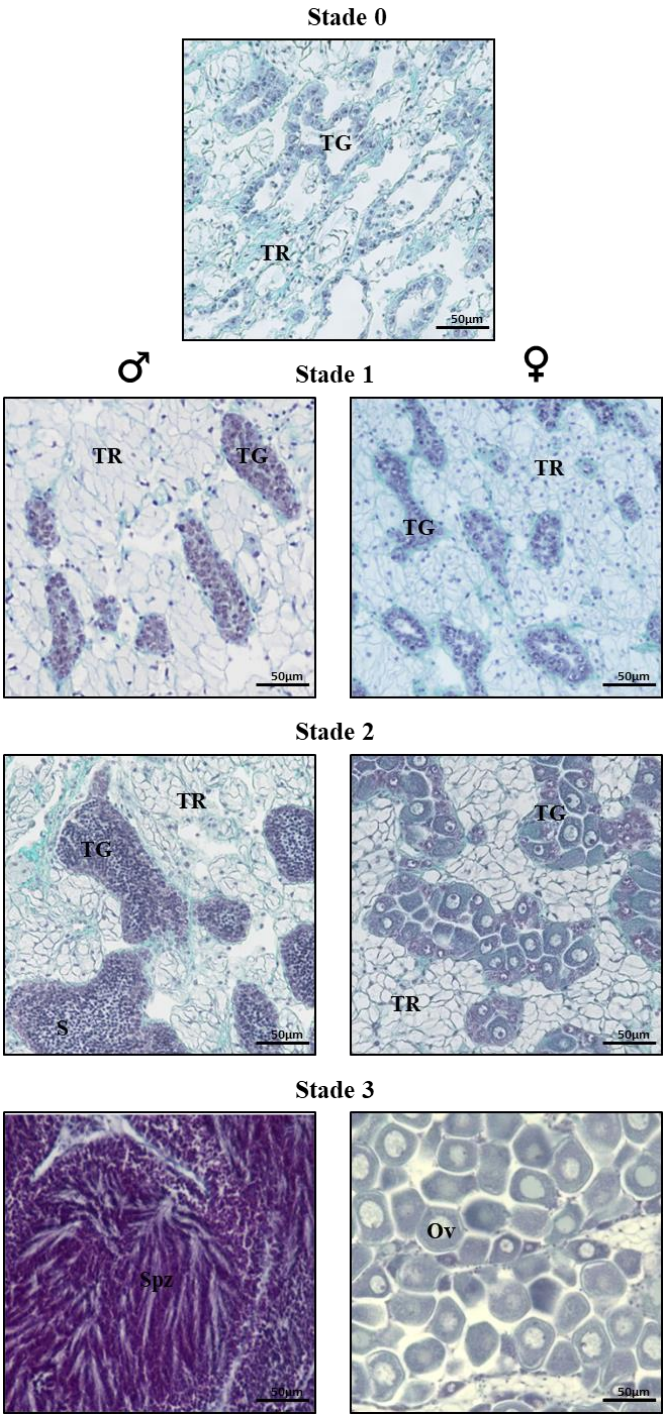


Figure 5: Coupes histologiques transversales d'aire gonadique d'huître creuse *Crassostrea gigas* colorées au trichrome de Prenant-Gabe. La figure comprend l'ensemble des stades de gamétogenèse (stades 0 à 3) chez le mâle (gauche) et chez la femelle (droite). TG : tubule gonadique ; TR : tissu de réserve ; S : spermatide ; Spz : spermatozoïde ; Ov : Ovocyte mature (Images personnelles).

II. Polyploïdie

A. Généralités

Le terme polyploïde qualifie les individus ou les cellules qui présentent plus de deux lots haploïdes de chromosomes (Comai, 2005). La polyploïdie a été décrite chez de nombreux organismes eucaryotes comme les plantes (Ramsey et Schemske, 1998), les animaux (Orr, 1990; Mable et al., 2011), les champignons (Albertin et Marullo, 2012) ou encore chez la levure (Kellis et al., 2004). A l'exception des poissons et des amphibiens, ces événements sont rarement retrouvés chez les animaux (Otto, 2007) alors que la polyploïdisation est un phénomène récurrent chez les végétaux (Mable et al., 2011). L'apparition de la polyploïdie induit chez les espèces des bouleversements physiologiques qui se traduisent par une variation du phénotype polyploïde comparé au diploïde (Otto et J, 2000; Comai, 2005; Otto, 2007). A l'échelle évolutive, cette innovation permettrait des phénomènes de spéciation rapide sous l'action de la sélection. Des études menées chez les végétaux montrent qu'après l'apparition de la polyploïdie, les lignées subissent quelques générations d'instabilité physiologique caractérisées par une forte variabilité phénotypique (Ramsey et Schemske, 1998; Comai, 2005) au cours desquelles la sélection agit pour ne conserver que les génotypes les plus adaptés. S'ils évitent l'extinction, les nouveaux polyploïdes entraineraient un processus de diploïdisation de leur génome au cours duquel la redondance des gènes serait progressivement diminuée, à travers l'acquisition de nouvelles fonctions (Comai, 2005). L'apparition de la polyploïdie au sein d'un groupe se traduirait par une augmentation du potentiel adaptatif en conditions naturelles ce qui pourrait leurs conférer un avantage sélectif à court et à long termes et sous certaines conditions (Otto et J, 2000; Comai, 2005; Otto, 2007).

Plusieurs types de polyploïdes sont distingués selon les éléments qui sont à leur origine. On distingue les autopolyploïdes au sein desquels des génomes provenant d'une même espèce sont juxtaposés et donc sont composés de plusieurs jeux de chromosomes homologues et les allopolyploïdes comportant des jeux de chromosomes issus de deux espèces différentes ou plus. Cependant les allopolyploïdes ne se forment qu'entre espèces étroitement apparentées. Chez les espèces allopolyploïdes les différents jeux de chromosomes ne sont que partiellement homologues (homéologues) et non parfaitement homologues, à la différence des autopolyploïdes (Comai, 2005). Chez les végétaux de nombreuse espèces cultivées sont autopolyploïdes c'est le cas de la pomme de terre, de la canne à sucre ou encore de la luzerne.

On trouve également des espèces cultivées allopolyploïdes : le coton, le blé, le tabac ou l'arachide (Chen et al., 2007). En plus des deux types de polyploïdies constitutives, on trouve également chez certains organismes des cellules endopolyploïdes. Ces cellules sont définies par un contenu génomique supérieur à la lignée germinale et qui résulte généralement de cycles de réplication en l'absence de mitose (Comai, 2005). Ce type de cellules est retrouvé chez les végétaux mais, par exemple, également chez la Daphnie, *Daphnia lumholtzi* (Neiman et al., 2017).

L'induction de la polyploïdie altère de nombreux processus biologiques fondamentaux dont l'expression est dépendante du nombre de chromosomes (effet de dosage chromosomique). Ainsi, les mécanismes de division cellulaire, mitose et méiose (Gregory, 2001), l'organisation du génome et le niveau d'expression des gènes (Birchler et al., 2007) montrent des perturbations chez les individus polyploïdes. Celles-ci sont probablement responsables des divergences phénotypiques observées entre les individus diploïdes et polyploïdes. La polyploïdie « impaire » (3n, 5n …) semble être un facteur aggravant pour la régulation des effets de dosage chromosomique (Otto et J, 2000; Comai, 2005; Otto, 2007). La triploïdie est létale chez les mammifères, elle réduit fortement la viabilité chez le poulet (Thorne et al., 1991). Elle a été induite expérimentalement avec succès chez plusieurs espèces de poissons, d'amphibiens et de mollusques (Swarup, 1959; Purdom, 1972; Allen et Stanley, 1978) mais entraine généralement la stérilité des individus.

Dans le contexte de l'amélioration génétique des populations d'élevage, l'induction de la polyploïdie permet de générer des modifications du phénotype qui entraine un meilleur rendement de production. La majorité des espèces végétales cultivées sont polyploïdes, sélectionnées grâce à leurs performances de rendement, de résistance, de taille et de qualité du fruit (Paterson, 2005). C'est le cas, par exemple, de la pomme de terre (Marks, 1966) et du manioc (Sreekumari et al., 1999) où le gigantisme des tubercules chez les polyploïdes a été sélectionné pour augmenter les capacités de production. L'induction de la triploïdie permet également la production de fruits sans pépins ce qui améliore la valeur gustative et donc marchande de ces produits (McCuistion et Elmstrom, 1994; Vandenhout et al., 1995). Enfin chez de nombreuses espèces d'intérêts aquacoles (poissons, mollusques et crustacés), l'investissement énergétique dans la gamétogenèse est souvent important et impacte négativement les performances biologiques, notamment la croissance, la survie et les qualités organoleptiques (Piferrer et al., 2009). Pour surmonter ce problème, l'induction de la triploïdie

chez ces espèces entraine généralement une stérilité des individus ce qui provoque l'amélioration du rendement de production.

B. La polyploïdie en aquaculture

Pour améliorer les performances de production des espèces de poissons et de mollusques, de nombreuses techniques génétiques sont employées en aquaculture telles que la sélection de lignées pour des caractères d'intérêts, la transgenèse, l'utilisation d'hybrides interspécifiques et l'induction de la polyploïdie (Hulata, 2001). Cependant chez les mollusques, peu d'études ont été réalisées sur la sélection des lignées pour augmenter les performances d'élevage (Sheridan, 1997; Boudry et al., 2004). A l'heure actuelle, chez ces espèces, la technique la plus employée en aquaculture est l'induction de la triploïdie. Cette méthode consiste à induire un lot supplémentaire de chromosomes par différentes méthodes qui seront développées dans le paragraphe suivant. Le matériel génétique d'une huître creuse diploïde est composé de dix paires de chromosomes (Leitão et al., 1999, 2001; Bouilly et al., 2005) (Figure 6). Chez l'huître triploïde, les paires sont remplacées par des triplets, elles possèdent ainsi 30 chromosomes. Cette technique augmente de façon significative les performances d'élevage, nécessite peu de manipulation et génère un fort potentiel d'amélioration des traits physiologiques des individus (Piferrer et al., 2009). La triploïdisation induit chez toutes les espèces aquacoles une réduction importante du développement gonadique (Kiyomoto et al., 1996; Felip et al., 2001; Maldonado-Amparo et al., 2004). En fonction des environnements d'élevage, la triploïdie peut entrainer une amélioration de la croissance et de la survie des individus grâce à une réallocation énergétique. L'énergie consacrée à la gamétogenèse chez les individus triploïdes est entièrement disponible pour la croissance. C'est le cas chez plusieurs espèces de mollusques. Chez la moule, *Mytilus edulis,* une augmentation significative de la croissance a été mesurée chez les individus triploïdes par rapport aux diploïdes dès la première année sur des sites à fort potentiel de croissance (le poids sec des individus triploïdes est 29,21% supérieur à celui des individus diploïdes) et dès la deuxième année sur des sites à faible potentiel de croissance (le poids sec des individus triploïdes est 34,16% supérieur à celui des individus diploïdes) (Brake et al., 2004). Chez le pétoncle *Argopecten ventricosus*, les individus triploïdes présentent un poids total 28% supérieur à celui des individus diploïdes ; cette augmentation du poids total des individus se traduit par une augmentation significative du poids du muscle adducteur (Ruiz-Verdugo et al., 2000).

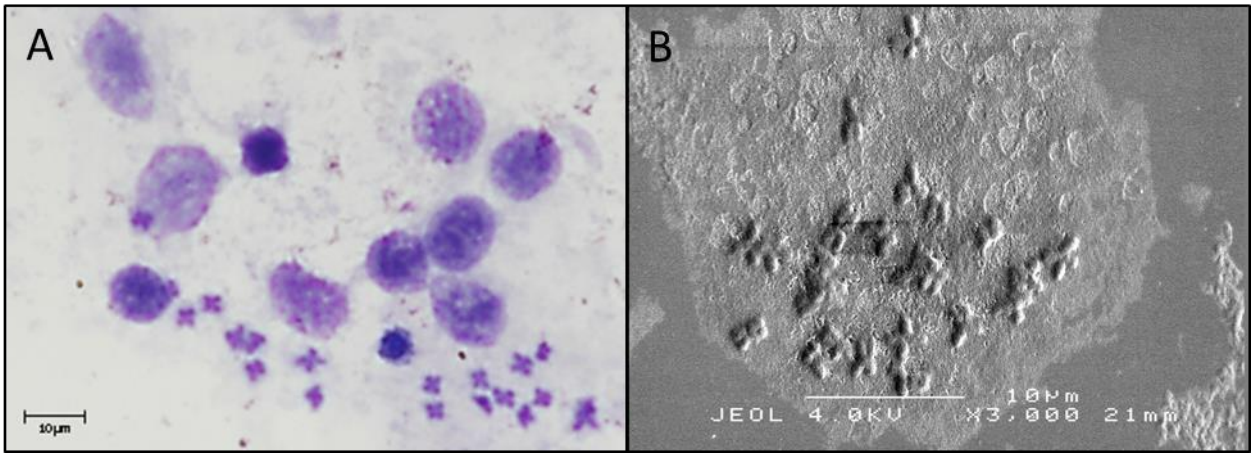


Figure 6 : Caryotypes à partir des cellules branchiales d'huître creuse, *Crassostrea gigas* diploïde observés au microscope optique photonique après coloration au Giemsa (A) et au microscope électronique à balayage (B) (Images personnelles).

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la triploïdisation induit une réduction importante du développement gonadique qui participe directement à l'amélioration de la valeur commerciale de l'espèce. En effet, les individus diploïdes sont matures lors la période estivale et présentent un aspect laiteux et donc un goût différent alors que les individus triploïdes présentent une qualité gustative constante au cours de l'année. Chez l'huître creuse, la part d'utilisation de naissain triploïde dans la production mondiale est en constante augmentation bien qu'il n'existe aucune donnée publiée permettant de quantifier cette évolution. En France, l'amélioration considérable des performances d'élevage permise par la triploïdie a entrainé une augmentation de la part de naissain triploïde commercialisé par les écloseries, atteignant 78,7% des ventes en 2008 (Cultures Marines n° 223, février 2009).

C. La triploïdisation chez l'huître creuse

1. Les méthodes d'induction

L'huître creuse présente une fécondation externe et à la maturité sexuelle, les gamètes mâles et femelles vont être libérés dans la colonne d'eau. Après la fécondation des ovocytes, ceux-ci achèvent leurs réductions de méiose (figure 7A). L'inhibition de ces réductions méiotiques par chocs thermique ou hyperbare ou par des traitements chimiques permet une induction relativement facile de la polyploïdie. Ces différents traitements permettent la

rétention du premier ou du second globule polaire contenant un jeu haploïde de chromosomes maternels, ce qui correspond à 10 chromosomes chez l'huître creuse. La triploïdie a tout d'abord été introduite chez différentes espèces de poissons (Purdom, 1972; Valenti, 1975). Chez les ostréidés, la première induction de la triploïdie a été faite chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* en 1981 (Stanley et al., 1981). Puis les mêmes méthodes ont été appliquées quelques années plus tard chez *Crassostrea gigas* (Allen et Downing, 1986). Chez ces espèces, le blocage de l'expulsion des globules polaires s'effectue principalement par des traitements chimiques inhibiteurs de méiose (cytobloquants) tels que la cytochalasine-B et le 6-Diméthylaminopurine (6-DMAP) (Gérard et al., 1999), soit par rétention du premier globule polaire, soit du second (figure 7B et C). L'induction de la triploïdie par la rétention du second globule polaire est préférable vis-à-vis de la rétention du premier globule polaire puisqu'elle améliore le succès de la triploïdisation et la survie larvaire. En effet, l'induction de la triploïdie par rétention du premier globule polaire complique la ségrégation chromosomique au cours de la deuxième division méiotique (Guo et al., 1992). Les individus triploïdes obtenus par ces différentes méthodes produisent des gamètes aneuploïdes (voir paragraphe perturbation de la ségrégation chromosomique) et de mauvaise qualité. Il est donc impossible de maintenir des lignées triploïdes par des croisements successifs. Une réduction de 40% du nombre de spermatozoïdes mobiles et une diminution de 23% de leur vitesse de nage a été observée chez l'huître creuse triploïde par rapport aux huîtres diploïdes (Suquet et al., 2016). De plus, les produits cytobloquants utilisés sont toxiques et ils induisent une forte mortalité en phase larvaire (Eudeline et al., 2000; Guo et al., 1996). Enfin, les taux d'induction par l'intermédiaire de ces méthodes sont très variables. Aussi, toutes ces contraintes ont encouragé le développement de nouvelles méthodes d'induction. La production de lignées de géniteurs tétraploïdes fertiles (4n) a été mise en place afin de croiser ses individus avec des individus diploïdes pour ainsi obtenir une descendance complètement triploïde. Surtout, cette descendance présente une survie larvaire très supérieure à celle observée par les méthodes d'induction chimique (Guo et al., 1996) (figure 7D et E).

A l'heure actuelle, cette technique de production est la plus utilisée par les écloseries pour l'obtention de naissain triploïde. L'obtention des lignées de géniteurs tétraploïdes s'effectue en induisant la rétention d'un globule polaire par l'intermédiaire d'agents cytobloquants lors du croisement d'une femelle triploïde avec un mâle diploïde (Guo et K Allen, 1994) (figure 7D) ou d'un male tétraploïde avec une femelle diploïde (McCombie et al.,

2005) (figure 7E). Les individus tétraploïdes obtenus étant fertiles, ils sont capables de se reproduire entre eux pour permettre le maintien des lignées de géniteurs.

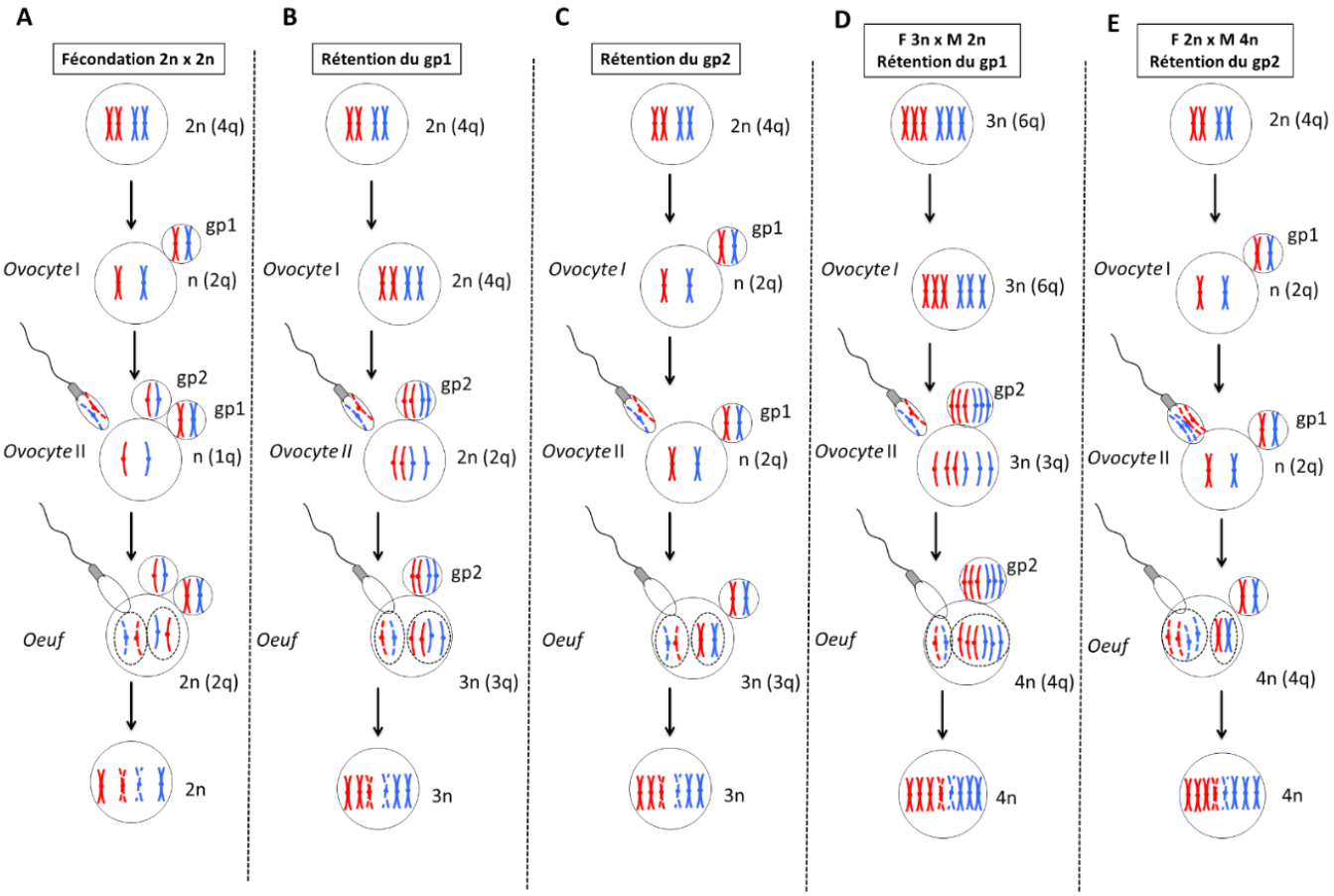


Figure 7: Protocoles d'induction de la triploïdie ou de la tétraploïdie au regard de la fécondation d'animaux diploïdes (A). Croisement de deux individus diploïdes (A). Induction de la triploïdie par soit la rétention du gp1 (globule polaire 1) d'un ovocyte 2n et fécondation avec un spermatozoïde (B) ou alors par la rétention du gp2 (globule polaire 2) d'un ovocyte et fécondation avec un spermatozoïde (C). Induction de la tétraploïdisation par croisement d'une femelle triploïde avec un mâle diploïde et rétention du premier globule polaire (D) ou croisement d'une femelle diploïde avec un mâle tétraploïde et rétention du second globule polaire (E).

2. Modifications des caractères reproducteurs induites par la triploïdie

a) Diminution de l'allocation à la reproduction

L'induction de la triploïdie entraine une diminution significative de la quantité de tissu gonadique. Une étude menée par Allen et Downing en 1986 montre qu'au stade de maturité sexuelle, les mâles triploïdes atteignent une occupation gonadique de l'ordre de 34% et les femelles triploïdes de l'ordre de 16% contre 79% chez les diploïdes. Ces mesures d'occupation

gonadique chez les huîtres triploïdes incluent les tissus auxiliaires (tissu de réserve et tissu conjonctif vésiculeux), des cellules de la lignée germinale immatures et matures du fait de l'hétérogénéité de la gamétogenèse de ces individus. Cependant, en dépit de leur occupation gonadique réduite, les huîtres triploïdes sont capables de produire des gamètes matures mais en faible proportion. La production de gamètes est fortement influencée par les méthodes d'obtention des individus triploïdes (chimique ou par croisement d'individus tétraploïdes avec des individus diploïdes) (Guo et Allen, 1994a; Gong et al., 2004; Suquet et al., 2016). Chez la femelle, la production d'ovocytes chez les individus triploïdes est estimée à 2% par induction chimique (Guo et Allen, 1994a) et à 13% (Gong et al., 2004) et 0,5% (Suquet et al., 2016) par croisement 4n x 2n par rapport aux individus diploïdes. Chez les mâles triploïdes obtenus par croisement 4n x 2n, la production de spermatozoïdes est estimée à 1,5% par rapport aux individus diploïdes (Suquet et al., 2016). Toutefois, une étude menée en Bretagne lors de l'été caniculaire de 2003 révèle une émission gamétique exceptionnelle représentant 30% de la masse en chair pour les individus triploïdes contre 44,4% pour les individus diploïdes (Normand et al., 2008). Cette forte variabilité traduit une forte plasticité de la reproduction des individus triploïdes. Il est probable que cette hétérogénéité soit due à une plus forte sensibilité des huîtres triploïdes aux facteurs environnementaux et ou génétiques susceptibles d'influencer la reproduction de ces individus.

b) Perturbations de la gamétogenèse

Chez l'huître creuse comme chez de nombreuses espèces de mollusques et poissons, la triploïdie induit des perturbations de la gamétogenèse allant d'une diminution de l'occupation gonadique, de la quantité et la qualité des gamètes jusqu'à la stérilité totale des individus (Piferrer et al., 2009). Les études décrivant la gamétogenèse des huîtres triploïdes suggèrent que cette gamétogenèse est très hétérogène d'un individu à l'autre (Allen et Downing, 1986; Normand et al., 2008; Jouaux et al., 2010). Les premières étapes de maturation des cellules de la lignée germinale chez les individus triploïdes sont similaires à celles observées chez les individus diploïdes. Seule une faible proportion des gonies atteint le stade de spermatocyte ou d'ovocyte primaire que ce soit chez le mâle ou chez la femelle (Allen et Downing, 1986). Cette maturation incomplète se caractérise par la persistance de cellules immatures alors que les huîtres diploïdes ont atteint la maturité sexuelle (Wilkins, 1990). En effet, (Normand et al., 2008) montre que 100% des huîtres diploïdes ont atteint le stade 3 de maturité sexuelle en juin

2003 alors que 17% des huîtres triploïdes sont au stade 1 de prolifération des cellules germinales. Cette étude a également mis en évidence deux autres catégories d'huîtres triploïdes. La majorité des huîtres triploïdes présentaient simultanément des gonies, des gamétocytes en cours de maturation et une proportion variable de gamètes matures. Enfin la gamétogenèse de certaines huîtres triploïdes (5,6% en juin et 31,6% en août) a conduit à la maturation complète de l'ensembles des cellules germinales. Au vu de l'hétérogénéité de la gamétogenèse des individus triploïdes, une classification spécifique a été établie afin de décrire finement le cycle de gamétogenèse de ces individus (Jouaux et al., 2010).

Au stade 0 de repos sexuel, les coupes histologiques de gonade d'huîtres triploïdes ne révèlent aucune différence avec les huîtres diploïdes. Au stade de prolifération des cellules germinales (stade 1), deux catégories d'animaux triploïdes ont été définies, une catégorie nommée alpha correspondant à des animaux présentant une gamétogenèse peu perturbée proche de celle des diploïdes et une seconde catégorie, beta, présentant une gamétogenèse très perturbée avec très peu de proliférations cellulaires associées à des amas de gonies bloquées (Figure 8).

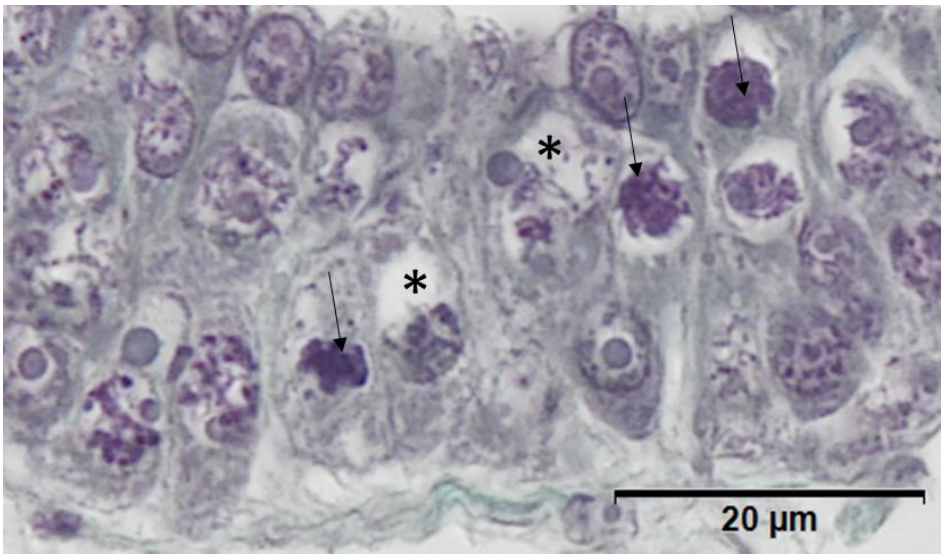
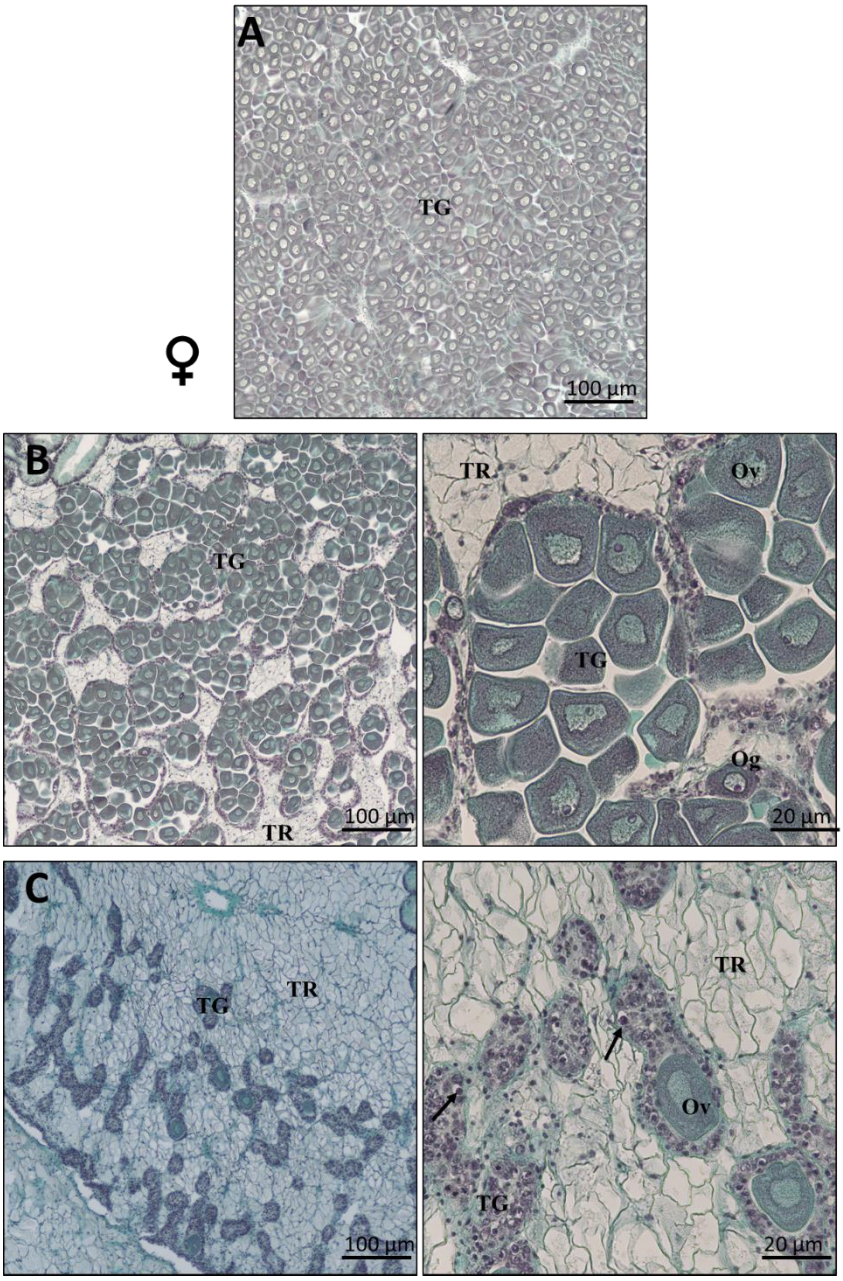


Figure 8: Coupe histologique transversale d'un tubule gonadique au stade 1 de prolifération des cellules germinales d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, triploïde mâle beta. La coupe est colorée au trichrome de Prenant-Gabe. Les perturbations de la gamétogenèse se traduisent par des noyaux rétractés (flèche) avec une forte condensation chromatinienne et des plages claires dans le cytoplasme (*) comme décrit par Jouaux et al., (2010) (Image personnelle).

Ces blocages persistent au stade 2 de différenciation des cellules germinales et se traduisent par de fortes condensations nucléaires ainsi que des plages claires dans le cytoplasme tant chez la femelle que le mâle. Chez les individus alpha, on observe une absence de perturbations de la gamétogenèse, les tubules se développent et l'ensemble de la lignée germinale est présente (ovogonies à ovocytes pour les femelles et spermatogonies à spermatides pour les mâles). Au stade 3 de maturité sexuelle, de nombreux gamètes matures sont présents dans les tubules gonadiques bien développés chez les individus alpha (Figure 9A et D). Toutefois, l'occupation gonadique des individus triploïdes alpha est inférieure à celle retrouvée chez les individus diploïdes. Chez les individus beta, on retrouve deux catégories, les beta 1 où l'on trouve un faible nombre de gamètes matures dans des tubules gonadiques très réduits (Figure 9C et F) et les beta 2 présentent une gamétogenèse réduite par rapport aux individus alpha mais un continuum de la lignée germinale est observé (Jouaux et al., 2010) (Figure 9B et E).

Cette étude révèle que la gamétogenèse des individus triploïdes est très complexe et qu'il existe des régulations fines permettant d'obtenir une telle variabilité au sein d'une même cohorte d'individus. L'étude de la gamétogenèse des individus triploïdes s'avère alors un outil intéressant pour comprendre d'une part le fonctionnement global de la gamétogenèse mais également les perturbations au niveau des proliférations cellulaires rencontrées chez individus beta ainsi que les régulations impliquées dans la diminution de l'occupation gonadique à la fois chez les individus triploïdes alpha et beta.


A
TG
100 µm
♀
B
TG
TR
100 µm
TR
Ov
TG
Og
20 µm
C
TG
TR
100 µm
TR
Ov
TG
20 µm

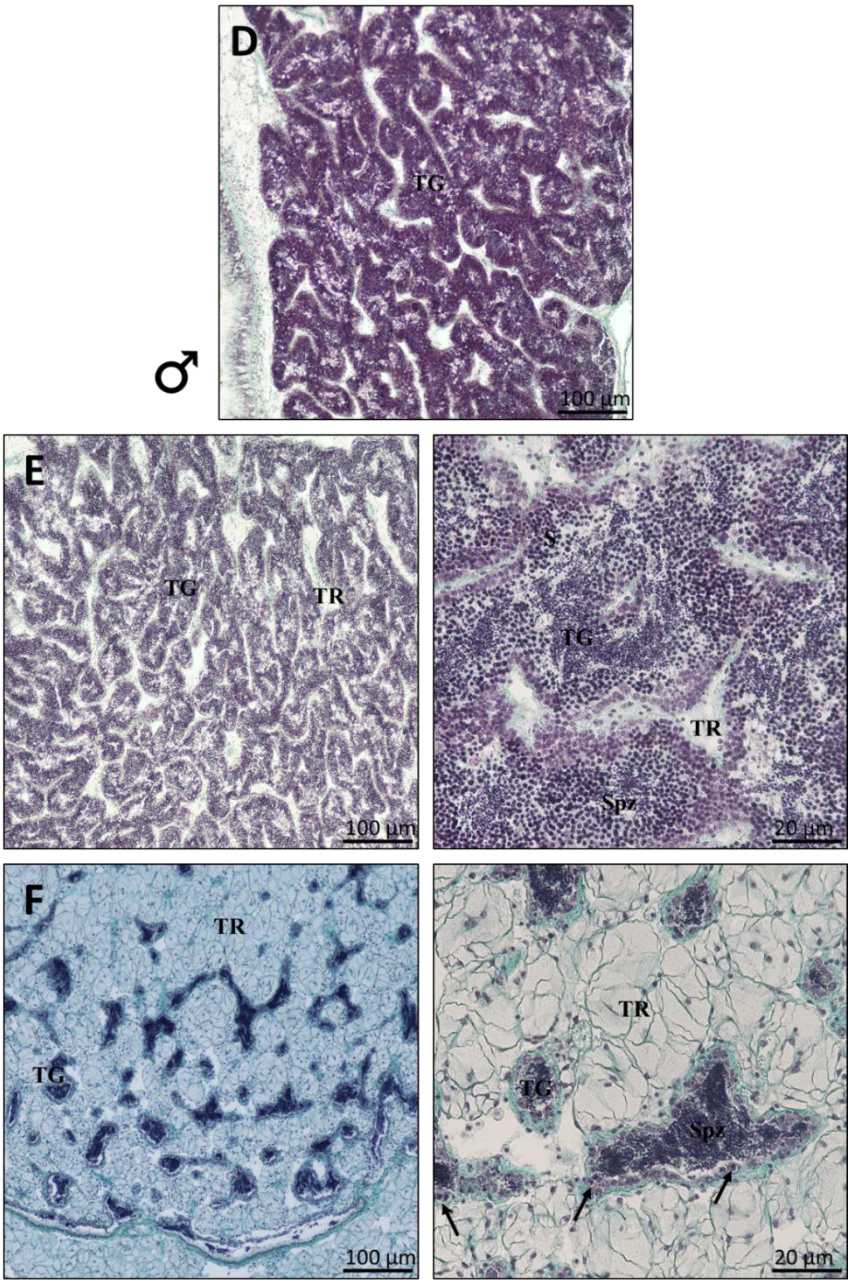


Figure 9 : Coupes histologiques transversales d'aire gonadique d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* triploïdes femelle et mâle. Les préparations sont colorées au trichrome de Prenant-Gabe au stade de maturité sexuelle (Stade 3). Les individus alpha (femelle A et mâle D) présentent des tubules gonadiques (TG) constitués exclusivement de gamètes matures. Les individus beta peuvent être subdivisés en deux catégories, les individus beta 2 (femelle B et mâle E) présentant une gamétogenèse réduite par rapport aux individus alpha dont un continuum de la lignée germinale est observé. Les individus beta 1 (femelle C et mâle F) présentent des tubules gonadiques considérablement réduits avec seulement un faible nombre de gamètes matures avec de nombreuses figures de blocage sont observées, des condensations nucléaires et des plages claires dans le cytoplasme (flèche). TR : tissu de réserve ; S : spermatide ; Spz : spermatozoïde ; Og : ovogonie ; Ov : Ovocyte mature.

c) Perturbation de la ségrégation chromosomique

La ségrégation chromosomique lors de la méiose est également altérée chez les huîtres triploïdes. Chez les individus diploïdes, les chromosomes homologues s'apparient en bivalents et sont répartis symétriquement dans les cellules filles à l'anaphase I. Chez les individus triploïdes, les chromosomes homologues s'apparient en trivalents et sont répartis dans les cellules filles à raison d'un chromosome dans l'une et deux chromosomes dans l'autre (Gong et al., 2004). Chacun des 10 trivalents cèdent alors un ou deux chromosomes aléatoirement à l'un ou l'autre gamétocyte II. Ces difficultés de ségrégation donnent lieu à la formation de gamètes aneuploïdes présentant en moyenne 15 chromosomes avec un déséquilibre récurrent de la ségrégation (Guo et Allen, 1994b). L'aneuploïdie caractérise l'état chromosomique d'une cellule ou d'un groupe de cellules d'un organisme dont le nombre de chromosomes n'est pas un multiple entier du nombre du jeu haploïde de l'espèce (par exemple 1,5n) par opposition à l'euploïdie (nombre entier : 2n, 3n, 4n etc.). Ce type de ségrégation aléatoire a déjà été observé chez d'autres espèces notamment chez les végétaux (Ramsey et Schemske, 1998).

Mais les difficultés liées à une mauvaise ségrégation chromosomique ne peuvent pas à elles seules expliquer la réduction de la production d'ovocytes des individus triploïdes femelles puisque les réductions de méiose des ovocytes se font après l'émission des gamètes dans la colonne d'eau. Le blocage partiel des lignées germinales semble se produire chez ces espèces au cours du stade de prolifération des gonies ou avant l'entrée en méiose, les mécanismes de ségrégation intervenant seulement après.

3. Triploïdie et déterminisme du sexe

Chez l'huître creuse, la triploïdisation provoque une augmentation significative du nombre d'individus hermaphrodites simultanés dans les lots expérimentaux (Wilkins, 1990; Nell, 2002). Le pourcentage d'hermaphrodisme chez *Crassostrea gigas* atteint jusqu'à 30% des individus triploïdes (Jouaux et al., 2010; Wilkins, 1990) alors que celui-ci est inférieur à 1% chez les individus diploïdes (Guo et al., 1998; Normand et al., 2009; Steele et Mulcahy, 1999). Deux types d'hermaphrodisme sont identifiés, les individus dit synchrones et asynchrones. Chez les individus synchrones, les lignées germinales mâles et femelles sont présentes simultanément dans la gonade que ce soit au début ou à la fin du cycle gamétogenétique. Au

stade de maturité sexuelle (stade 3), ces individus possèdent une gonade composée exclusivement de spermatozoïdes et d'ovocytes matures. Les individus asynchrones présentent un décalage dans les deux lignées germinales, soit mâle puis femelle ou inversement ce qui aboutit à des individus présentant des gamètes matures dans la lumière du tubule gonadique et en périphérie des tubules, des cellules germinales précoces (Jouaux et al., 2010).

A l'heure actuelle aucune étude ne décrit un changement significatif du sexe ratio chez les individus triploïdes. Pourtant la triploïdie est connue chez de nombreuses autres espèces ayant un déterminisme sexuel génétiquement contrôlé pour induire des changements importants dans la proportion de mâles et de femelles. Chez la crevette, *Fenneropenaeus chinensis*, l'induction de la triploïdie modifie la fréquence d'apparition des femelles par rapport aux mâles de 4:1 alors que le sexe ratio des individus diploïdes est de 1:1 (Li et al., 2003). Chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, les individus triploïdes sont exclusivement mâles alors que les individus diploïdes présentent un sexe ratio équilibré (Kiyomoto et al., 1996). L'absence d'effet de la triploïdie sur le sexe ratio des huîtres creuses pourrait traduire l'absence de chromosomes sexuels ou la faiblesse du déterminisme génétique chez cette espèce. Cependant, au vu du faible nombre d'études sur ce sujet, il est impossible de conclure de manière définitive.

4. Modification des performances de croissance et de survie

a) Amélioration de la croissance

L'induction de la triploïdie chez *Crassostrea gigas* améliore la croissance des individus dès le stade larvaire. Une étude menée par Guo et al., 1996 rapporte que les larves triploïdes obtenues à partir de croisement 2n x 4n possèdent une croissance supérieure à celle des diploïdes. En effet, 24h après la fécondation, la taille des larves D diploïdes est de 77µm contre 89µm chez les triploïdes. Huit jours après la fécondation, la taille des larves diploïdes est de 116µm contre 148µm chez les triploïdes. Lors de cette même étude, les différentes méthodes d'induction ont été comparées. Les larves triploïdes obtenues par traitement chimique à la cytochalasine B présentent une taille de 80µm, 24h après la fécondation et de 114µm, 8 jours après la fécondation. Ces résultats montrent que la méthode d'induction chimique n'améliore pas la croissance larvaire des individus triploïdes. Les mêmes résultats ont été obtenus chez l'huître *Saccostrea madrasensis* (Mallia et al., 2006) et une autre étude ne montre aucun effet

de la méthode d'induction chimique (rétention des globules polaires I ou II par un traitement à la cytochalasine B ou 6-DMAP) ni même de ploïdie (2n ou 3n) sur la croissance larvaire (Gérard et al., 1999). Il est important de souligner que la croissance et la survie larvaire des huîtres triploïdes sont très variables et que ces paramètres sont fortement influencés par les facteurs environnementaux telles que de la disponibilité en nourriture, la densité d'élevage, la température… En général, les environnements chauds, riches en nutriments produisent des huîtres triploïdes avec des taux de croissance nettement plus élevées (Brake et al., 2004). Il s'avère donc difficile de comparer les performances de croissances larvaires d'une expérimentation à l'autre sans tenir compte de l'ensemble des paramètres environnementaux pouvant influencer celles-ci. De plus les études ci-dessus n'explicitent pas directement la densité d'élevage de leur expérimentation. Il faut donc rester prudent sur le fait qu'une augmentation significative de la croissance larvaire est directement liée à l'induction de la triploïdie.

Après la métamorphose, l'induction de la triploïdie améliore de façon significative la croissance des individus (Allen et Downing, 1986) surtout à partir d'un an (Nell, 2002). Selon les conditions d'élevage, l'augmentation du taux de croissance est différent, légèrement supérieur à celui des diploïdes en Tasmanie (Nell, 2002) et quatre fois supérieur en Californie (Allen et Downing, 1986). Une augmentation de la croissance des huîtres triploïdes a été observée chez presque toutes les espèces étudiées (Tableau 1). Une seule étude, montre que la taille corporelle des huîtres triploïdes obtenues par induction chimique (CB) est inférieure de 0,7% à celle des diploïdes (Wang et al., 2005). Chez *Crassostrea gigas*, une induction chimique (CB ou 6-DMAP) induit une augmentation de la taille corporelle des individus triploïdes de 14 à 150% par rapport aux diploïdes. Les triploïdes produites par croisement d'individus 2n x 4n montrent une croissance jusqu'à 159% plus élevée que les diploïdes. Cela s'explique notamment par une sélection drastique des géniteurs tétraploïdes (Huiping Yang, 2018). Cette augmentation de la croissance peut être interprétée comme un mécanisme propre aux triploïdes de réallocation énergétique de la reproduction vers la croissance et explique la taille supérieure observée chez les triploïdes de nombreuses espèces de bivalves (Brake et al., 2004; Huiping Yang, 2018).

Tableau 1 : Performance de croissance de différentes espèces d'huîtres triploïdes. La performance de croissance est mesurée en pourcentage d'augmentation du poids corporel total par rapport aux individus diploïdes. Tiré de (Huiping Yang, 2018).

Species	Method[1]	3N (%)	Increase (%)	Age (year)	Reference
Crassostrea virginica	CB, 0.5 mg/L	61–72	12–41	3	(Stanley et al. 1984)
	CB, 0.5 mg/L	96	30	2	(Barber & Mann 1991)
	CB, 0.5 mg/L; 2n×4n	72; 98	-0.7; 34 (tissue)	2.2	(Wang et al. 2005)
	2n×4n	100	Reaching market size 3n, 1.2 yr; 2n, 1.5 yr	--	(Harding 2007)
	2n×4n	100	82–192	1.3	(Guo et al. 2008)
	2n×4n	100	91–109	1.5	Allen, personal comm.
	2n×4n	100	88%	2	(Degremont et al. 2012)
	2n×4n (South Carolina)	100	5–9% body length 6–30% (dry weight)	0.67	(Stone et al. 2013)
Crassostrea gigas	CB, 1 mg/L	71–96	28	1.5	(Allen et al. 1986)
	CB or 6-DMAP	86	40	0.8	(Garnier-Gere et al. 2002)
	CB, 0.5 mg/L	76	20–23	2.3–3.2	(Maguire et al. 1995)
	CB, 1.0 mg/L	84	80–150	1.5–2	(Akashige & Fushimi 1992)
	CB, 0.5 mg/L; 4n	82–100	14; 26	1	(Wang et al. 2002)
	2n×4n	100	25–51	0.8	(Guo et al. 1996)
	2n×4n	99–100	159	1	(Nell & Perkins 2005)
	Not available (NA)	NA	No advantage	~1	(Villanueva-Fonseca et al. 2017)
Crassostrea hongkongensis	CB, 0.5 mg/L		5.7–15.5	1	(Zhang et al. 2017)
Crassostrea talienwhanensis	Cold shock, 2-8°C	43–70	52 (length)	1	(Liang et al. 1994)
Crassostrea madrasensis	6-DMAP, 100 µM	n/a	128–260	1	(Mallia et al. 2006)
Ostrea edulis	CB, 1 mg/L	n/a	61 (PB1); -8 (PB2)	1.25	(Hawkins et al. 1994)
Saccostrea glomerata	CB, 0.5 mg/L	85	41	2.5	(Nell et al. 1994)
	CB, 1.25mg/L	73–93	36–57	2	(Hand & Nell 1999)
	CB, 1.0 mg/L	75–79	74	1.3	(Hand et al. 2004)
	CB, 1.25mg/L	n/a	49	3.2	(Troup et al. 2005)

[1] Induction method: CB = cytochalasin B; 6-DMAP = 6-dimethyaminopurine; 2n×4n, eggs from diploid crossed with sperm from tetraploid.

b) Amélioration de la survie

En ce qui concerne la survie larvaire, il faut tenir compte des effets induits par le processus de triploïdisation indépendamment de ceux provoqués par la méthode d'induction. Les méthodes d'inductions chimiques entrainent de forts taux de mortalité. Une étude montre que 24h après la fécondation, les larves D obtenues par induction chimique à la cytochalasine

B présentent un taux de survie de seulement 2%, accompagnées de déformations. Ce faible taux de survie s'explique en raison de la toxicité des agents cytobloquants utilisés pour l'induction des triploïdes (Guo et al., 1996). Les larves triploïdes obtenues à partir de croisement 2n x 4n possèdent un taux de survie nettement supérieur de 31,6%, en s'affranchissant de l'emploi de produits cytotoxiques (Guo et al., 1996). Cette même étude montre des taux de survie larvaire post-fixation de l'ordre de 1,66%, 1,6% et 0,003% respectivement pour les individus diploïdes, 2n x 4n et 3n issus d'induction chimique (Guo et al., 1996).Ce différentiel du taux de survie entre les larves D et la fixation des larves sont associées à la métamorphose des larves ainsi qu'aux conditions de culture (Guo et al., 1996).

De nombreuses études comparatives se sont intéressées aux mortalités rencontrées chez les huîtres adultes diploïdes et triploïdes *Crassostrea gigas*. Les taux de mortalité sont très variables d'une étude à l'autre et diffèrent selon les méthodes d'obtention des huîtres adultes triploïdes, les conditions d'élevage et les sites d'étude. La forte hétérogénéité des taux de survie des huîtres diploïdes et triploïdes est due principalement aux paramètres environnementaux qui fluctuent entre les différentes études (Tableau 2) (Dégremont et al., 2015). Plus récemment, une étude menée en Normandie a montré un taux de mortalité deux fois supérieur chez les individus triploïdes par rapport aux diploïdes au cours de la période estivale durant deux années successives (Houssin et al., 2019). Une étude brésilienne qui s'est déroulée sur la même période a montré des résultats similaires, avec une mortalité de 16% chez les individus triploïdes contre 5% chez les diploïde en juin. Cependant, même si le taux de mortalité sont plus élevé chez les individus triploïdes, les taux de mortalité observés sur les deux sites de l'étude varient en fonction de la localisation (Melo et al., 2020). Dans ce contexte, il est donc difficile de conclure. Le taux de survie des individus triploïdes est sous l'influence prépondérante des conditions environnementales et la triploïdie ne confère aucun avantage, ni désavantage en termes de résistance aux maladies.

Tableau 2 : Tableau des études comparant la résistance aux maladies des différentes espèces d'huîtres diploïdes et triploïdes. (Tiré de Dégremont et al., 2015).

Summary table for studies comparing disease resistance in diploid and triploid oyster species.

Disease/mortality	Species	Country	Brood stock	2n and 3n sibling[a]	Triploidy induction method[b]	Method of evaluation for resistance	Year	Survival		Statistical difference/Note	Reference
								2n	3n		
Perkinsus marinus (Dermo)	*Crassostrea virginica*	USA	Unselected	No	CB	Field in medium salinity site in the Chesapeake Bay	1989–1990	NA	NA	NA/Same susceptibility to *P. marinus*	Barber and Mann (1991)
			Unselected	No	CB	Laboratory	1989–1991	0%	0%	$P > 0.05$/2n died faster than 3n	Meyers et al. (1991)
			Unselected and MSX and/or Dermo resistant	No, but 3 replicate spawns within ploidy	♀ 2n × ♂ 4n	Field in low salinity site (<15‰) in Yeocomico River	2005–2007	69%	82%	$P > 0.05$	Dégremont et al. (2012)
	C. gigas	USA	Unselected	Yes	CB	Laboratory	1989–1991	75%	66%	$P < 0.01$	Meyers et al. (1991)
Haplosporidium nelson (MSX)	*Crassostrea virginica*	USA	MSX resistant strain	No	CB	Field in Cotuit Bay in the northeastern USA	1990–1991	31–34%	37–43%	NA	Matthiessen and Davis (1992)
H. nelsoni and *P. marinus*	*Crassostrea virginica*	USA	Unselected and MSX and/or Dermo resistant	No, but 3 replicate spawns within ploidy	♀ 2n × ♂ 4n	Field in moderate salinity sites (15–25‰)	2005–2007	52–66%	74–83%	$P > 0.05$	Dégremont et al. (2012)
Bonamia roughleyi (WM)	*S. glomerata*	Australia	Unselected	Yes	CB M2	Field in Woolooware Bay	1990–1992	59%	54%	$P > 0.05$	Nell et al. (1994)
			Unselected	Yes	CB M2	Field in 7 oyster farms in New South Wales (NSW)	1994–1997	65%	88%	$P < 0.01$ for 6 farms	Hand et al. (1998b)
			Unselected	Yes	CB M2	Field in Merimbula	1994–1996	88%	93%	$P > 0.05$	Smith et al. (2000)
Summer mortality/OsHV-1 detected	*Crassostrea gigas*	France	Unselected	Partially	♀ 2nC × ♂ 4nC	Field and laboratory	2003	CC[c] 51%	CCC[c] 52%	$P > 0.05$	Dégremont et al. (2003, 2010b
			Selected resistant 2nR	Partially	♀ 2nR × ♂ 4nC	Field and laboratory	2003	RR[c] 71%	RCC[c] 62%	$P < 0.05$	
			Selected susceptible 2nS	Partially	♀ 2nS × ♂ 4nC	Field and laboratory	2003	SS[c] 38%	SCC[c] 48%	$P < 0.05$	
OsHV-1 µvar	*C. gigas*	France	Unselected	Yes	CB M2	Field in 5 sites along the Atlantic coasts	2011	CC[c] 9%	CCC[c] 15%	$P > 0.05$	Dégremont et al. (2014)
			Summer mortality resistant 2nR	Yes	CB M2	Field in 5 sites along the Atlantic coasts	2011	RR[c] 67%	RRR[c] 68%	$P > 0.05$	
			OsHV-1 resistant	Yes	CB M2	Field in the Marennes-Oléron Bay	2013	RR[c] 70%	RRR[c] 79%	$P > 0.05$	
			Unselected	Partially	♀ 2nC × ♂ 4nC	Cohabitation	2011	CC[c] 13%	CCC[c] 15%	NA	Benabdelmouna et al. (2014) and unpublished data
			Selected 2n	Partially	♀ 2nR × ♂ 4nC	Cohabitation	2011	RR[c] 56%	RCC[c] 25%		
			Selected 4n	Partially	♀ 2nC × ♂ 4nR	Cohabitation	2011		CRR[c] 37%		
			Selected 2n and 4n	Partially	♀ 2nR × ♂ 4nR	Cohabitation	2011		RRR[c] 54%		
Vibrio aestuarianus	*C. gigas*	France	Unselected	Yes	CB M2	Injection	2006–2007	15–65%	10–80%	2n = 3n, 2n > 3n and 2n < 3n	De Decker et al. (2011)

NA: not available.

[a] Yes indicates that the same oysters were used as parents to produce both 2n and 3n.

[b] When reported, which polar body was blocked to make triploid. M2 = second polar body. CB = cytochalasin B.

[c] CC, RR, SS were the genotypes for control, selected resistant and selected susceptible diploids, while CCC, RCC, CRR, SCC and RRR were the genotypes from ♀ 2nC × ♂ 4nC, ♀ 2nR × ♂ 4nC, ♀ 2nC × ♂ 4nR, ♀ 2nS × ♂ 4nC, ♀ 2nR × ♂ 4nR, respectively (the first set of genes coming from the diploid female and the two others from the tetraploid male). For CCC and RRR produced by CB (without 4n), were the genotypes from ♀ 2nC × ♂ 2nC and ♀ 2nR × ♂ 2nR, respectively (the two first sets of genes coming from the diploid female, and the last from the diploid male).

5. *Hétérosis et le gigantisme cellulaire*

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'augmentation du taux de croissance chez les huîtres triploïdes. Les individus triploïdes présentent 30 chromosomes soit 10 chromosomes de plus que les individus diploïdes. Cette augmentation du nombre de chromosomes entraine également une augmentation du nombre d'allèles à chaque locus et pourrait ainsi conférer aux triploïdes un avantage concernant un ou plusieurs caractères par rapport aux individus diploïdes. C'est ce que l'on appelle un effet d'hétérosis (Stanley et al., 1984; Gaffney, 1990; Hawkins et al., 1994, 2000). Plusieurs publications rapportent une corrélation entre la méthode d'induction, l'hétérozygotie multi-loci (diversité allélique pour les loci observés) et le taux de croissance des individus. Hawkins et ses collaborateurs (1994) montrent que les huîtres triploïdes, *Ostrea edulis*, induites chimiquement à la cytochalasine B par rétention du globule polaire I présentent une hétérozygotie et des performances de croissance supérieures par rapport aux triploïdes obtenues par rétention du globule polaire II et aux individus diploïdes. En effet, les individus triploïdes obtenus par rétention du globule polaire I montrent une masse de tissu sec de 61% supérieur aux diploïdes et une longueur de coquille de 16% supérieur aux diploïdes (Hawkins et al., 1994). Des résultats similaires ont été observés chez les huîtres triploïdes, *Crassostrea gigas*, obtenues par rétention du globule polaire I avec une hétérozygotie multi-loci de 68% supérieur aux individus diploïdes (Hawkins et al., 2000). Cependant, la corrélation entre hétérozygotie et taux de croissance peut être discutée. D'une part les triploïdes obtenues par rétention du globule polaire I ont un taux de survie largement inférieur à celles obtenues par rétention du globule polaire II, ce point n'ayant pas été pris en compte pour mesurer les performances de croissance des individus (Hawkins et al., 2000). D'autre part, des études n'ont détecté aucune corrélation entre l'hétérozygotie multi-loci et la croissance des individus triploïdes obtenus par rétention des globules polaires I ou II (Jiang, 1991; Nell, 2002). L'hétérozygotie tout comme l'induction de la triploïdie génèrent des réponses non additives sur les phénotypes des individus. Il est donc difficile de dissocier les effets propres de l'hétérozygotie et des méthodes d'obtention. Seuls des plans expérimentaux particuliers pourrait permettre de démontrer ces effets chez les huîtres triploïdes.

La seconde hypothèse pour expliquer l'augmentation de la croissance constatée chez les huîtres triploïdes est l'augmentation de la quantité de matériel chromosomique induisant une augmentation du volume nucléaire et cytoplasmique pour conserver le rapport nucléo-cytoplasmique des cellules, ce que l'on qualifie de « gigantisme polyploïde » (Guo et al., 1996).

Les gamètes des individus polyploïdes présentent également une taille supérieure. Les ovocytes des huîtres tétraploïdes ont un diamètre de 17% supérieur à ceux des diploïdes et sont 60% plus volumineux (Guo et al., 1996). Chez les individus polyploïdes, l'hypertrophie des cellules est souvent compensée par une réduction du nombre de cellules dans l'organisme ce qui n'entraine pas une augmentation de la croissance chez ces individus (Otto et J, 2000). Ce phénomène a été décrit chez plusieurs espèces d'huîtres, *Crassostrea gigas* et *Saccostrea glomerata* où les auteurs rapportent une hypertrophie du muscle adducteur chez les individus triploïdes. Cette hypertrophie n'est peut-être pas directement liée à une augmentation du volume cellulaire due à la triploïdie des individus. Elle pourrait résulter d'une réduction du développement gonadique des individus triploïdes entrainant une diminution de l'utilisation des réserves énergétiques stockées dans le muscle adducteur (Gardner et al., 1996). A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré une augmentation du volume des cellules somatiques ou une réduction de la densité cellulaire totale chez l'huître creuse triploïde. Les hypothèses d'hétérosis et de gigantisme polyploïde pour expliquer le plus fort taux de croissance chez les individus triploïdes impliquent que les individus triploïdes seraient plus à même de tirer profit de l'énergie acquise par la nutrition.

6. *Réallocation énergétique*

Une dernière hypothèse pour expliquer l'augmentation du taux de croissance des individus triploïdes est une différence d'allocation de l'énergie. La diminution de l'allocation à la reproduction chez les huîtres triploïdes devrait entrainer une réallocation de l'énergie vers la croissance et la survie des individus. Ainsi, les performances de croissance seraient inversement corrélées au développement gonadique des individus diploïdes au cours d'un événement de reproduction (Allen et Downing, 1986; Garnier-Géré et al., 2002; Haure et al., 2003). L'étude menée par Allen et Downing (1986) montre que les huîtres diploïdes et triploïdes utilisent leurs réserves énergétiques de façons très différentes. En effet, la quantité de glycogène stocké dans les tissus chez les huîtres diploïdes a diminué tout au long du cycle de gamétogenèse pour atteindre la valeur minimale de 4,8% du poids sec de l'animal à la mi-juillet. Après la ponte, les niveaux de glycogène ont atteint 27,1% du poids sec à la mi-novembre. La teneur en glycogène des individus triploïdes était en moyenne supérieure à celle des individus diploïdes pendant la gamétogenèse, respectivement de 16,7% chez les diploïdes et 25,9% chez les triploïdes (Allen et Downing, 1986). Des résultats similaires ont été observés dans l'étude de Garnier-Géré et al. (2002) où les individus triploïdes ont accumulé des taux de glucides et de

glycogène de 45% et 63% supérieurs aux huîtres diploïdes sur un site qualifié « pauvre » pour sa faible disponibilité en ressources nutritives et des taux de glucides et glycogène de 93% et 118% dans un environnement « riche ». Ces résultats pourraient être interprétés par une accumulation plus rapide ou une utilisation réduite des réserves énergétiques chez les individus triploïdes. Cela confèrerait aux individus triploïdes quel que soit les conditions du milieu une capacité plus importante à résister à la faible quantité d'alimentation disponible lors de la période hivernale ainsi qu'aux mortalités estivales. Les différences significatives des taux de sucres utilisés au cours du cycle gamétogénétique entre les individus diploïdes et triploïdes témoignent du coût énergétique important de la reproduction chez les huîtres *Crassostrea gigas* (Figure 10) (Haure et al., 2003).

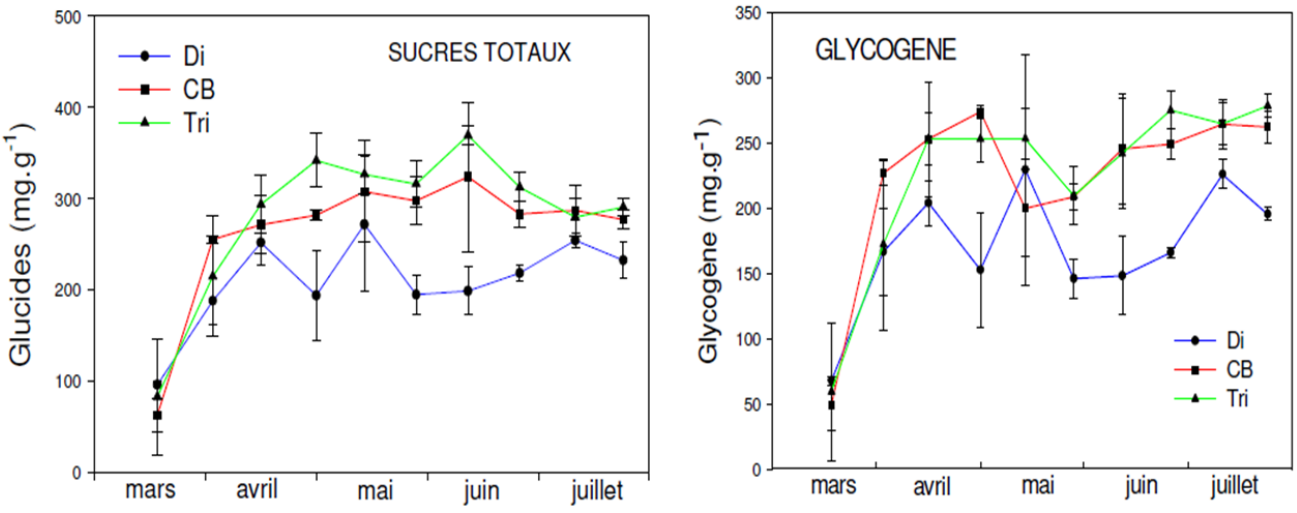


Figure 10 : Evolution des concentrations de sucres totaux et du glycogène dans la chair des huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Les concentrations sont exprimées en mg.L^{-1} d'équivalence de glucose chez les individus diploïdes (Di) et triploïdes induit chimiquement à la cytochalasine B (CB) ou par croisement 2n x 4n (Tri) au cours de la seconde période du cycle gamétogénétique (stades II et III). Tiré de (Haure et al., 2003).

Afin de comprendre les interactions entre le stockage des nutriments et le cycle de reproduction des individus diploïdes et triploïdes alpha et beta, une étude a comparé l'évolution de la gamétogenèse avec des niveaux contrastés de stockage induits par un conditionnement « huître nourrie » versus «huître à jeun » en milieu contrôlé (Jouaux et al., 2013). Cette étude a montré que le niveau d'alimentation a un effet sur la mise en réserve plus rapide chez des individus alimentés qu'à jeun. Les effets sur la mise en réserve sont plus marqués chez les individus triploïdes suggérant une stratégie de mise en réserve plus efficace que chez les

diploïdes. Deux stratégies distinctes de stockage ont été observées chez les huîtres triploïdes alpha et beta. Les huîtres beta présente une abondance de tissu de stockage résiduel à la fin de l'expérience quel que soit le régime alimentaire alors que les triploïdes alpha ne présentent aucune réserve résiduelle comme chez les individus diploïdes. Les individus beta possèdent une gamétogenèse perturbée avec des proliférations goniales très réduites (Jouaux et al., 2010) laissant ainsi une zone de stockage plus élevée. Chez les individus alpha, la prolifération goniale est plus élevée mais elle est associée à des événements apoptotiques induisant un effort de reproduction inférieur aux individus diploïdes. Ainsi les conditions alimentaires « nourrie » et « à jeun » ont un impact sur la reprise de la gamétogenèse uniquement chez les individus beta. Ces résultats soulignent la complexité de la régulation physiologique de la consommation d'énergie et de la reproduction des individus alpha et beta (Jouaux et al., 2013).

7. Interaction de la triploïdie avec la transmission des valeurs génétiques parentales

L'induction de la triploïdie entraine d'importantes modifications de l'expression des traits phénotypiques génétiquement déterminés. Plusieurs études se sont intéressées aux interactions entre la polyploïdie et la transmission des valeurs génétiques parentales. La valeur génétique se définit par l'effet moyen d'un génotype sur le caractère étudié. Il a été montré que les individus triploïdes sont significativement plus polymorphes que les diploïdes quelle que soit la méthode d'induction de la triploïdie (Magoulas et al., 2000). La polyploïdie peut avoir différents effets sur les valeurs phénotypiques de la descendance.

Elle peut montrer un effet significatif sur les valeurs phénotypiques moyennes de la descendance indépendamment des valeurs génétiques familiales (Riddle et al., 2006). La polyploïdie peut interagir avec les valeurs génétiques en montrant un effet additif sur les valeurs parentales des géniteurs contribuant au génotype de la descendance. Chez le saumon royal, *Oncorhynchus tshawytscha*, l'induction de la triploïdie entraine des niveaux significativement plus élevés de variances phénotypiques pour les caractères liés à la croissance et à la survie. Les saumons triploïdes présentent des valeurs d'héritabilité plus élevées que chez les animaux diploïdes. Ainsi les effets de dosage résultant de l'addition d'un lot supplémentaire de chromosomes sont plutôt additifs. (Johnson et al., 2007). De plus, chez les salmonidés triploïdes, la femelle contribue deux fois plus que le mâle au génome de la descendance. La part de la variance des traits phénotypiques semble globalement attribuable à un effet maternel

augmenté et à un effet paternel diminué (Blanc et al., 2005; Harvey et al., 2017). Enfin, l'interaction entre la ploïdie et la valeur génétique peut également entrainer une rupture totale de la corrélation génétique entre les individus diploïdes et triploïdes. Chez le maïs, *Zea mays L*, des traits phénotypiques liés à la croissance montrent une réponse moyenne commune à l'induction de la polyploïdie mais également un effet de la polyploïdie dépendant de la lignée (Riddle et al., 2006). Les phénomènes d'interaction entre les effets de la triploïdie avec les valeurs génétiques des diploïdes font l'objet d'une attention particulière puisqu'ils ont été mis en évidence chez des espèces cultivées qui font l'objet de recherche en amélioration génétique.

III. Objectifs de la thèse

Dans un but économique, l'ostréiculture s'est diversifiée en produisant des huîtres triploïdes qui ont été développées afin d'obtenir des animaux stériles donc « non laiteux » pendant la période de reproduction (juillet-août) rendant ainsi leur consommation possible tout au long de l'année. Le taux de croissance des individus triploïdes est plus élevé grâce à une réallocation énergétique vers la croissance et permet ainsi de réduire dans certaines conditions l'élevage d'un an sur les trois ans habituels nécessaire à l'obtention des huîtres diploïdes (Allen et Downing, 1986; Garnier-Géré et al., 2002). Des études ont montré la capacité d'une catégorie d'huîtres triploïdes (3n alpha) à mener une gamétogenèse proche des diploïdes et une seconde catégorie avec une gamétogenèse très perturbée (3n beta) (Jouaux et al., 2010). Ceci traduit la forte plasticité de ces individus pour mener une gamétogenèse en fonction de leur ploïdie. Généralement, la faible fécondité de ces individus est attribuée à une mauvaise ségrégation chromosomique avec la production de gamètes aneuploïdes (Guo et al., 1992; Guo et Allen, 1994a; McCombie et al., 2005). A l'heure actuelle, peu d'études ont été menées sur la gamétogenèse des huîtres triploïdes, surtout que les méthodes d'obtention ont évolué depuis la production des premières huîtres triploïdes. Initialement induite par chocs thermique ou chimique induisant la rétention des globules polaires I ou II (Allen et Downing, 1986; Guo et al., 1992; Gérard et al., 1999), elles sont maintenant obtenues par des croisements d'huîtres 2n x 4n (Guo et al., 1996). Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la gamétogenèse des individus diploïdes est particulièrement bien décrite (Berthelin et al., 2001; Franco et al., 2008) tout comme la gamétogenèse des individus triploïdes (Jouaux et al., 2010). Cependant, les mécanismes de régulations moléculaires et cellulaires sont assez mal connus. Ce modèle triploïde est alors un bon candidat pour comprendre les régulations fines de la gamétogenèse

chez un Lophotrochozoaire. De même, ces meilleures connaissances sur la régulation de la gamétogenèse chez l'huître peuvent permettre d'améliorer également l'obtention d'animaux complètement stériles.

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'initiation de la spermatogenèse chez les huîtres triploïdes, *Crassostrea gigas* afin de comprendre les mécanismes cellulaires (compensation chromatinienne) et moléculaires (régulations du cycle cellulaire) qui régulent finement la gamétogenèse induisant deux stratégies de reproduction distinctes chez les individus triploïdes, alpha et beta. Les différences de performances de croissance et de reproduction observées entre les individus triploïdes et diploïdes peuvent également être sous l'influence de changements épigénétiques, c'est pourquoi l'influence des facteurs environnementaux sur les mécanismes régulateurs de la reproduction des huîtres triploïdes a été caractérisée dans cette étude.

Ce travail apporte des données majeures pour comprendre la reproduction des huîtres triploïdes dans le contexte des changements globaux vis-à-vis des populations d'huîtres naturelles diploïdes. Une bonne connaissance de la reproduction des huîtres et de ses mécanismes de régulation est importante pour la gestion des stocks d'élevage diploïdes et triploïdes et également pour l'optimisation de la production de géniteurs pour les écloseries commerciales.

Chapitre 1 : Etude des régulations moléculaires et cellulaires de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* triploïde

Chapitre 1 : Etude des régulations moléculaires et cellulaires de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* triploïde

Les études menées sur la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* ont permis d'obtenir une description détaillée du cycle de gamétogenèse des individus diploïdes (Berthelin et al., 2001) et triploïdes (Jouaux et al., 2010). Contrairement aux individus diploïdes, deux stratégies de reproduction distinctes sont retrouvées chez les individus triploïdes, une catégorie ayant un cycle de reproduction proche des individus diploïdes (3n alpha) et une seconde catégorie présentant une gamétogenèse fortement perturbée (3n beta) (Jouaux et al., 2010). A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes de régulation de la reproduction conduisant à deux catégories reproductrices distinctes chez les huîtres triploïdes. Seule, une étude transcriptomique globale au cours du cycle gamétogénétique a montré que des perturbations de la différenciation sexuelle et de la division cellulaire (mitose) pourraient être responsables de l'altération de la gamétogenèse chez les huîtres triploïdes (Dheilly et al., 2014). Cette étude a permis l'identification de nombreux gènes candidats potentiellement impliqués dans les régulations de la reproduction des huîtres triploïdes, y compris dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, à partir de ces données transcriptomiques, et afin de comprendre les mécanismes de régulation de la gamétogenèse chez les huîtres triploïdes, notre étude propose d'approfondir la régulation des gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire particulièrement, le point de contrôle du fuseau mitotique chez les huîtres triploïdes alpha et beta au cours du cycle gamétogénétique.

I. La division cellulaire

A. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements qui composent la vie d'une cellule. En dehors des divisions, les cellules sont soit en quiescence ou en phase G0, soit en interphase. Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules vont entrer dans un cycle de division cellulaire (Meijer, 2006). Cette série d'étapes varie de manière considérable d'une cellule à une autre. Le cycle cellulaire dépend de l'identité de la cellule (principalement définie par son matériel génétique) ainsi que de son environnement. Il permet donc le maintien d'une informations génétique constante en quantité et qualité au niveau des chromosomes de génération en génération (Le Peuch et Dorée, 2000). C'est un processus fondamental et commun à l'ensemble des cellules eucaryotes et procaryotes. Seulement les mécanismes diffèrent selon ces deux organisations cellulaires. Chez la cellule eucaryote, le cycle se décompose donc en deux phases principales, l'interphase et la division cellulaire [mitose (ou méiose pour les cellules germinales) et cytocinèse] (Figure 11) (Norbury et Nurse, 1992).

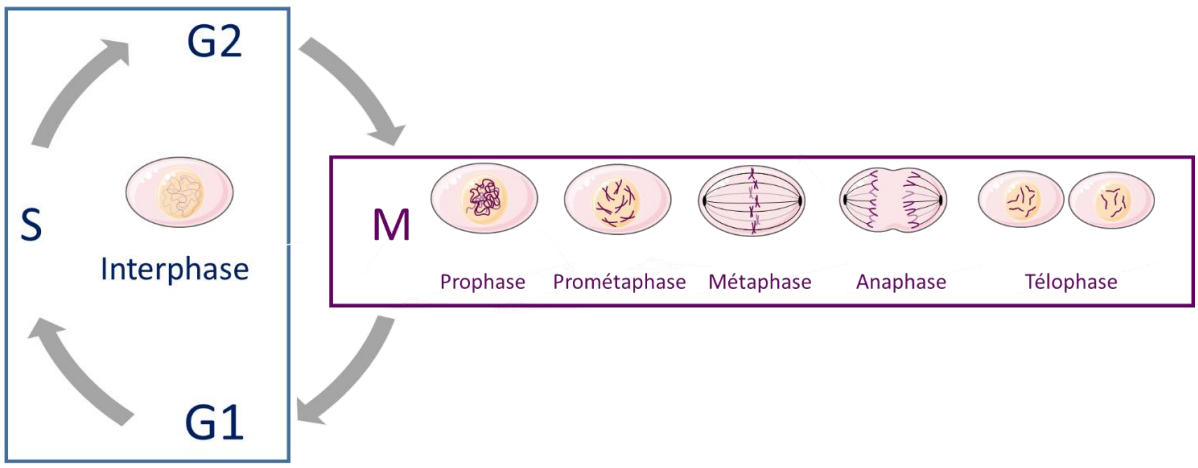


Figure 11 : Schéma général du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se décompose en deux phases principales, l'interphase et la division cellulaire incluant la mitose. L'interphase est constituée de trois phases distinctes appelées G1, S et G2 (G : Gap et S : Synthesis). La mitose est subdivisée en cinq étapes : la prophase, la prométaphase (ou prémétaphase), la métaphase, l'anaphase et la télophase. (Source : la figure a été réalisée grâce aux images de Servier Medical Art).

L'interphase constitue la phase de croissance de la cellule. C'est durant l'interphase que la cellule va passer la plupart de son existence. Lors de cette période du cycle, les chromosomes ne sont pas individualisés et le matériel génétique est sous forme de chromatine condensée (hétérochromatine) ou décondensée (euchromatine). Elle est subdivisée en trois phases distinctes appelées G1, S et G2 (Figure 11 et voir figure 12a, b et c) (Norbury et Nurse, 1992). La première phase dite G1 (G pour Gap « intervalle »), est une phase de croissance de la cellule qui correspond à l'intervalle entre la division cellulaire précédente et la phase de synthèse de l'ADN (phase S, S pour « synthèse »). Lors de cette étape, la cellule synthétise de nombreux éléments moléculaires nécessaires au bon déroulement des phases suivantes par le biais de la transcription et la traduction, et à son fonctionnement. On peut noter par exemple, des éléments de structure (nucléotides, acides aminés…), de régulation (protéines participant à la machinerie du cycle cellulaire) et de synthèse (enzymes nécessaires à la traduction des ARN messagers ou à la réplication de l'ADN) (Galas et al., 2008). C'est aussi et surtout une phase où les cellules intègrent les différents paramètres environnementaux et cellulaires qui permettent à la cellule de s'engager ou non de manière irréversible dans un nouveau cycle cellulaire. Cette décision résulte du franchissement du point de restriction pour les cellules animales (Norbury et Nurse, 1992). La cellule entre ensuite en phase S ou l'événement central est la réplication de l'ADN. Les deux brins d'ADN complémentaires se séparent et leurs séquences sont dupliquées par le biais de l'activation des ADN polymérases et l'intervention de nombreuses autres protéines. Afin de structurer ces nouvelles chaînes d'ADN en nucléosomes pour former la chromatine, cette phase s'accompagne d'une synthèse particulièrement importante de protéines de structure de la chromatine, les histones. C'est également pendant cette phase que les mécanismes moléculaires de contrôle agissent afin de corriger d'éventuelles erreurs d'incorporation d'acides nucléiques. Ces mécanismes assurent ainsi un contrôle qualité du matériel génétique nouvellement synthétisé (Galas et al., 2008). Ensuite, la cellule entre dans une nouvelle phase de croissance appelée G2 pendant laquelle la cellule est animée d'événements de synthèses protéiques et de transcriptions actives qui vont assurer son fonctionnement et préparer l'entrée en phase de mitose (Galas et al., 2008).

B. La division mitotique

Une des phases cruciales du cycle cellulaire est appelée mitose. C'est un processus relativement bien conservé chez la majorité des eucaryotes. Les grandes phases la composant

peuvent donc être décrites de manière commune pour un grand nombre d'organismes, allant de la cellule humaine aux eucaryotes unicellulaires comme la levure (Norbury et Nurse, 1992). La mitose est un processus intervenant dans le noyau des cellules eucaryotes se déroulant pendant la division cellulaire, consistant en la répartition équitable de l'ADN. La division cellulaire se constitue de la séparation de la chromatine accompagnée de la reformation de deux noyaux distincts (mitose) et de la division du cytoplasme (cytocinèse) pour former deux cellules filles. La mitose est se compose donc de la ségrégation *sensu* stricto de la chromatine et d'une caryocinèse permettant au noyau d'une cellule de se dédoubler (Norbury et Nurse, 1992; Bornens, 2003; Galas et al., 2008). Selon le type d'organismes, il existe plusieurs types de division mitotiques avec la division simple, la division équationnelle (la plus fréquente) ou la division somatique (Galas et al., 2008). La mitose est subdivisée en cinq phases : la prophase, la prométaphase (ou prémétaphase), la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 11).

La mitose débute par la prophase, étape au cours de laquelle l'ADN de la cellule se condense jusqu'à ce que les chromosomes s'individualisent et deviennent visibles (McIntosh, 2016). Ces chromosomes sont constitués de deux chromatides sœurs liées entre elles par des structures (ou complexes) appelées cohésines (Zhu et Wang, 2018). Les centrosomes (structures constituées des centrioles et qui organisent les microtubules dans les cellules eucaryotes) se positionnent de chaque côté du noyau pour former par la suite le fuseau mitotique. A ce stade, le trafic nucléocytoplasmique est encore très actif (Figure 12d) (Galas et al., 2008).

Au cours de la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se désassemble dans le cas d'une mitose ouverte tandis qu'elle reste intacte dans les mitoses fermées (répandues chez les protistes et les organismes unicellulaires) (Boettcher et Barral, 2013). A ce stade, chaque chromosome possède une région centromérique, d'une longueur variable selon les organismes allant de quelques centaines de paires de bases comme chez la levure à bourgeon, à plusieurs centaines de paires de bases chez les cellules humaines, au niveau de laquelle les chromatides sont associées (Black et Bassett, 2008). Les microtubules s'assemblent pour former un fuseau bipolaire dont les pôles s'organisent autour de chaque centrosome. Des attachements s'établissent entre les microtubules du fuseau et les chromosomes par l'intermédiaire de structures protéiques appelées kinétochores qui s'associent au niveau des centromères (Figure 12e).

Lors de la métaphase, les microtubules du fuseau mitotique assurent la progression des chromosomes vers la plaque équatoriale de la cellule (Galas et al., 2008). Cette étape cruciale de la mitose est régulée par des points de contrôle qui détectent la présence de chromosomes mal attachés et retardent le passage à l'anaphase (Figure 12f) (voir section IV. Point de contrôle du fuseau mitotique).

L'anaphase est l'étape au cours de laquelle a lieu la séparation et la migration des chromatides sœurs. Cette étape nécessite le clivage des cohésines maintenant les chromatines sœurs unies. Ce clivage dépend de l'activation d'une protéase appelée séparase (Oliveira et al., 2010). La séparation des chromosomes fait intervenir dans un premier temps la migration des chromatides vers les pôles du fuseau grâce aux raccourcissements des microtubules émanant des centrosomes (anaphase A). Dans un second temps, l'allongement du fuseau de division, permet d'éloigner les pôles du fuseaux et les chromosomes loin du centre de la cellule (anaphase B) (Figure 12g et h) (Galas et al., 2008). On notera que ces deux phases peuvent être distinctes ou pas selon le type cellulaire.

Lors de la télophase les chromatines sœurs terminent leur progression vers les pôles de chacune des futures cellules filles. Les chromosomes commencent à se décondenser et l'enveloppe nucléaire se reforme à partir de vésicules qui fusionnent progressivement ensemble dans le cas des mitoses ouvertes (Figure 12i) (Galas et al., 2008). La cytocinèse (ou cytodiérèse) animale débute pendant cette étape. Elle s'appuie sur l'activité d'une structure particulière appelée l'anneau contractile qui apparait au niveau de la membrane plasmique en position équatoriale de division. La contraction de cette structure composée d'actine et de myosine va conduire au clivage de la cellule en deux cellules filles qui comportant maintenant chacune un matériel génétique identique (Figure 12j) (Meijer, 2006; McIntosh, 2016). Chez les végétaux, cette cytocinèse est différente et se fait par la reformation de la membrane plasmique à l'aide de vésicules du reticulum endoplasmique.

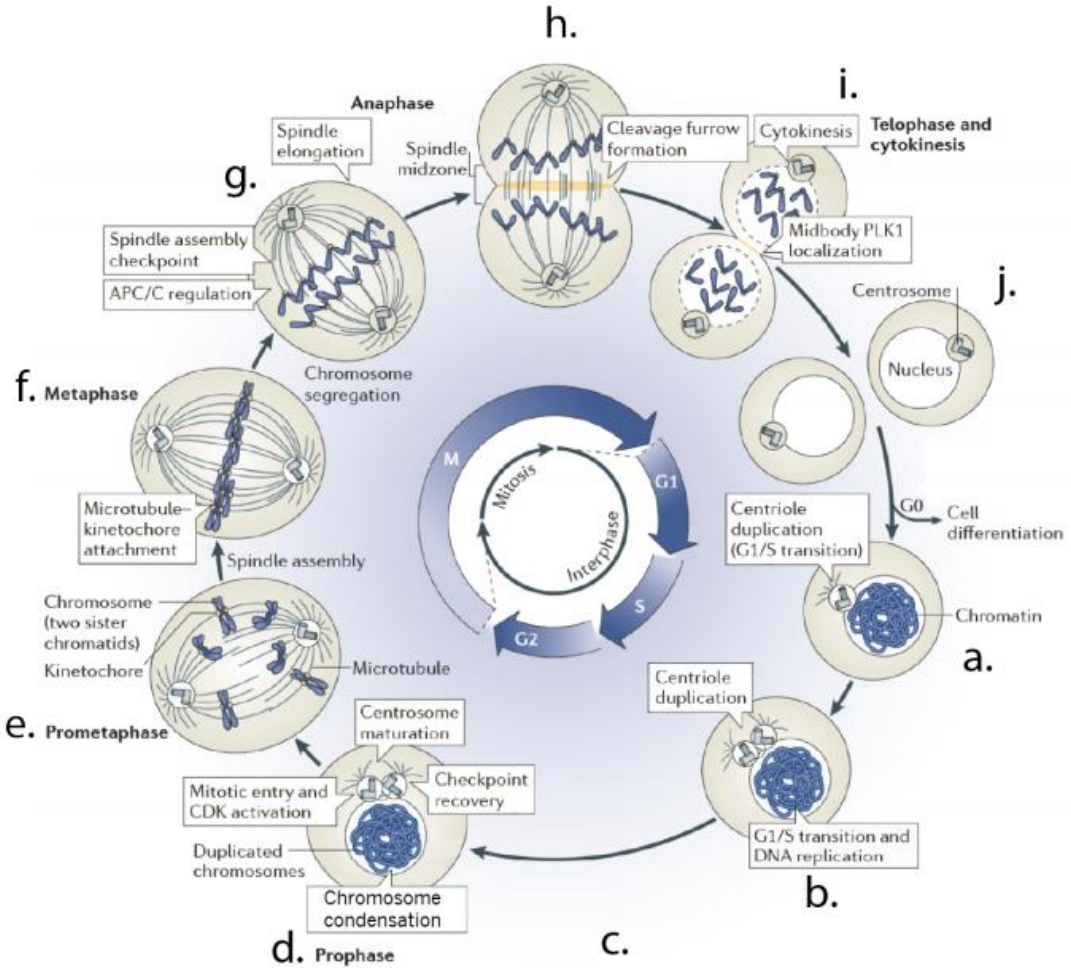


Figure 12 : Déroulement du cycle cellulaire eucaryote et préparation à la mitose. (a) Phase G1: les centrioles initient leur duplication, (b) phase S: l'ADN se réplique, (c) phase G2: la cellule synthétise les protéines nécessaires pour la mitose. (d à i) : Etapes de mitose : (d) prophase: les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire disparaît, (e) prométaphase: capture des chromosomes par les microtubules, (f) métaphase: alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, (g) anaphase A: les chromatides se séparent et migrent vers les pôles du fuseau grâce aux raccourcissement des microtubules émanant des centrosomes, (h) anaphase B: l'allongement du fuseau de division permet d'éloigner les pôles du fuseau et les chromosomes loin du centre de la cellule, (i) télophase : les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme et (j) Cytocinèse: division du cytoplasme et séparation physique des cellules filles. (Modifié de Zitouni et al., 2014 tiré de Landmann, 2017).

C. La division méiotique

La méiose est une division cellulaire spécialisée, spécifique des cellules germinales, permettant de générer des gamètes haploïdes à partir de cellules diploïdes. Contrairement à la mitose où une seule séparation des chromatides par cycle cellulaire a lieu, la division méiotique consiste en une succession de deux ségrégations chromatidiennes sans synthèse d'ADN intermédiaire. Ces divisions sont qualifiées de méioses I et II (Marston et Amon, 2004) (Figure 13). Au cours de ces divisons, les cinq étapes majeures vues précédemment à la mitose s'enchainent et sont en partie conservées. Seule la séparation des chromosomes est différente. Pour la spermatogonie ou l'ovogonie, chaque paire de chromosomes possède deux chromosomes homologues (un chromosome maternel et un chromosome paternel) possédant chacun deux chromatides sœurs. Avant la première division, les chromosomes homologues échangent du matériel génétique par recombinaison homologue (ou « crossing-over »). Ces échanges sont essentiels et permettent un brassage génétique indispensable à la survie de l'espèce (Durand, 1997). La première division méiotique, qualifiée de méiose I, est réductionnelle car elle permet la séparation des chromosomes homologues à deux chromatides. La seconde division est qualifiée d'équationnelle (méiose II) puisqu'elle permet la séparation des chromatides sœurs (Kornbluth et Fissore, 2015).

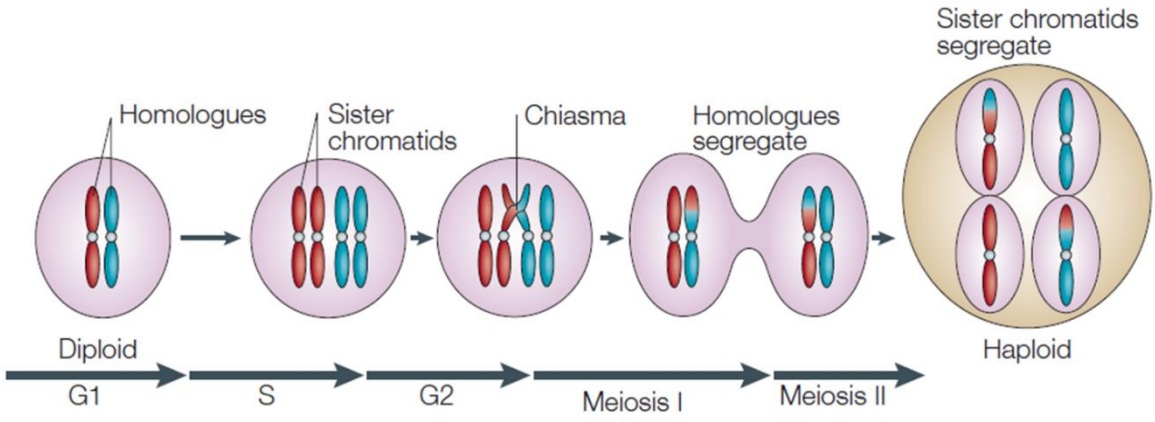


Figure 13 : Schéma de la ségrégation chromosomique lors des méioses I et II. La méiose est constituée de deux divisions successives sans synthèse d'ADN intermédiaire aboutissant à l'obtention de quatre cellules filles haploïdes. Tiré de (Marston et Amon, 2004).

Lors de la prophase de méiose I, la recombinaison homologue consiste en une recombinaison réciproque entre deux chromosomes permettant la formation d'une nouvelle

combinaison génétique grâce à l'échange d'allèles entre les chromosomes. L'échange réciproque de matériel génétique entre les chromatides sœurs de chaque chromosome homologue crée les connections physiques appelées chiasmata. La structure qui résulte de cette association est appelée bivalente (Bishop et Zickler, 2004). Ces échanges permettent d'augmenter la diversité génétique au sein d'une même population (Handel et Schimenti, 2010). On distingue cinq étapes majeures de prophase I (Zickler et Kleckner, 1999). Lors de la première étape appelée leptotène, les chromosomes s'individualisent et subissent des cassures double brin permettant aux chromosomes homologues (ou bivalents) de s'appareiller. Au second stade zygotène, le complexe synaptonémal s'associe aux chromosomes homologues et permet un appariement étroit entre les deux. Au stade pachytène, l'appariement et l'assemblage du complexe synaptonémal sont terminés. C'est à ce stade qu'ont lieu les « crossing-over ». Au stade diplotène, les chromosomes bivalents commencent leur séparation mais restent liés au niveau des chiasmata. Enfin, la diacinèse (dernier stade de prophase), permet la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage des chromosomes au fuseau (Pawlowski et Cande, 2006). En métaphase I, les chromosomes bivalents se placent et s'alignent sur la plaque métaphasique, chaque homologue étant capturé par des fibres de microtubules émanant des pôles opposés de la cellule. Les kinétochores frères d'une paire de chromatide sont co-orientés vers le même pôle. Aussi, les complexes cohésines qui lient ensemble les chromatides sœurs sont essentiels à cette co-orientation (Yokobayashi et Watanabe, 2005). L'élimination de la cohésion le long des bras déclenche l'anaphase I. Les chromosomes homologues s'éloignent les uns des autres grâce à la traction exercée par le fuseau. Ils formeront deux lots de chromosomes à deux chromatides. En télophase I, le fuseau disparait, les chromosomes se décondensent et une nouvelle enveloppe nucléaire peut réapparaitre. Suite à cette première mitose réductionnelle, une mitose équationnelle (ou méiose II) va être initiée sans phase de réplication préalable.

En méiose II, les chromosomes vont de nouveau se condenser. Lors de la métaphase II, ces chromosomes à deux chromatides vont s'aligner sur la plaque métaphasique et le fuseau de microtubules se forme de nouveau. Les kinétochores frères sont désormais bi-orientés permettant un accrochage bipolaire aux chromosomes. Ainsi, chaque chromatide sœur est capturée par des fibres de microtubules et attirée vers les pôles opposés de la cellule. La séparation des chromatides se fait grâce à la destruction des cohésines centromériques. En fin d'anaphase II et de cytocinèse, quatre cellules haploïdes sont produites (Marston et Amon, 2004).

II. Machinerie moléculaire du contrôle du cycle cellulaire

A. Cyclines et kinases dépendantes des cyclines

Les étapes du cycle cellulaire se succèdent toujours dans le même ordre, de la phase G1 à la phase M. Cette séquence temporelle est étroitement régulée par des complexes dimériques formés d'une protéine kinase appelée CDK (« Cyclin Dependant Kinase ») et d'une sous-unité régulatrice appelée cycline (Suryadinata et al., 2010). Si la concentration des CDK reste globalement constante au cours du cycle cellulaire, les cyclines sont synthétisées puis dégradées à des moments précis et c'est donc leur présence qui gouverne la formation des complexes CDK-Cycline au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Kipreos et van den Heuvel, 2019).

Chez les métazoaires, il existe au moins quatre types de cyclines qui jouent un rôle majeur dans la progression du cycle cellulaire (Figure 14). La cycline D associée à CDK4 ou CDK6 permet la progression de la cellule en G1 à la faveur de signaux mitogènes (Sherr, 1995). Par la suite, la cycline E associée à CDK2 est impliquée dans l'entrée en phase S (Koff et al., 1992). La cycline A associée à CDK2 permet la progression de la phase S (Pagano et al., 1992). Enfin la cycline B s'associe à CDK1 pour former le MPF (« Maturation Promoting Factor ») qui permet l'entrée en phase M et la progression jusqu'en métaphase (Jones, 2004). Cette activité MPF est responsable de l'entrée des cellules en phase M à la fois en mitose et en méiose. En plus de leurs associations avec les différentes cyclines, l'activité des CDK dépend de la phosphorylation et de la déphosphorylation de certains résidus et de leur interaction avec des protéines inhibitrices (Figure 14) (Whittaker et al., 2017).

Ce schéma général de régulation est valable pour les cellules animales. Cependant il existe des différences notables chez certains organismes, en particulier chez la levure, *S. cerevisiae*, ou une seule CDK, Cdc28 est suffisante pour réguler l'intégralité du cycle cellulaire. Malgré ces différences, l'association cycline-CDK est constamment retrouvée dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire chez l'ensemble des eucaryotes (Harashima et al., 2013).

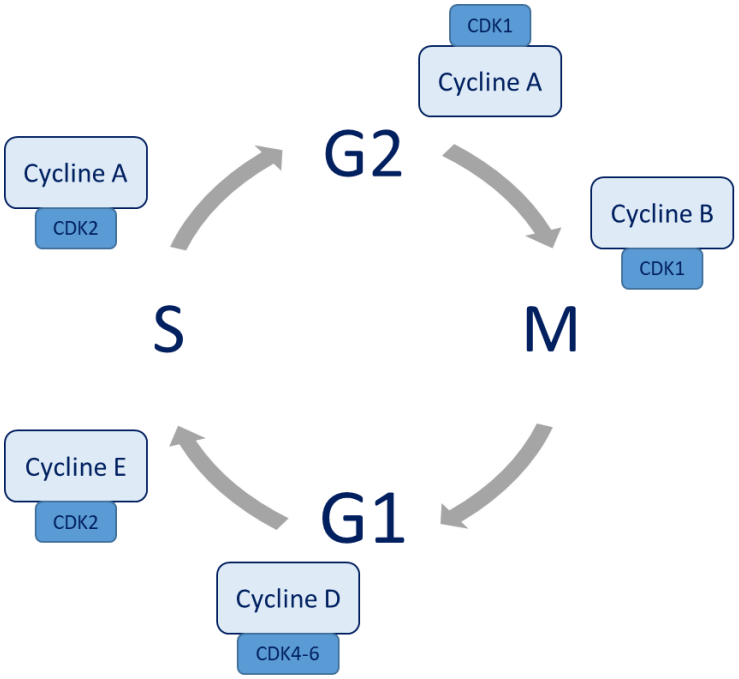


Figure 14 : Phases du cycle cellulaire et leurs contrôles. Au cours du cycle cellulaire, différentes CDK (Cyclin Dependant Kinases) s'associent avec les différentes cyclines dont l'abondance varie selon les étapes du cycle.

B. Protéolyses des protéines du cycle cellulaire

La succession des étapes du cycle cellulaire est rendue irréversible par la dégradation de protéines du cycle en particulier les cyclines. Il existe deux familles d'ubiquitine-ligases qui jouent un rôle majeur dans ce processus, l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome) et le SCF (Skp1, Culling, F-box). L'APC/C comme le SCF sont des ubiquitines ligases de la famille E3, c'est-à-dire qu'elle ajoutent une chaîne d'ubiquitine à leur cibles à partir d'une enzyme E2 (Mocciaro et Rape, 2012; Teixeira et Reed, 2013). L'ubiquitination des protéines cibles permet leur adressage au protéasome qui assure la dégradation de ces protéines poly-ubiquitinylées (Meijer, 2006). L'APC/C est composé d'une douzaine de protéines et acquiert sa spécificité en se liant à des co-activateurs qui sont les protéines Cdc20 (Cell division cycle 20) ainsi que Cdh1 (Cdc20 homologue 1). L'activation du complexe APC/C par sa liaison avec Cdc20 ou Cdh1 est étroitement contrôlée dans le temps par la CDK1. Le complexe APC/C^{cdc20} permet le contrôle de la ségrégation des chromosomes en ciblant la cycline B ainsi que la sécurine pour leur dégradation par le protéasome (Suryadinata et al., 2010). Le complexe

APC/C^{cdh1} est activé après l'anaphase et permet la sortie de mitose en ciblant les protéines de la phase M pour la dégradation (Peters, 2002). Ce complexe est également important pour maintenir un faible niveau de protéines mitotiques après la mitose, ce qui permet la progression en phase G1. Le SCF est un complexe qui régule l'entrée en phase S en initiant la dégradation des inhibiteurs des CDK de la phase S ainsi que l'entrée en mitose en dégradant Emi1 pour l'activation de L'APC/C en fin de phase G2 (Nakayama et al., 2001).

C. Les points de contrôle

Les points de contrôle participent activement à la régulation du cycle cellulaire. Ce sont des systèmes de surveillance qui permettent d'arrêter la progression du cycle cellulaire en cas de problème (Khodjakov et Rieder, 2009). Dans le paragraphe suivant, seuls deux points de contrôle seront développés : le point de contrôle des dommages à l'ADN et le point de contrôle du fuseau mitotique (Figure 15).

Le premier point de contrôle à avoir été découvert est le point de contrôle aux dommages de l'ADN (DNA Damage Checkpoint ou DDC) qui bloque la progression du cycle cellulaire si la présence de lésions de l'ADN est détectée dans la cellule (Figure 15). Ainsi, il empêche la réplication d'ADN endommagé. Lorsque l'ADN est endommagé en G1, la protéine Chk2 (Checkpoint kinase 2) est activée et permet de retarder l'activation de CDK2 associée aux cyclines A et E retardant l'entrée en phase S. En phase G2, la présence de lésions dans l'ADN induit l'activation de Chk1 (Checkpoint kinase 1) et permet de retarder l'entrée en phase M en gardant CDK1 inactive (Carr et al., 1995). Enfin, DDC permet de mobiliser les facteurs de réparation de lésions de l'ADN.

Le second point de contrôle du cycle cellulaire est le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (« Spindle Assembly Checkpoint » ou SAC). Il permet la vérification de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique empêchant ainsi la cellule d'entrer en anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement appariés au fuseau et alignés sur la plaque métaphasique. Ce système de contrôle permet d'éviter des erreurs de ségrégation des chromosomes favorisant l'aneuploïdie (Figure 15) (Matellán et Monje-Casas, 2020). Ce point de contrôle sera décrit plus précisément dans le paragraphe intitulé point de contrôle du fuseau mitotique.

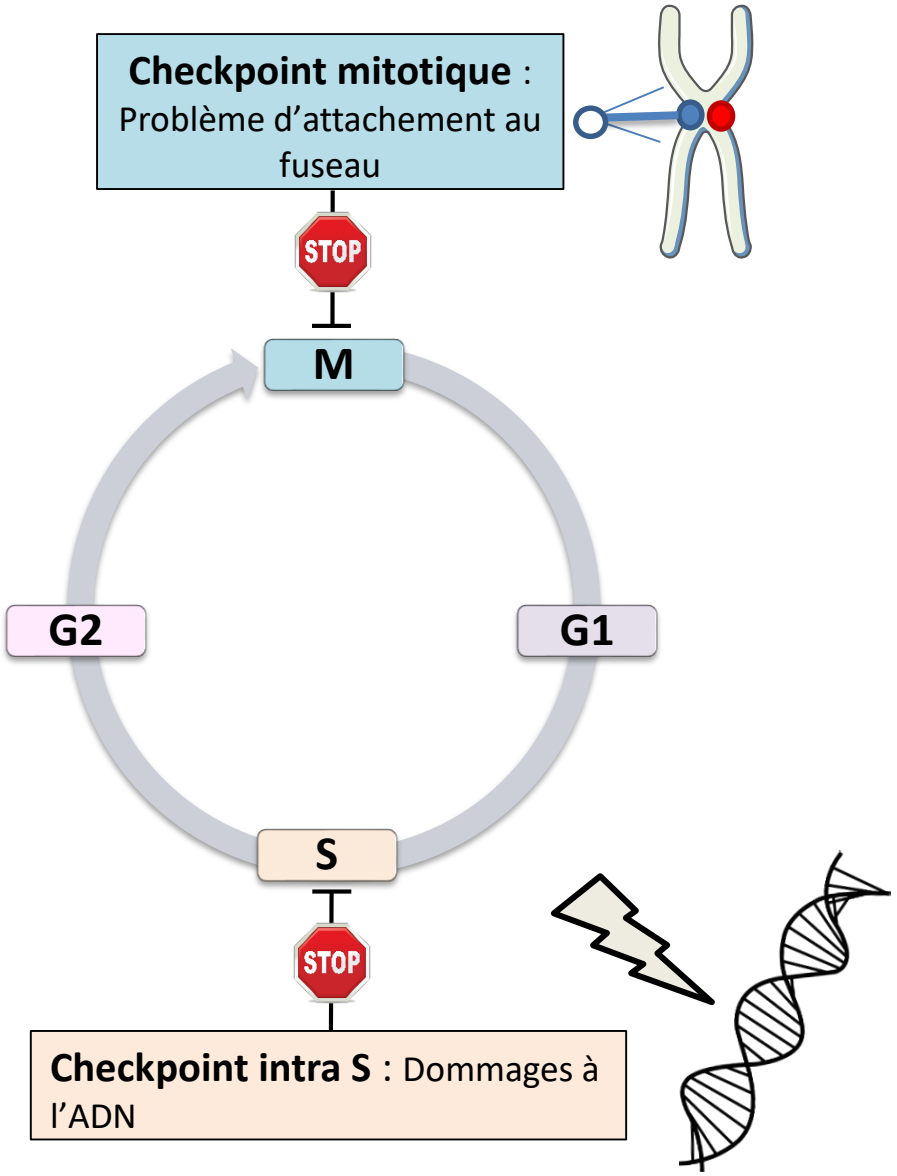


Figure 15: Points de contrôle du cycle cellulaire. Le premier point de contrôle (Checkpoint intra S ou DDC (DNA Damage Checkpoint)) surveille l'intégrité du génome après la réplication et le second (Checkpoint mitotique ou SAC (Spindle Assembly Complex)) vérifie l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau et retarde l'anaphase tant que l'ensemble des kinétochores ne sont pas attachés.

III. Les attachements kinétochore-microtubule et le fuseau

A. Les microtubules

A chaque division cellulaire, la distribution du matériel génétique en deux lots identiques aux cellules filles est assurée par le fuseau de division bipolaire, formant un réseau entre les deux pôles opposés de la cellule. Celui-ci est formé par un ensemble très organisé de microtubules. Les microtubules sont des structures tubulaires formées par un assemblage de protofilaments (au nombre de 13) constitués eux même d'hétérodimères de tubulines alpha et beta qui s'associent toujours dans la même direction (Figure 16) (Meijer, 2006; Akhmanova et Steinmetz, 2015). Les microtubules sont des structures très dynamiques qui s'allongent par un pôle (+) et se raccourcissent par un pôle (–) aux deux extrémités. Cette dynamique est influencée par la quantité de tubulines libres présentes dans le cytoplasme, un équilibre se créant entre la quantité de tubulines libres et la quantité de tubulines polymérisées. Cependant cette dynamique de polymérisation/dépolymérisation est indispensable pour l'exercice de la fonction du fuseau dans la capture des chromosomes en prophase jusqu'à la ségrégation lors de l'anaphase (Akhmanova et Steinmetz, 2015; Knossow et al., 2020).

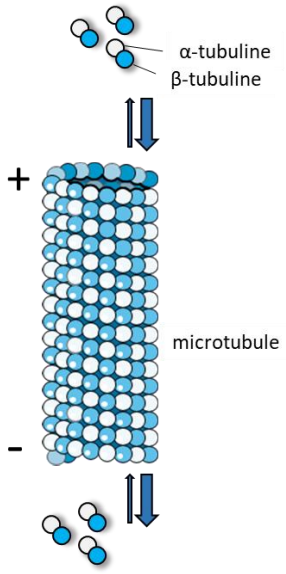


Figure 16 : Structure d'un microtubule. Les microtubules sont formés par l'assemblage de 13 protofilaments qui s'associent latéralement entre eux. Ces protofilaments sont des polymères composés de dimères de tubulines alpha et beta qui s'associent toujours dans la même direction avec une extrémité (–) exposant des tubulines alpha et une extrémité (+) exposant des tubulines beta. La polymérisation est plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (–) notamment par le fait que les dimères de tubulines s'ajoutent préférentiellement sur une tubuline beta. Ainsi le microtubule va croître de l'extrémité (+) et se dépolymériser de l'extrémité (-).

B. Assemblage du fuseau

En mitose et en méiose, la formation d'un fuseau bipolaire constitué d'un réseau organisé de microtubules est commune à l'ensemble des eucaryotes (McIntosh, 2016). Le fuseau est constitué d'un assemblage bipolaire de trois types de microtubules. Les microtubules kinétochoriens (k-fibre) s'attachent aux chromosomes via les kinétochores et sont à l'origine des forces de traction qui s'exercent sur les kinétochores. Les microtubules non kinétochoriens (nK-MT) se chevauchent dans la zone centrale du fuseau et sont à l'origine de la bipolarité du fuseau. Enfin, les microtubules astraux (A-MT) partent des deux pôles vers le cortex et permettent un positionnement correct du fuseau (Figure 17) (Dumont et Mitchison, 2009).

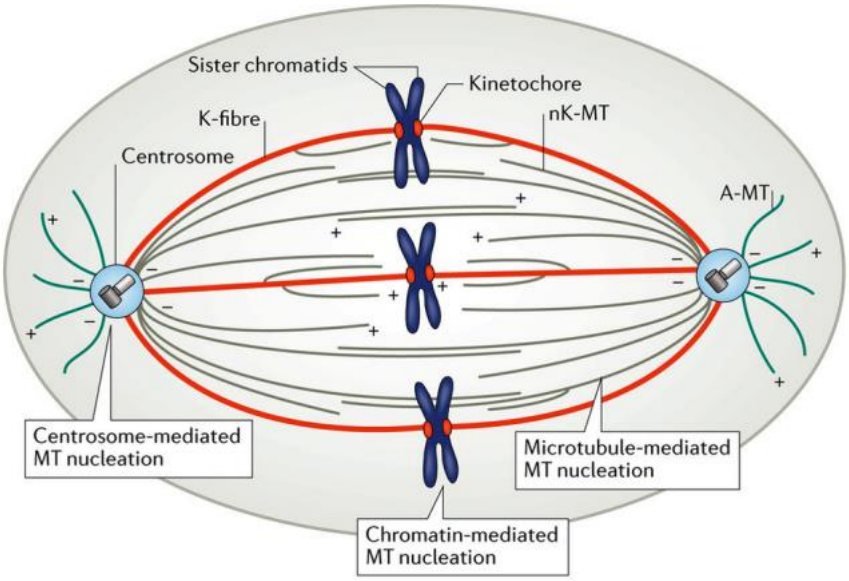


Figure 17 : Structure du fuseau mitotique au cours de la métaphase. Les extrémités (-) des microtubules sont localisées au niveau des pôles du fuseau, composés des centrosomes et du matériel péricentriolaire. Les extrémités (+) des microtubules polymérisent vers le cortex et vers l'équateur de la cellule. Lors de la formation du fuseau mitotique, les microtubules sont nucléés à partir des centrosomes, de la chromatine, des kinétochores et d'autres microtubules. Le fuseau mitotique est un assemblage de trois types de microtubules : les microtubules kinétochoriens (k-fibre) qui relient les chromosomes aux pôles du fuseau, les microtubules astraux (A-MT ; MT : microtubules) qui relient les pôles du fuseau mitotique au cortex de la cellule et les microtubules non kinétochoriens (nK-MT) qui se lient de façon antiparallèle entre les deux pôles du fuseau mitotique. Tiré de (Prosser et Pelletier, 2017).

Dans une cellule en mitose, les microtubules sont nucléés à partir d'un centre organisateur appelé centrosome (ou MTOC : MicroTubule Organizing Complex). Celui-ci est constitué d'une paire de centrioles (cylindres formés de microtubules servant d'amorces à la polymérisation des microtubules) entouré de matériel péricentriolaire où sont ancrés les complexes de nucléation (Figure 18). Le principal composant du matériel péricentriolaire est le γTURC (« γ-Tubulin Ring Complex »), un complexe en forme d'anneau composé de γ-tubuline et d'autres protéines, d'où sont nucléés les microtubules (Bazin et Rémy, 2006). Les microtubules vont croitre dans toutes les directions à partir de ce matériel péricentriolaire à la recherche des chromosomes. Ce modèle est appelé « recherche et capture » et constitue le principal moyen d'initier l'attachement des chromosomes avec le fuseau dans les cellules mitotiques (Helmke et al., 2013; McIntosh, 2016). Le centrosome n'est pas le seul centre de nucléation des microtubules. Chez certains organismes comme les mammifères, la méiose se déroule sans centrosome (Dumont et Desai, 2012). Il a été montré que la présence de centrosomes n'est pas indispensable pour la formation du fuseau mitotique (Khodjakov et al., 2000). En effet, les microtubules sont également nuclées à partir de la chromatine, des kinétochores et à partir d'autres microtubules (Kitamura et al., 2010; Petry et al., 2013). Pour exemple, les végétaux terrestres forment des fuseaux anastraux ou acentrosomiques, malgré une grande conservation des facteurs impliqués dans l'organisation du fuseau, hormis certaines protéines du centrosome et du complexe dynéine (Yamada et Goshima, 2017).

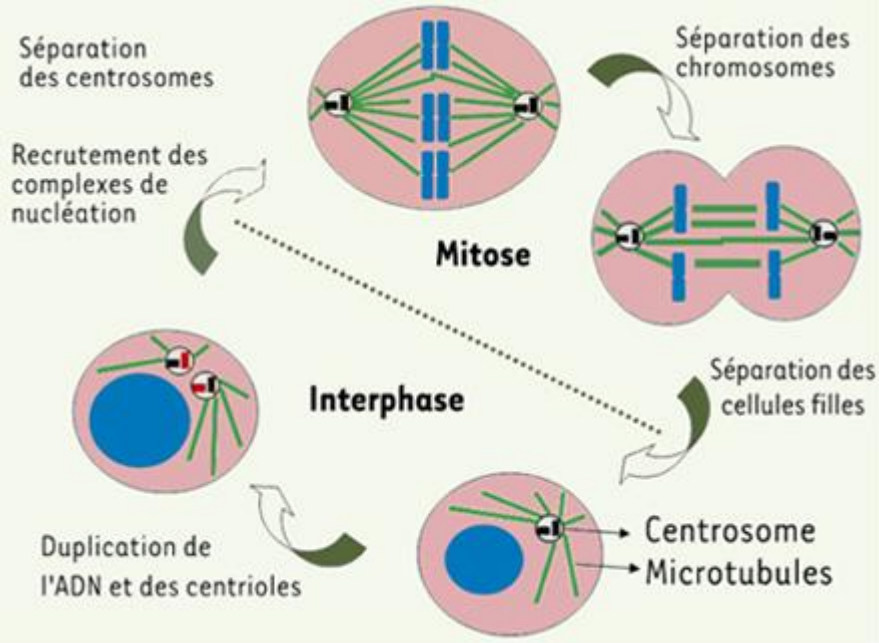


Figure 18 : Le centrosome (centre organisateur des microtubules cellulaires). Le centrosome est formé de l'assemblage de deux centrioles entourés de matériel péricentriolaire où sont nucléés les microtubules. Le centrosome se dédouble lors de l'interphase et dès l'entrée en mitose, les deux centrosomes se séparent afin d'assurer le recrutement des complexes de nucléation pour former le fuseau mitotique. Tiré de : (Bazin et Rémy, 2006).

C. Attachement des kinétochores aux microtubules

Les kinétochores constituent un assemblage protéique complexe qui s'associent au niveau des centromères des chromosomes. Ils permettent l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau générant ensuite une force de traction lors de la transition métaphase-anaphase (Figure 19) (Cheeseman, 2014). Chez les vertébrés, ce complexe se compose d'une centaine de protéines. Il est composé de trois parties : une région interne accolée au centromère , le CCAN (« Constitutive Centromere Associated Network » ou « inner kinetochore »), une région intermédiaire peu dense qui contient notamment des protéines régulatrices du SAC comme BubR1, Bub3, Mad1 et Mad2 (voir partie IV-B Le SAC en mitose) et une région externe dense associée aux microtubules appelée KMN (« Knl1, Mis12, Ndc80 » ou « outer kinetochore ») (Takeuchi et Fukagawa, 2012).

Un des points critiques de la division cellulaire en prométaphase est la capture des chromosomes via leur kinétochore. L'attachement des kinétochores aux microtubules est

indispensable pour la migration des chromosomes sur la plaque équatoriale ainsi que pour la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase. En mitose, chaque kinétochore frère doit être attaché à un pôle opposé du fuseau, cet attachement est appelé amphitélique. Ainsi, les microtubules tirent les chromatides sœurs dans des directions opposées (Hauf et Watanabe, 2004; Cheeseman, 2014). Une tension est exercée entre les kinétochores frères (tension interkinétochorienne) mais également au niveau d'un seul kinétochore en sa partie interne et externe (tension intrakinétochorienne) (Hara et Fukagawa, 2020). En méiose I, les attachements sont différents de ceux de mitose. Les kinétochores frères doivent lier les microtubules de façon synthélique pour permettre la mono-orientation des chromatides sœurs et la bi-orientation des chromosomes homologues (Hauf et Watanabe, 2004). Il n'y a donc pas de tension interkinétorochienne, seule une tension intrakinétochorienne peut s'appliquer ainsi qu'une tension entre les chromosomes homologues au niveau des chiasmata (Hara et Fukagawa, 2020).

La capture des kinétochores par les microtubules est un processus aléatoire. Il peut arriver que les deux kinétochores frères s'attachent au même pôle du fuseau (attachement synthélique) ou même qu'un même kinétochore soit attaché simultanément aux deux pôles (attachement mérotélique) (Prosser et Pelletier, 2017). Ces attachements ne permettent pas une ségrégation correcte des chromosomes en mitose. Tout comme en méiose I, où les chromosomes doivent être bi-orientés. Par conséquent les kinétochores frères d'un chromosome homologue doivent être mono-orientés vers un pôle et ceux de l'autre chromosome vers l'autre pôle. Ainsi l'attachement amphitélique des kinétochores frères comme en mitose n'est pas un attachement correct en méiose I (Watanabe, 2012). Il existe dans la cellule des mécanismes conservés de correction d'erreur qui permettent une bonne ségrégation des chromosomes lors de la mitose et la méiose.

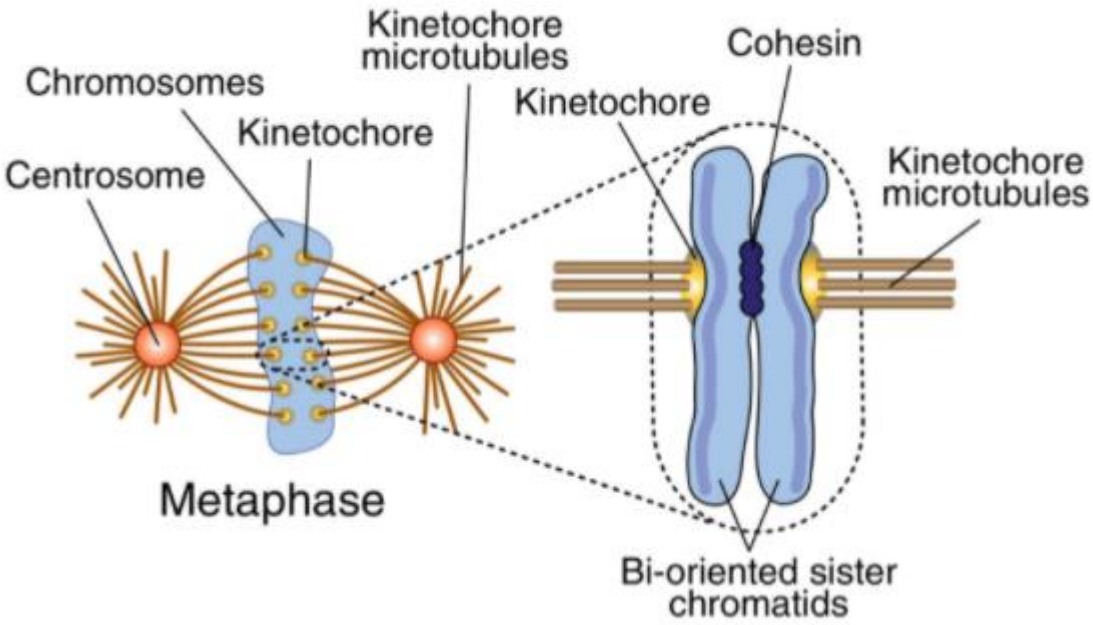


Figure 19 : Représentation schématique du fuseau mitotique et des chromosomes en métaphase. Les microtubules (marron) provenant des pôles du fuseau capturent les chromosomes au niveau des kinétochores (points jaune). Les deux chromatides sœurs des chromosomes sont maintenues ensemble par les cohésines. Tiré de : Pesenti et al., 2016.

IV. Le point de contrôle du fuseau (SAC ou Spindle Assembly Complex)

En mitose comme en méiose, le déclenchement de l'anaphase est un événement qui doit être finement régulé pour éviter les erreurs de ségrégation. La séparation des chromosomes est déclenchée par l'APC/C dont le rôle est d'adresser des protéines spécifiques au protéasome. Le point de contrôle du fuseau joue un rôle essentiel dans la régulation de l'APC/C pour coordonner la transition métaphase/anaphase (Meijer, 2006; Cheeseman, 2014).

A. Transition métaphase-anaphase

Jusqu'à la métaphase de mitose, les chromatines sœurs sont maintenues entre elles par un complexe protéique appelé cohésine. C'est la dégradation des cohésines qui marque l'entrée en anaphase. En effet, une fois le lien entre les chromatides sœurs disparu, chaque chromatide

migre en direction du pôle vers lequel elle est attaché (Hauf et Watanabe, 2004). En méiose I, seules les cohésines présentes sur les bras des chromosomes au niveau des chiasmata sont clivées en anaphase I pour permettre la séparation des chromosomes homologues et les cohésines centromériques ne sont clivées qu'en méiose II pour permettre la séparation des chromatides sœurs (Zhu et Wang, 2018). En mitose et en méiose c'est l'activation de la séparase qui permet le clivage des cohésines lors de l'anaphase (Figure 20). En prométaphase, la séparase est maintenue inactive grâce à sa liaison avec la sécurine qui agit comme un inhibiteur de la séparase. A la transition métaphase-anaphase, la séparase est activée suite à la dégradation de la sécurine. La séparase est également inhibée par le complexe CDK1-cycline B. La dégradation de la cycline B permet la sortie de la mitose ou de la méiose I. La dégradation de la sécurine et de la cycline B est médiée par L'APC/C^{CDC20} qui les adresse au protéasome (Peters, 2002). Le point de contrôle du fuseau également appelé SAC permet la synchronisation entre l'attachement des chromosomes et le début de l'anaphase (Figure 20).

B. Le SAC en mitose

Il est crucial d'éviter une activation précoce de l'APC/C en métaphase pour éviter les erreurs de ségrégation entrainant de l'aneuploïdie (Potapova et Gorbsky, 2017). Le SAC contrôle l'entrée en anaphase et maintient l'APC/C inactif afin d'empêcher la dégradation de la sécurine et de la cycline B tant que les chromosomes ne sont pas tous attachés au fuseau (Meijer, 2006) (Figure 20). Le SAC a initialement été découvert en mitose chez la levure *S.cerevisiae* dans les années 1990 par des approches génétiques. Ces études pionnières ont permis d'identifier de nombreux acteurs de ce point de contrôle (Hoyt et al., 1991; Li et Murray, 1991). Puis chez d'autres organismes, notamment chez les vertébrés, différents acteurs protéiques du SAC tels que Mad1 et Mad2 (Mitotic Arrest Deficient) ; Bub1, Bub2 et Bub3 (Budding Uninhibited by Benomyl) ; Mad3/BubR1 (Budding Uninhibited by Related Benomyl) ont été mis en évidence. Tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés, les protéines du SAC sont localisées au niveau des kinétochores et génèrent un signal inhibiteur de l'APC/C (Figure 20) (Yu, 2002). Certaines protéines du SAC semblent plus aptes à percevoir le manque d'attachement et d'autres, le manque de tension. Mad1 et Mad2 sont localisées au niveau des kinétochores non attachés en prométatphase. Le niveau de Mad2 est ensuite réduit de 50 à 100 fois en métaphase par rapport à sa quantité en début de prométaphase. Tout comme Mad2, Mad1 s'accumule au niveau des kinétochores non attachés et disparait après l'attachement. La localisation de ces protéines aux kinétochores traduit donc le manque d'attachement. Bub1 et

BubR1 sont également présentes au niveau des kinétochores non attachés en prométaphase mais ils disparaissent après Mad2 en métaphase. La quantité de ces protéines est réduite de moitié mais elles restent présentes jusqu'à la métaphase. Cela suggère que Bub1 et BubR1 seraient sensibles à l'attachement et à la tension en mitose (Musacchio et Salmon, 2007; Musacchio, 2015).

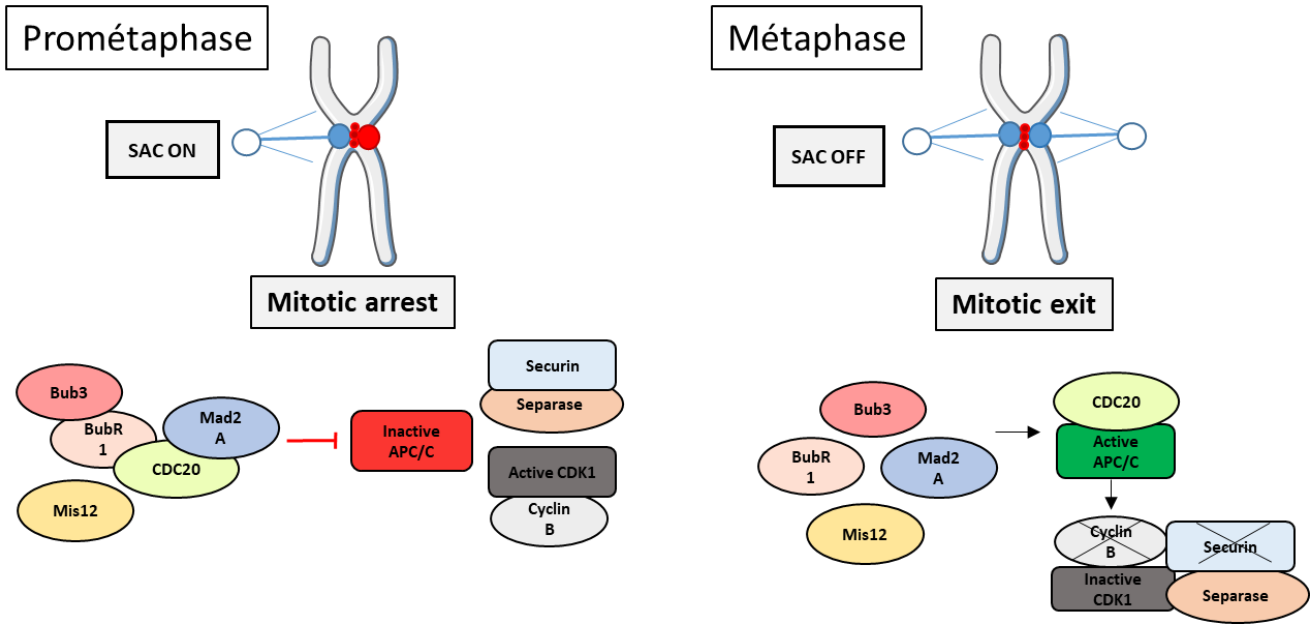


Figure 20 : Recrutement des protéines du SAC et inhibition de l'APC/C^{Cdc20}. Un kinétochore non attaché génère un signal inhibiteur de l'APC/C (à gauche, SAC ON). Lorsque les chromosomes sont correctement attachés et mis sous tension, l'APC/C est actif et permet la dégradation de la sécurine et de la cycline B1 (à droite, SAC OFF). Ainsi, la séparase n'est pas inhibée par la sécurine et peut cliver les cohésines permettant la ségrégation des chromosomes.

C. Le SAC en méiose

Les premières études portant sur le contrôle de la division méiotique ont été réalisées dans les années 1960 sur des spermatocytes d'insectes. L'intérêt de ces cellules est qu'elles possèdent une taille suffisante pour être manipulées sous microscope. Une particularité étonnante est l'appariement des chromosomes sexuels. En effet, il existe deux chromosomes X et un chromosome Y. Ces trois chromosomes s'apparient pour former un trivalent. Dans 10% des cas, l'appariement pour former un trivalent n'est pas complet et un chromosome X reste seul, ce qui entraine un blocage en méiose I et les cellules ne forment jamais de spermatozoïdes. L'application d'une tension opposée à cet univalent suffit à déclencher l'anaphase (Callan et

Jacobs, 1957). Chez les mammifères, l'existence d'un point de contrôle du fuseau en méiose I a été controversée pendant de longues années bien que des ovocytes de souris en présence de nacodazole restent arretés en métaphase I (Brunet et al., 1999). L'implication du SAC dans les ovocytes de mammifères a été démontrée par des approches génétiques. La déplétion des protéine du SAC telles que Mad2 ou BubR1 entraine chez la souris une entrée prématurée des ovocytes en anaphase générant une dégradation précoce de la sécurine et de la cycline B. Sans point de contrôle fonctionnel, les ovocytes sont majoritairement aneuploïdes en méiose II suite à des erreurs de ségrégation des chromosomes (Niault et al., 2007; McGuinness et al., 2009). D'autres études ont montré que les protéines du SAC, Mad1 et 2, Bub1 et 3, BubR1 sont détectables au niveau des kinétochores non attachés en début de prométaphase puis disparaissent progressivement avant la transition métaphase anaphase (Sun et Kim, 2012). Tout comme en mitose, tant que les attachements ne sont pas corrects, le SAC génère un signal d'attente en inhibant l'APC/C.

V. Objectifs

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à la compréhension des mécanismes de régulation de la spermatogenèse chez les individus triploïdes alpha et beta par rapport aux individus diploïdes (Figure 21). Chez l'huître creuse diploïde, la spermatogenèse aboutit à la formation de spermatozoïdes matures. Chez l'huître creuse triploïde, deux stratégies de reproduction distinctes sont observées. Les huîtres triploïdes alpha parviennent à produire des spermatozoïdes matures, elles passent donc les étapes de mitose et méiose de la spermatogenèse avec succès. Cependant la quantité de spermatozoïdes matures est très inférieure à celle rencontrée chez les individus diploïdes. La faible proportion de gamètes résultant de la spermatogenèse des individus alpha est-elle liée à une plus faible quantité de cellules germinales dès l'initiation de la spermatogenèse, à des phénomènes d'apoptose, ou à un échappement du SAC ? Les huîtres triploïdes beta, quant à elles, ne parviennent peu ou pas à réaliser la spermatogenèse, donc probablement pas à passer les étapes de mitose et/ou méiose. Chez les individus triploïdes beta un blocage précoce lors des phases de prolifération des cellules germinales, probablement en prophase de mitose (stade 1) a été décrit par Jouaux et al., 2010. Ce blocage inhibe l'initiation de la spermatogenèse et persiste au cours du cycle de gamétogenèse. Quels sont les acteurs responsables de ce blocage ? A quel moment se met-il en

place ? Une étude globale du transcriptome des huîtres triploïdes alpha et beta a montré une régulation à la baisse des gènes associées à la division cellulaire et une régulation à la hausse des gènes liés à la réparation de l'ADN et l'apoptose (Dheilly et al., 2014). De plus, une implication du point de contrôle mitotique du cycle cellulaire a été suspectée dans la réussite de la gamétogenèse chez l'huître triploïde alpha (Dheilly et al., 2014). Quelles sont les régulations des acteurs de ce point de contrôle mis en jeu au cours du cycle de gamétogenèse des individus triploïdes alpha et beta ?

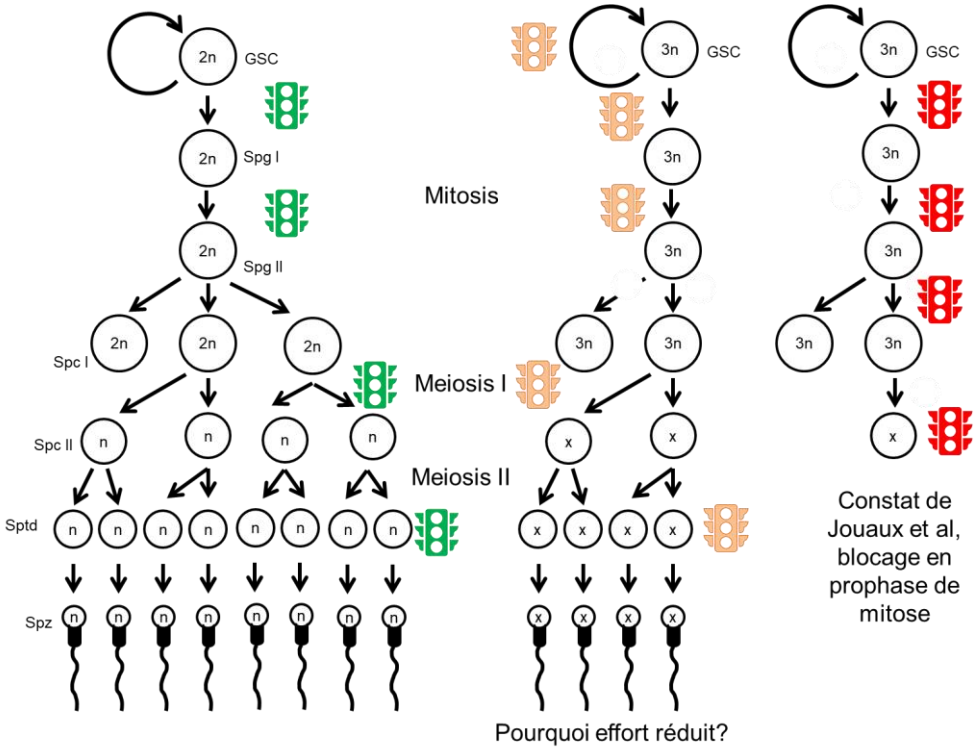


Figure 21 : Description schématique du déroulement de la spermatogenèse chez l'huître creuse diploïdes (2n) et hypothèses sur les régulations mises en jeu chez triploïdes (3n) alpha et beta. GSC : Cellule souche germinale, Spg I : Spermatogonie I, Spg II : Spermatogonie II, Spc I : Spermatocyte I, Spc II: Spermtocytes II, Sptd: Spermatides et Spz: spermatozoïdes.

Afin de comprendre les mécanismes de régulation de la reproduction aux niveaux cellulaire et moléculaire induisant deux stratégies de reproduction distinctes chez les huîtres triploïdes, alpha et beta, le cycle de gamétogenèse des individus mâles a été suivi par histologie pour permettre la description fine des étapes du cycle de reproduction de ces deux catégories

d'huîtres triploïdes. A partir des coupes histologiques des huîtres diploïdes et triploïdes mâles, l'effort de reproduction des individus a été également quantifié au cours du cycle de gamétogenèse (stades 0 à 3) (Partie VI.A).

Une analyse du nombre de tubules présents dans l'aire gonadique et de l'aire de ces tubules a été menée lors de l'initiation de la spermatogenèse chez les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta. Cette analyse avait pour but de définir si la différence d'effort de reproduction chez les huîtres triploïdes pouvait être associée à une altération de la mise en place du tractus gonadique avant la spermatogenèse (Partie VI.A).

Dans un second temps, les régulations cellulaires et moléculaires ont été étudiées chez les huîtres triploïdes alpha et beta mâles par la mesure de l'expression de facteurs régulateurs du cycle cellulaire (qPCR). Nous nous sommes particulièrement focalisés sur le point de contrôle du fuseau mitotique. La mesure de l'expression des acteurs du point de contrôle du fuseau mitotique a été réalisé au cours du cycle de gamétogenèse (Stades 0 à 2) afin de comprendre si des perturbations des points de contrôle de la division cellulaire étaient mises en jeu à la fois en mitose et en méiose. Enfin, des expériences d'immunofluorescence à l'aide d'un marqueur mitotique (Histone H3 phosophorylée sur la Sérine 10, H3S10p) ont été menées pour permettre la caractérisation du point de blocage des individus triploïdes beta au cours de la mitose. Cette dernière partie fait l'objet de l'article ci-dessous (Partie VI.A). En parallèle, pour déterminer si ces points de contrôles n'étaient pas altérés dans un tissu somatique, les mêmes analyses transcriptionnelles ont été réalisées sur les branchies (VI.B.1).

Des études précédentes suggéraient que des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN étaient également mis en jeu pour réguler la gamétogenèse des huîtres triploïdes. Aussi, une dernière analyse transcriptionnelle sur différents acteurs de réparation a été réalisée (Partie VI.B.2).

Pour déterminer si le blocage de certains individus triploïdes au cours de la spermatogenèse pouvait être également lié à des perturbations dans la ségrégation des chromosomes, une approche par cytogénétique a également été initiée (partie VI.B.3).

VI. Résultats

A. Perturbations de la mitose et de la méiose associées à la triploïdie

Reproductive regulations in male triploids oysters, *Crassostrea gigas*- potential disruptions in mitosis and meiosis during early spermatogenesis.

Maillard Floriane [1,2], Elie Nicolas [1,3], Martinez Anne-Sophie [1,2], Villain-Naud Nadège [1,2], Lepoittevin Mélanie [1,2], Lelong Christophe [1,2,4]

[1] Unité de Formation et de Recherches (UFR) des sciences, Université de Caen Normandie, 14032 Caen CEDEX, France.

[2] Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), FRE2030, Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche et Développement (IRD), Sorbonne Université (SU), Université de Caen Normandie (UCN), Université des Antilles (UA), 75231 Paris CEDEX, France.

[3] Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, SF4206 Interaction Cellule-Organisme-Environnement (ICORE), Université de Caen Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen CEDEX, France.

[4] Oestrogènes et Reproduction (OeReCa), EA2608, Université de Caen Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen CEDEX, France.

Abstract

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas* is a successive irregular hermaphrodite mollusc which has an annual and seasonal breeding cycle. Like most of living beings, oysters are naturally diploid organisms. For shellfish aquaculture, triploids oysters have developed in order to obtain sterile animals. However, studies have shown that part of them are able to carry out (1) a gametogenesis with numerous proliferating cells closed to diploids (they are named 3n α) or (2) a partial one with an accumulation of locked germ cell (they are named 3n β). Our study aspires

therefore to understand the regulations of spermatogenesis in both α- and β groups of triploid oysters from the beginning of spermatogenesis, during mitosis and meiosis events. Thus our results demonstrated that triploid animals (3nα) show an active gametogenesis, the effort was halved compared to diploids. For triploid oysters (3nβ), its drop eight times. It demonstrates also that the reduced spermatogenesis in triploids results from a deregulation of the development of the germinal lineage and the establishment of the gonadal tract leads by a lower number of tubules. Morphological cellular investigation reveals also an abnormal condensation of nuclei of germ cells and the presence of clear patches in the nucleoplasm of triploid oysters, more marked in blocked animals. Then, molecular and cellular regulation studies show a downregulation of mitotic spindle checkpoint in β triploid oyster resulting in disturbance of chromosomal segregation, notably on the SAC (Spindle Assembly Checkpoint) involved to attach the microtubules into the chromosomes. To characterize the moment of the blockade of mitosis in β oyster germ cells and the behaviour of the chromatin, we are followed the epigenetic marker Histone H3 phosphorylated on the Serine 10 (H3S10p) by immunofluorescence. This allowed approach relieves that the blockage of β triploid germ cells occurs between the end of prophase and the start of prometaphase. Taken together, our results suggest that the lower reproductive effort encountered in triploid oysters may be due to cellular and molecular events such as an impairment of spermatogenesis and disruptions of mitosis and meiosis, occurring early and at various stages of the gametogenetic cycle (stages 0 to 2).

Keywords: *Crassostrea gigas,* oysters, triploidy, spermatogenesis, reproductive effort, cell cycle, mitotic spindle checkpoint, chromatin remodelling.

Introduction

The Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) is a successive and irregular hermaphrodite, predominantly male during the first year and then able to change sex at each reproductive season (Normand et al., 2009). Its protandry has recently been questioned (Broquard et al., 2020). Its gonad corresponds to a network of gonadal tubules imbricated in a connective tissue including the storage tissue. Its breeding cycle is annual and seasonal with four different stages of gametogenesis which were described by Guo et al., (1998); Berthelin et al., (2001); Franco et al., (2008). During the sexual resting stage (stage 0), only some undifferentiated germ cells with no mitotic activity are present in the gonadal tubules, they do not allow sex identification. The stage 1 is characterised by gonial proliferation, the sex of individuals can be determined by histological methods at the end of the stage. During the stage

2, successive differentiations (active spermatogenesis or oogenesis) conduct the gonadal cells to the stage 3, corresponding to the mature reproductive stage (Berthelin et al., 2001; Fabioux et al., 2004; Franco et al., 2008).

For the shellfish aquaculture, triploid (3n) oysters were first introduced in the 1980s (Stanley et al., 1981). Now, triploid oysters have become an important source of spat for aquaculture, based on their ability to growth faster than diploid (2n) animals, their supposed lack of gametogenesis (Allen et Downing, 1986; Guo et Allen, 1994; Piferrer et al., 2009) and meat quality (Guo et al., 1996; Nell, 2002). Their better performance in terms of growth is due to the reallocation of energy to the growth of somatic tissues at the expense of the growth and differenciation of the gonad (Allen et Downing, 1986; Guo et Allen, 1994; Piferrer et al., 2009; Jouaux et al., 2013). Nevertheless, it has been proven that many triploid oysters are not totally sterile even if their reproductive capacities are significantly reduced compared to diploid animals (Jouaux et al., 2010; Normand et al., 2008) Amongst them, some 3n alpha, show an active gametogenesis like diploid animals but low gametes at sexual maturity stage while 3n beta a locked gametogenesis with an accumulation of abnormal gonia from stage 1 and only few mature gametes at sexual maturity (Jouaux et al., 2010). The sterility of the triploid oysters is therefore partial and very heterogeneous among the animals. However, this heterogeneity is poorly documented in triploid oysters as is their gametogenesis. Triploid gametogenesis is insubstantially documented and its reproduction. This heterogeneity may be due to environmental factors such as temperature, photoperiod and food availability (Garnier-Géré et al., 2002; Normand et al., 2008; Payton et al., 2017). Another explanation for this diversity could come from the different methods of inducing triploidy and from the selection of genitors (Gong et al., 2004; Normand et al., 2009).

The first method used to induce the triploids consists of blocking the polar bodies expulsion with the cytochalasin B or with other inhibitors of cell cycle (Allen et Downing, 1990). Animals obtained by this technique of induction are called “chemical” triploid oysters (Allen et al., 1987; Guo et al., 1992). This chemical method presents several disadvantages including its incomplete effectiveness and the significant toxicity of the chemical. It was therefore abandoned to make way for a more natural method, the crossbreedings between tetraploid and diploid animals. The resulting offsprings are named “natural” triploid oysters (Allen et Downing, 1990; Guo et al., 1996). For this purpose, tetraploid (4n) oysters are produced by chemical induction techniques by inhibiting the explusion of the polar body I in oocytes of

triploid fertilized oysters and then fertilize these oocytes with haploid sperm. Although, this method allows the production of viable 4n oysters that reach sexual maturity (Guo et Allen, 1994; Eudeline et al., 2000), in the end it only allows the production of 80-90% triploids embryos, when it should theoretically produce 100% (Guo et Allen, 1994; Guo et al., 1996). In order to increase the induction rate, a new method was thus developed. It consist in producing tetraploid oysters by inhibiting the expulsion of the polar body II with cytochalasin B in diploid oocytes and then fertilize these oocytes with diploid sperm from tetraploid males (McCombie et al., 2005; Piferrer et al., 2009). This method is still currently used to produce triploid oysters (Piferrer et al., 2009).

However, the induction of polyploidy can cause many changes at the molecular, chromosomal and cellular levels, resulting in phenotypic variations (Comai, 2005). Indeed, the presence of an additional set of chromosomes in triploid animals may be critical during biological processes such as mitosis and meiosis that undergo cell divisions (Gregory, 2001). It may then impact the levels of transcripts, especially during the regulatory mechanisms of gene dosage compensation (Leitão et al., 2001a; Sousa et al., 2017). During the mitosis of polyploid cells, impaired mitotic spindle assembly can cause a chaotic segregation of chromatids and the production of aneuploid cells (Leitão et al., 2001b; Sousa et al., 2017). Such, disruptions of mitosis can be responsible for the impaired gametogenesis observed in triploid oyster (Dheilly et al., 2014).

The aim of this study is to understand the molecular and cellular regulations that take place at certain checkpoints of the cell cycle, in mitosis and meiosis during gametogenesis, in both groups of triploid oysters (α and β), focusing only in male oysters. This study also aims to understand more finely the differences in the structure of the gonad which is at the origin of their differences in terms of reproductive effort. In order to do this, we compared α and β triploid oysters with diploid ones. First, we assessed the reproductive effort by a histological quantitative approach focusing on the number and area of gonadic tubules. We also highlighted molecular expression profiles by a transcriptomic quantification method in order to explore the regulation of the spermatogenesis. At last, the dynamic and remodelling of the chromatin was assessed during mitosis and meiosis occurring during the gametogenetic cycle.

Materials and methods

Animals and rearing conditions

Diploid and triploid juveniles (*Crassostrea gigas*) in their 1st year of life were provided by commercial farm (Calvados, France). Triploid oysters were being produced by crossing tetraploid males with diploid females. Oysters were maintained on the field at Cricqueville en Bessin (Calvados, France) between December 2017 and May 2018. Animals were sampled every 15 days until May, and after that monthly until September 2018. For each individual, pieces of gonad and gill tissues were sampled, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for total RNA extraction and qPCR. A transverse section of gonad was made and fixed in Davidson's solution for histology and immunocytochemistry.

Ploidy determination

Ploidy was determined for both diploid and triploid oysters by using, for each of them a statistically representative group of 25 animals. To do this, a Muse Cell Cycle Kit with a Guava Muse Cell Analyzer (Luminex) was used following manufacturer instructions.

Histological analysis

Transverse sections of gonad were fixed in Davidson's solution (10% glycerol, 20% formaldehyde, 30% ethanol (95%), 30% sterile seawater, 10% acetic acid). They were then dehydrated in ethanol and embedded in paraffin wax. Three micrometer thick sections were stained with Prenant-Gabe trichrome (Gabe, 1968). The gametogenetic stages and sex were determined *a posteriori*. For diploid oysters, it was based on criteria described by (Berthelin et al., 2001; Franco et al., 2008) : Stage 0 (sexual rest, undifferentiated cells), stage 1 (gonia proliferation), stage 2 (maturation; spermatogenesis or oogenesis) and stage 3 (ripe gonads before spawning). For 3n oysters, α and β pattern were determined according to (Jouaux et al., 2010): Stage 0 (sexual rest as in 2n), stage 1 (α-pattern: gonia proliferations as in 2n and β-pattern with highly disturbed gametogenesis, with numerous germ cells locked in prophase of mitosis) (Supplementary data 1), stage 2 (α-pattern: maturation as in 2n and β-pattern still exhibiting locking events), stage 3 (α-pattern: mature animals closely resembling 2n and β-pattern nearly completely sterile, with only a few gametes).

Quantitative analysis of reproductive effort

To evaluate the reproductive effort, whole all of each histological sections was scanned at 20x (0.25µm/pixel) using a ScanScope CS microscope slide scanner (Leica Biosystems). For each image, a down-sampling by 8 was applied to allow an analysis with Python algorithms (Walt et al., 2014) and using the Ilastik software (Berg et al., 2019). A color normalization (Khan et al., 2014) of all images was first done to enhance the performance of image analysis algorithms. Then, three different tissues were detected on the images: the whole tissue section without the gills previously removed, the gonadal tubules (GT) and the storage tissue (ST). The whole tissue area was extracted, thanks to a threshold on intensity component of the color space "Hue, Saturation and Intensity". GT areas were obtained with a threshold on components L* and a* of color space "CIE L*a*b*", where L* represents the lightness from black to white, a* represents color from green to red, and b*represents color from blue to yellow. ST areas were obtained with a pixel classification method using the Ilastik software (Berg et al., 2019). For these three different tissues, areas were computed in pixels in order to assess the reproductive effort of diploid and triploid oysters, using gonadal area (GA) measurement. This area, located around digestive gland contains GT and ST, is known to be unalike proportions depending on the gametogenetic stage, in diploid oysters as in triploid ones. Here, to be even more precise, the Gonadal Tubule Index (GTI) and the Tubule Area Index (TAI) were specifically measured. The GTI represents the percentage of GA occupation in relation to the whole animal cross section [GTI= (GA/ surface of the whole cross section) *100] and TAI is the percentage of GT in relation to the whole animal cross section [TAI= (GT/surface of the whole cross section) *100]. The average number of tubules per cross section and the mean area per tubule were also measured in group of animals at the beginning of the gametogenetic stafge (stage 0 and 1). Area (A), circularity, perimeter (P), major and minor axis and compacity of each tubule were obtained. Sorting of tubules was done by the Gravelius compactness coefficient : $K = P\frac{P}{2\sqrt{\pi A}}A = 0{,}28\frac{P}{A}$ with the threshold of K< 1.7 to keep only the tubules with circular cross sections (Bendjoudi et Hubert, 2002; Mahamadou et al., 2017). To ensure that the number of these tubules was representative of the totality of tubules, we have compared their proportion to that all-tubules for each animal, no significant difference was found.

RNA Extraction

Ten individual gonad samples and three gill samples for gametogenetic stage of diploid and triploid oysters were used for the quantitative expression analysis. Tissues were ground in 500µL of TriReagent (Sigma Aldrich). One hundred µL of Bromo-3-chloropropane (Sigma Aldrich) were then added and samples were vortexed before centrifugation (12000g, 10 min, 4°C). The aqueous phase was retrieved and total RNA extraction was performed using a Nucleospin RNA clean-up kit (Macherey Nagel), following manufacturer's instructions. RNA concentration, purity and integrity were checked by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific). To prevent genomic DNA contamination, RNA samples were treated with DNAse I (1 U/µL of total RNA, Sigma). Then, total RNA was reverse-transcribed to prepare cDNA. Two hundred and fifty nanograms of total RNA from each sample were reverse transcribed using 200U of MMuLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase, Promega) in the presence of 12 U of RNase inhibitor (RNasin, Promega), 5mM of RNAse free dNTPs and 100 ng of random primers in the appropriate buffer (Promega) at 37°C during 90 minutes. cDNA was stored at - 20°C until used.

Quantitative real time PCR (qPCR)

The expression of mRNA of oysters during the gametogenetic cycle were investigated using quantitative real time PCR analysis. The primers sequences were designed using Primer 3 software (Table 1) and synthesised by Eurogentec (France). The reference gene, elongation factor 1α (EF1α), was selected among two housekeeping genes (EF1α and Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)). The high stability of this housekeeping gene was previously identified by (Dheilly et al., 2012; Volland et al., 2017) and was futher cormirmed in the present study. The qPCR mix contained 1X *GoTaq SYBR Green Mix* (Promega), 5ng cDNA and 15 µM of forward and reverse primers in a final volume of 15µL. Amplification conditions consisted of one cycle at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 45 s. Specific amplification of the target sequence was estimated from the melting temperature curves. The relative expression level of each target gene was calculated based on the threshold value (Ct) deviation of this target gene from housekeeping gene (EF1α).

Statistical analysis

The gene expression levels and the measures assessed by quantitative histology between diploid and triploid oysters at each gametogenetic stage were illustrated on graphs by means and SEM. The results were analysed using a Student's t-test parametric test with a p-value < 0.01. All analyses were performed with the Prism.v6 (Graphpad) software.

Immunohistochemistry

Five micrometer sections were deparaffinised, rehydrated and washed in 1X Phosphate buffer saline (PBS) during 10 min. The sections were permeabilised with 200 µL of 0.1%Triton X-100 in 1X PBS for 10 min at room temperature. Antigen retrieval was performed with 200 µL of freshly made 2N hydrochloric acid in 1X PBS in a 37°C incubator during 30 min. After denaturation, non-specific sites were blocked with an incubation in 100µL of 0.1M Tris-HCl (pH8.3) for 10 min followed by one in 500µL of blocking solution (0.25% Bovine serum albumin (BSA), 0.5% Triton X-100 in 1X PBS) for 1h at room temperature in a humid chamber. After blocking, the slides were incubated overnight with a rabbit polyclonal Phospho-Histone H3 (Ser10) antibody (Millipore 06–570) diluted (1:500 previously validated by Cavelier et al., 2017) in blocking solution at 4°C in a humid chamber. The next day, sections were washed three times (15 min each) with 0.1% PBS-tween-20 and then incubated during 1h with a secondary antibody, Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (1:1000) (Alexa Fluor 594) (ab150080) and with Hoechst 20mM (1:1000) in blocking solution at room temperature. Following, 3 further washes with 0.1% PBS-tween-20, the slides were mounted in mounting medium (Ibidi). Image analysis were performed with a FV1000 confocal laser scanning biological microscope (Olympus).

Results

Reproductive effort during spermatogenesis

The reproductive effort during the gametogenetic cycle was studied by quantitative histology analysis on transversal sections of male diploid and triploid oysters. It was first measured as the percentage of gonadal tubules area occupying the gonadal area (GTI) (Figure 1A). During the quiescent stage (stage 0), while alpha and beta triploids cannot be distinguished, no significant difference was observed between 2n and 3n animals, with around 10-15% of gonadal area. At stage 1, GTI was 20% for diploid, 17% for alpha triploid and 10% for beta triploid oysters. At the end of the gametogenetic cycle (stage 3), it reached 85% in diploid, 71% in alpha triploid

and 23% in beta males triploid. Pairwise comparison within each gametogenic stage showed significant differences between diploid and alpha and beta triploid oysters from stage 1 to stage 3. Whatever the stage, the GTI of 3n beta was always significantly lower in comparison to diploid and alpha triploid males. The GTI of alpha triploid was also significantly lower compared to diploid oyster, but only at stage 3. A fine analysis was also made to quantify more precisely the occupation of tubules in the whole animal section through the Tubule Area Index (TAI) (Figure 1B). At stage 3, the occupation of the tubules was significantly different between diploid, alpha and beta triploid. In comparison with diploid oysters, the TAI was significantly reduced in triploid animals from stage 2 and 3. In stage 3, it was significantly reduced by half in alpha triploid oysters and by eight in beta triploid male oysters. The TAI takes into account not only the number of tubules but also their surface, which increases during gametogenesis, according to the filling rate of the tubules by germ and somatic cells. Thus, a complementary analysis focusing on the number of tubules and the mean area per tubule was performed in order to know if the decrease in TAI in triploid could be due to a decrease in the number of tubules and/or of their surface. This analysis was only done in stages 0 and 1, when the tubules are clearly individualised on the section (Figure 2). These stages are also relevant because (1) stage 0 corresponds to the very beginning of the gametogenesis, illustrated by scarce tubules filled with very few cells and (2) stage 1 of gonia proliferation was described as a crucial stage to understand gametogenesis in triploid (Jouaux et al, 2010). This analysis showed that in stage 0, diploid animals have a significantly higher number of tubules per section than triploid males (Figure 2A), although the mean tubule area was similar for both (Figure 2B). At stage 1, diploid and alpha triploid oysters presented the same values of mean of tubules areas, while beta triploid oysters highlighted a significantly reduced mean area per tubule compared to both diploid and alpha triploid oysters (Figure 2B), in agreement with the results about the GTI (Figure 1A)

Molecular regulations during spermatogenesis

Here, the objective was to gain more insights into the regulatory gene network involved in the gametogenetic disruption in alpha and beta triploid oyster. For this purpose, genes were selected amongst those which appeared dysregulated between diploid and triploid oysters in previous study done by (Dheilly et al., 2012, 2014) using large-scale approaches. In order to gain insight into the genes involved in gametogenetic disruption beta oysters, several ones have been selected from the previous studies from (Dheilly et al., 2012, 2014), appearing dysregulated between the 2n and 3n animals. We especially focused on those involved in the kinetochore structure and its regulation during mitotic and meiotic progression, namely mad2l1 (mitotic

arrest deficient 2 like 1), mis12 (kinetochore complex component), cdc20 (cell division cycle 20), bub3 (budding uninhibited by benomyl 3) and rad21 (cohesion complex component). For that, we performed an expression analysis by quantitative PCR on diploid and triploid male gonads in stage 0 of sexual rest and in stages 1 and 2 when mitosis and meiosis take place, respectively (Figure 3). In diploid and alpha triploid oysters, the trend for all transcripts corresponded to a progressive increase through the gametogenesis, from stage 0 to stage 2. In contrast, in beta triploid oysters, despite an increase of all gene expressions between the stages 0 and 1, a significantly lower expression was highlighted in stage 2 compared to diploid and alpha triploid oysters. Such significantly lower mRNA expression in triploid compared to diploid was also observed for MIS12 in stage 0.

Cell divisions and chromatin remodelling along the cell cycle during early spermatogenesis

To follow the cell divisions at the origin of the male gonial proliferations in diploid and triploid oysters, we traced the dynamic distribution of the chromatin in stage 1, when mitoses are most frequent, but also just before in stage 0 and after in stage 2 when meiosis occurs. For that purpose, the histone H3 phosphorylated on the Serine 10 residue was detected by fluorescent immunohistochemistry (IHC), using a H3-phosphoS10 antibody (H3S10p) in association with a DNA staining with Hoechst dye. H3S10p specific signal was certified by the lack or low labelling in Hoechst-stained nuclei in the storage tissue (tissue with low or reduced mitotic activity) and on the negative controls using no primary antibody. Confocal images revealed an intense signal associated with the stained chromatin in the gonadal tubules, with spacial and temporal variations depending on the mitotic stages (Figure 4). Thus, a staining was observed from the G2 phase till the telophase (Figure 4A). In G2 phase, the Hoeschst staining (blue) and the H3S10p staining (red) were diffuse and they overlapped in the whole nucleus. Then, they were progressively reaching the periphery of the nucleus till they were perinuclear in late prophase. At prometaphase, when chromosomes start to condense and at metaphase when all chromosomes compact on the equatorial plate, the H3S10p signal overlapped with condensed chromosomes but it was also observed outside the chromosome localisation area. At anaphase, when sister chromosomes are getting apart after centromeric fission, both signals were overlapping again. At telophase, when the separated chromosomes started to uncoil and to become less condensed, the immunofluorescence appeared as aligned patches, localized at the chromosomal areas. When the relative frequency of each stage of mitosis was counted in stages 0 and 1 and compared between diploid and triploid oysters (Figure 4B), it appeared that in stage 0 of gametogenesis, most of the cells in diploid and triploid oysters were in late prophase (63%

for diploid and 30% for triploid) and in prometaphase/metaphase (30% for diploid and 55% for triploid). However, they were rather in late prophase in diploids and in prometaphase/metaphase in triploids. However, at this stage, the number of mitosis figures is low. At the stage 1 when cells proliferate, when alpha and beta triploid can be distinguished, the cells in mitosis were still predominantly in late prophase and prometaphase/metaphase. Interestingly, they were rather in metaphase in diploid and alpha triploid oysters and in late prophase in beta triploid oysters. Looking at the signal distribution in prophase in more detail (Figure 5), in stage 0, the same staining was observed in diploid and in triploid, with heterochromatin localised at the centre of the nucleus while H3S10p staining was observed at its periphery. In contrast, in stage 1, the staining was different in beta triploid animals compared to diploid and alpha triploid oysters. In these last two, heterochromatin was observed at the periphery of the nucleus and was overlapping with the H3S10p staining while in beta triploid heterochromatin was localised at the centre of the nucleus while H3S10p staining was observed at its periphery. When looking more broadly within the tubules and later on during the gametogenetic cycle (Figure 6), it appeared that the cells labelled for H3S10p were (1) less numerous in triploid oysters (especially beta triploid) than in diploid ones whatever the gametogenetic stage and (2) still present in stage 2, which encounters meiosis.

Discussion

Could disturbances in the establishment of the gonadal tubules and in the gametogenesis during stages 0 and 1 of spermatogenesis explain the lower reproductive effort of beta triploid oysters?

Two strategies of gametogenesis were previously described, in triploid oysters by Jouaux et al., 2010, a α-pattern, corresponding to animals displaying numerous proliferating gonia at stage 1, resulting in abundant gametes at stage 3 and a β-pattern, which was associated with a locked gametogenesis and only few mature gametes at sexual maturity. The authors supported these results by demonstrating, in stage 3, a lower reproductive effort in triploid oysters compared to diploid, using the gonadal area index (GAi) and the gonadal tubule index (GTi). In the present work, especially focusing on triploid males, the same both patterns were observed (results not shown). In contrast with Jouaux et al. (2010), the reproductive effort was assessed from stage 0, at various stages of the gametogenetic cycle, and not only with GAi and GTi but also by assessing the average number of tubules per cross-section and the mean area per tubule. Thus, in this study, in stage 3 of sexual maturity, as in Jouaux et al. (2010), the GTI and TAI were lower in alpha triploid and beta triploid compared to diploid oysters, confirming the idea of a

lower reproductive effort at this stage of sexual maturity. In alpha triploid, such differences were explained by Guo et Allen (1994) and Gong et al. (2004) by differential fecundities between diploid and triploid, but they made any distinction between alpha and beta. Jouaux et al. (2010) disagreed, observing equivalent fecundities between diploid and alpha triploid. In beta triploid, our results also demonstrated that the lower reproductive effort appeared very early, as soon as the stages 0 or 1. According to our results, it could be explained by a lower number of tubules as observed in stage 0 in triploid oysters compared to diploid, but also in stage 1 by a significantly lower mean area per tubule (knowing that the number of tubules is not lower; results not shown). Knowing that tubules are filled with proliferating gonia at this stage, a lower mean area per tubule may suggest an impaired gametogenesis with the presence of fewer germ cells within the tubules. Indeed, this latter idea is supported by previous work done by Jouaux et al. (2010) who mentioned in stage 1 in beta triploid oysters, the presence of numerous germ cells locked in prophase of mitosis, suggesting an arrest of gametogenesis at this point. Taken all together, our results suggest that the lower reproductive effort observed in beta triploid oysters may be due to disturbances as soon as in stage 0 or 1 of the reproductive cycle. These disturbances would occur during the establishment of the gonadal tubules and during mitosis of germ cells occurring within them during spermatogenesis.

Could chromatin remodelling and dysregulations of genes involved in epigenetic modifications impair mitosis in stage 1 of spermatogenesis in 3n Β oysters?

In order to go deeper into the understanding of the cellular impairments of mitosis occurring in beta triploid oysters during early spermatogenesis. We performed an immunofluorescence labelling of the phosphorylated histone H3 on the serine 10, using a H3S10p antibody. This marker is associated to each step of mitosis and meiosis. The expression pattern of H3 is exposed to dynamic changes during spermatogenesis (Song et al., 2011). In our study, the frequencies of each phase of mitosis measured in stages 0 and 1 of the reproductive cycle showed that beta triploid males were blocked between the end of prophase and the start of prometaphase. These results are in agreement with the locked gonia blocked in prophase observed by Jouaux et al. (2010) in beta triploid oysters. Previous studies had shown a link between the histone H3 phosphorylation and chromosome segregation during cell division process. The histone H3 is phosphorylated at Ser 10 during prophase, with a peak level in metaphase and it is dephosphorylated at the anaphase to come out of the division cycle (Prigent et Dimitrov, 2003; Nowak et Corces, 2004). A mutation of this phosphorylation in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophile* causes condensation and segregation defects, suggesting

that the H3 phosphorylation is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis (Wei et al., 1999). Moreover, underphosphorylation of histone H3 has also been connected to aberrant chromosome behaviour during mitotic and meiotic division in insects (Staiber, 2012). In our study, in diploid oysters, during mitosis, chromatin staining was usually co-localised with H3S10p staining, except in prometaphase and metaphase, when chromatin was highly condensed. These results also highlight a link between the histone H3 phosphorylation and chromatin remodeling during mitosis. Besides, this remodeling could be explained, as suggested by some authors (Li et al., 2007) by an increase of negative charge due to the phosphorylated histone H3 that make it dissociated from chromosomal DNA, therefore causing chromatin condensation. In the same way, in beta triploid male oysters, the particular pattern of blocking of germ cells between the late prophase and the beginning of metaphase could be explaining by a dysregulation of the histone H3 phosphorylation and then an abnormal condensation of the germ cell nuclei. This hypothesis is also supported by our proteomic results (not shown) which highlighted a significant downregulation of expression level of protein histone H3 in beta triploid oysters and suggest a dysregulation at the post translational level. Further studies of post-translational modifications of histones are therefore necessary in order to confirm this hypothesis. Our results of H3S10p staining in stage 2 of gametogenesis (meiotic stage) also suggest that the blocking of the germ cells persists throughout the gametogenetic cycle, in contrast with the results of Allen and Downing, 1986 who only suggested a delay. Our results also showed a particular pattern of chromatin localisation in prophase in beta triploid males only, at the centre of the nucleus while the H3S10p staining was localised at its periphery. Indeed, the frequent and conventional organization of the nucleus is a constitutive and facultative heterochromatin at the periphery of the nucleoplasm, near or associated to lamina and euchromatin at central position. A unique exception to chromatin organization in eukaryotes is found in rod photoreceptor cells of nocturnal mammals (Solovei et al., 2009). In these cells as in germ cells of beta triploid males, positions of eu- and heterochromatin are inverted in the nuclei. This peculiar chromatin remodeling happens during development and cellular differentiation. In beta triploid male oysters, this peculiar chromatin localisation during mitosis could be associated to the peripheral labelling of H3S10p. Indeed, in rod cells it is associated to major post-translational modifications of the histones, mainly the epigenetic marks H3K9me3 and H4K20me3 and to nuclear tether proteins, Lamin-A/C and LBR (Lamin B Receptor) (Eberhart et al., 2013; Solovei et al., 2013). Both latter proteins are involved in the tethering of LAD domains in association with HP1 (HeteroProtein 1) and H3K9me2/3. LBR serves to attach the nuclear lamina to the inner nuclear membrane and also binds to HP1-

associated heterochromatin. It acts in association with H4K20me2PRR14 requires Lamin A/C for localization to the inner nuclear periphery (Poleshko et al., 2013). The loss of tethering of the nuclear lamina drives alterations of the genome architecture (Shevelyov et Ulianov, 2019). Surprisingly, in 2n oysters, a similar central localization of chromatin and peripheral of the Histone H3p was also observed in germ cells in stage 0 (resting gametogenetic stage). This puzzling localization needs further studies. However, in mice, a role of epigenetic modifications during very early spermatogenesis was recently mentioned, when prospermatogonia differentiate into differentiating or undifferentiated spermatogonia after birth (Kuroki et al., 2020). A demethylation of H3K9me2 by the JMJD1A and B demethylases would be at the origin of this differentiation of spermatogonia (Kuroki et al., 2020). Taken all together, our results suggest therefore (1) that epigenetic modifications appear essential to the progression of spermatogenesis in diploid oysters and (2) that their probable deregulation might be involved in the blocking observed in beta triploid oysters.

Could dysregulations in genes involved in the Spindle Assembly Checkpoint (or SAC) be a sign of impaired meiosis in stage 2 of spermatogenesis in 3n β oysters?

The frequent infertility of triploid individuals is a general pattern directly related to their ploidy, mentioned in numerous species. It is frequently due to irregular chromosomal pairing and perturbed segregation during mitotic and meiotic events (Allen et al., 1987; Otto et J, 2000; Otto, 2007; Crane et Sleper, 2011) In our study, the mRNA level of genes establishing the normal spindle-kinetochore interaction during cell divisions was assessed by qPCR. A significantly lower expression of these genes was observed in stage 2 in beta triploid male oysters, suggesting their downregulation during mitosis and meiosis.

The segregation of the chromosomes during the mitosis or meiosis requires their attachment to the kinetochore, a large protein complex which ensures the assembly of the centromere of each chromosome to the spindle of microtubules. This complex is under the control of a molecular surveillance mechanism that checks the correct microtubule attachment, named Spindle Assembly Checkpoint (or SAC) (Figure 7). During reductional meiosis (as during mitosis), once all centromeres are associated with the microtubules, the SAC is silenced, allowing therefore the mitotic exit via the activation of the APC/C (Figure 7A). More precisely, when all kinetochores are correctly associated to the microtubules in prometaphase, the activation of APC/C^{CDC20} promotes Cyclin B and Securin proteolysis by the proteasome. Thus, by inhibiting the APC/C, the MCC stabilizes these substrates and their destruction induces mitotic exit (Peters, 2002; Hara et Fukagawa, 2020). Then, the separation of sister chromatids takes place

under the control of a cohesion protease separase such as Rad21 (Zhu et Wang, 2018; Stormo et Fox, 2019). During the unpaired attachment of the microtubules to the kinetochore, the SAC signal is activated and block the cell cycle by inactivating the Anaphase Promoting Complex (APC/C) (Figure 7B). Then the SAC acts through numerous effectors forming the mitotic checkpoint complex (MCC). From their effectors of the MCC, the three SAC proteins Mad2l1, BubR1 and Bub3, in interaction with CDC20, participate to the formation of the outer kinetochores, protein complexes formed by numerous proteins including Mis12. They bound and then inhibit the complex APC/C^{CDC20}, required to prevent entry into anaphase. From our results, we can therefore hypothesize about a potential impairment during meiosis in beta triploid male oysters. During the first division, homologous chromosomes may be held together through chiasmata that are supported by cohesion along chromosome arms. Sister kinetochores would be associated with each other and thus co-oriented. Homologous kinetochores would be pulled by spindle microtubule into the opposite pole (homologous biorientation). The homologous recombination of chromosomes during meiosis would make kinetochore attachment to the chromosome more difficult (Kitajima, 2018). In male oysters, this step may occur in stage 2 of gametogenesis, when germ cells differentiate from gonia to spermatozoa. In beta triploid oysters, the downregulation of SAC actors in stage 2 could reduce the chances of spindle chromosome attachment. In addition, the decrease of cdc20 expression level would lead to decreased activation of APC. Maintaining SAC activation could result in a cell cycle arrest and blocks the entry of the cell into anaphase during meiosis. So, a deregulation of the meiotic checkpoint may induce an impairment in the chromatids segregation in beta triploid oysters. Furthermore, a downregulation of the cohesion rad21 may induce chromosome instability, thus amplifying the locking of germ cell in beta triploid oysters. All this would therefore prevent the germ cells from completing their meiosis. In contrast, in alpha triploid oysters, the expression profile of the kinetochore actors, was similar to diploid oysters, would suggest an activation of the APC, therefore allowing a normal segregation and a meiosis exit.

Then, our work has permitted to postulate that the lower reproductive effort of beta triploid male oysters may be (1) first due to disturbances in the establishment of the gonadal tubules and by a locking of germ cells due to as a misregulation of the chromatin remodelling by modifications of epigenetic marks, during quiescent and mitotic stages of spermatogenesis (stages 0 and 1) and (2) in a second time, by an aberrant segregation of chromosomes during the early meiosis due to perturbation of the SAC mechanism. Hence, these results lead to a more detailed study of the actors of the chromatin structure, through the analysis of the post-

translational modifications of histones (methylation, acetylation essentially) and associated proteins (as isoforms of HP1, LBR, Lamins) and their expression during the complete spermatogenesis. It is also important to follow the proteic expression of the kinetochore actors.

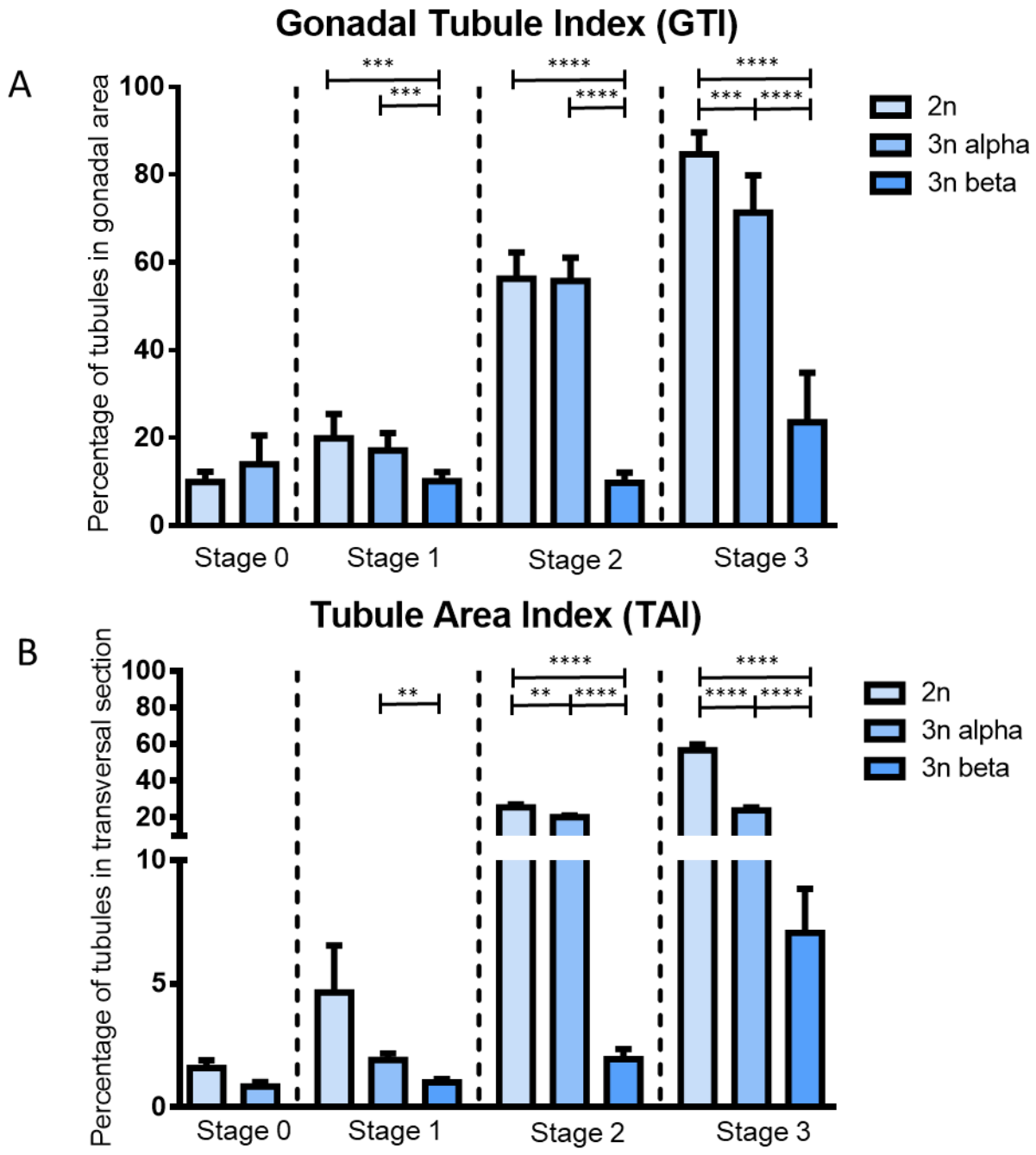


Figure 1: Quantification of reproductive effort in male *Crassostrea gigas* oysters. It is assessed through the Gonadal Tubule Index(GTI) (A) and the Tubule area Index (TAI) (B) in a transverse sections of diploid (n=36) and triploid (n= 64) oysters during the gametogenic cycle (Stage 0: resting period, stage 1: gonia proliferations, stage 2: maturation and stage 3: mature animals). By a statistical analysis (Student test) comparing of triploid and diploid animals during the gametogenetic cycle, the significant differences are indicated by asterisks (**** for p <0.0001).

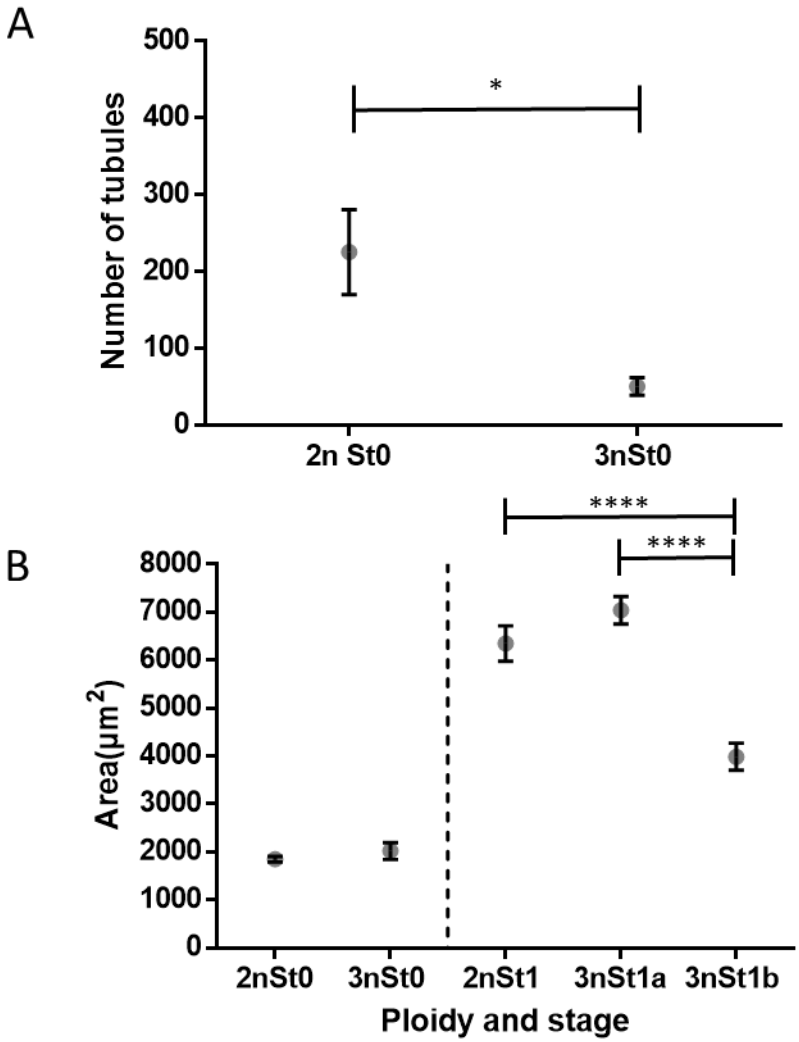


Figure 2: Quantification of the average number of gonadal tubules (A) and the mean area per tubule (B) in a transverse section of male diploid (2n) (n=12) and triploid (3n) (n= 27) oysters during the gametogenic cycle (Stage 0: resting period, stage 1: gonia proliferations). By a statistical analysis (Student test) comparing triploid and diploid animals at each gametogenetic cycle, the significant differences are indicated by asterisks (**** for $p < 0.0001$).

Table 1: List of names, sequences and corresponding gene names and NCBI ID numbers (*: reference gene) of the primers used for quantitative real-time PCR analysis in *Crassostrea gigas*. "F" and "R" indicates respectively forward and reverse primers.

Primer	Nucleotide sequences (5' - 3')	Gene name	NCBI Gene ID
EF1α-F	ACGACGATCGCATTTCTCTT	*Elongation factor 1-alpha**	105338957
EF1α-R	ACCACCCTGGTGAGATCAAG		
GAPDH-F	TTGTCTTGCCCTCTTGC	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**	105340512
GAPDH-R	CGCCAATCCTTGTTGCTT		
CDC20-F	TACCAAAGGACCAGGCATGC	*Cell division cycle 20*	105332569
CDC20-R	GTGTTTTCGCCGTTGTACTGA		
MAD2L1-F	ACCACGTCAGAAGTCAGAGA	*Mitotic arrest deficient 2 like 1*	105340350
MAD2L1-R	CAGCAGGGGTAGGAATGTGA		
MIS12-F	GGACAGGGTACAGATGACACA	*MIS12 Kinetochore Complex Component*	105330856
MIS12-R	GCTATGATGTGTTTACGGAGCT		
RAD21-F	TGCCATCAACACTTTCCTTCAG	*RAD21 Cohesin Complex Component*	105337371
RAD21-R	ACCCGTGCAATCTTTTCCAC		
BUB3-F	GTTGTGTCGAGTACTGCCCA	*BUB3 Budding uninhibited by benomyl 3*	105332696
BUB3-R	CTTGTCCGGTTGAGTGAAGGA		

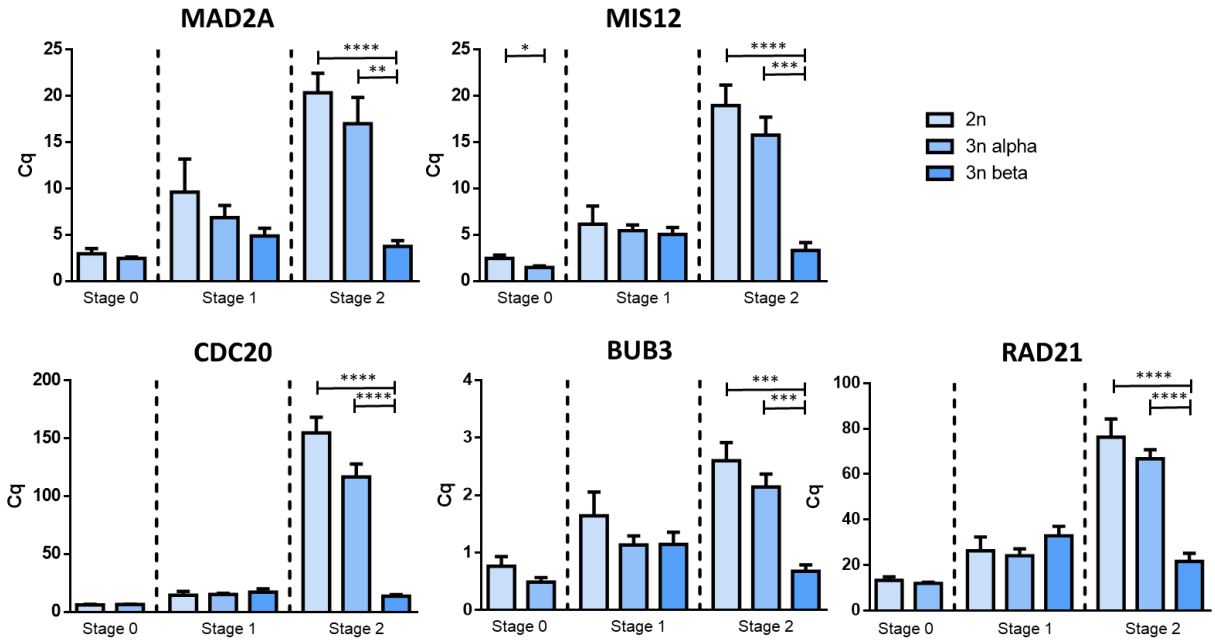


Figure 3: Quantitative PCR analysis of relative mRNA expressions of MAD2L1, MIS12, CDC20, BUB3 and RAD21 in gonad of male diploid and triploid *Crassostrea gigas* during the gametogenetic cycle cycle (Stage 0: resting period, stage 1: gonia proliferations, stage 2: maturation). Each bar represents the mean of expression level of the target transcript replicates (n=6 to 9) related to the housekeeping gene EF1α. By a statistical analysis (Student test) comparing triploid and diploid animals at each gametogenetic cycle, the significant differences are indicated by asterisks (****: p <0.0001, ***: p< 0.0005 and **: p<0.001).

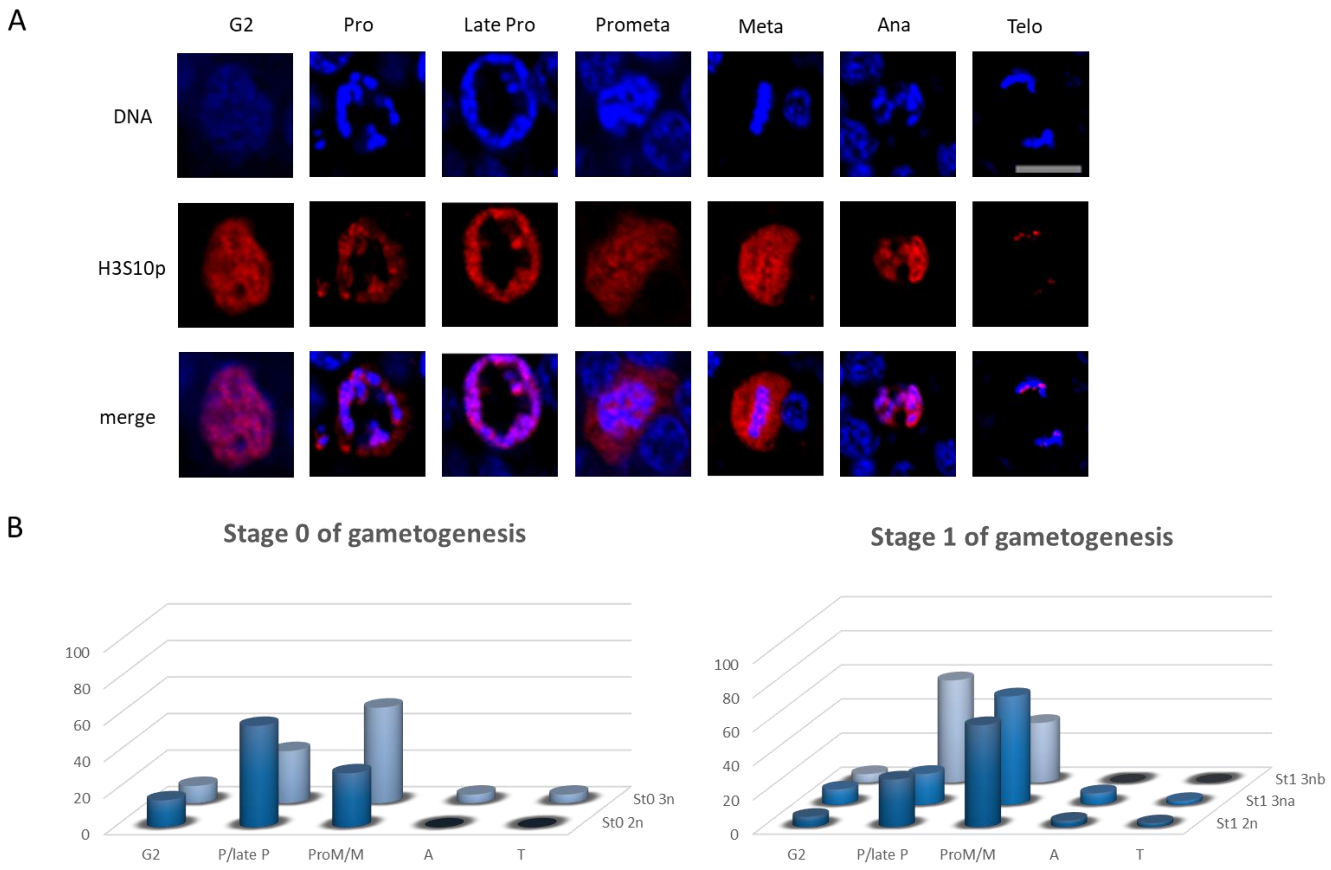


Figure 4: Immunofluorescence labelling of H3S10p (red) at different stages of mitosis in cross sections of gonadal tubules of male diploid oysters during the stage 1 of gametogenetic cycle. DNA was stained with Hoechst (blue) (A). Relative frequency of each figure of mitosis during in the early stages of gametogenesis (stage 0 and 1) of diploid and triploid oysters (B). Scale bar: 5µm.

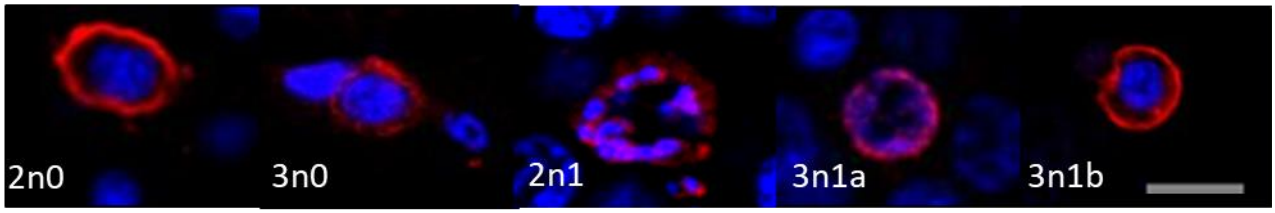


Figure 5: Germ cells in prophase in male diploid (2n) and triploid (3na: 3n alpha and 3nb: beta) oysters during early stages of gametogenetic cycle (0: stage 0 and 1: stage 1). DNA was stained with Hoechst (blue). Scale bar: 5µm.

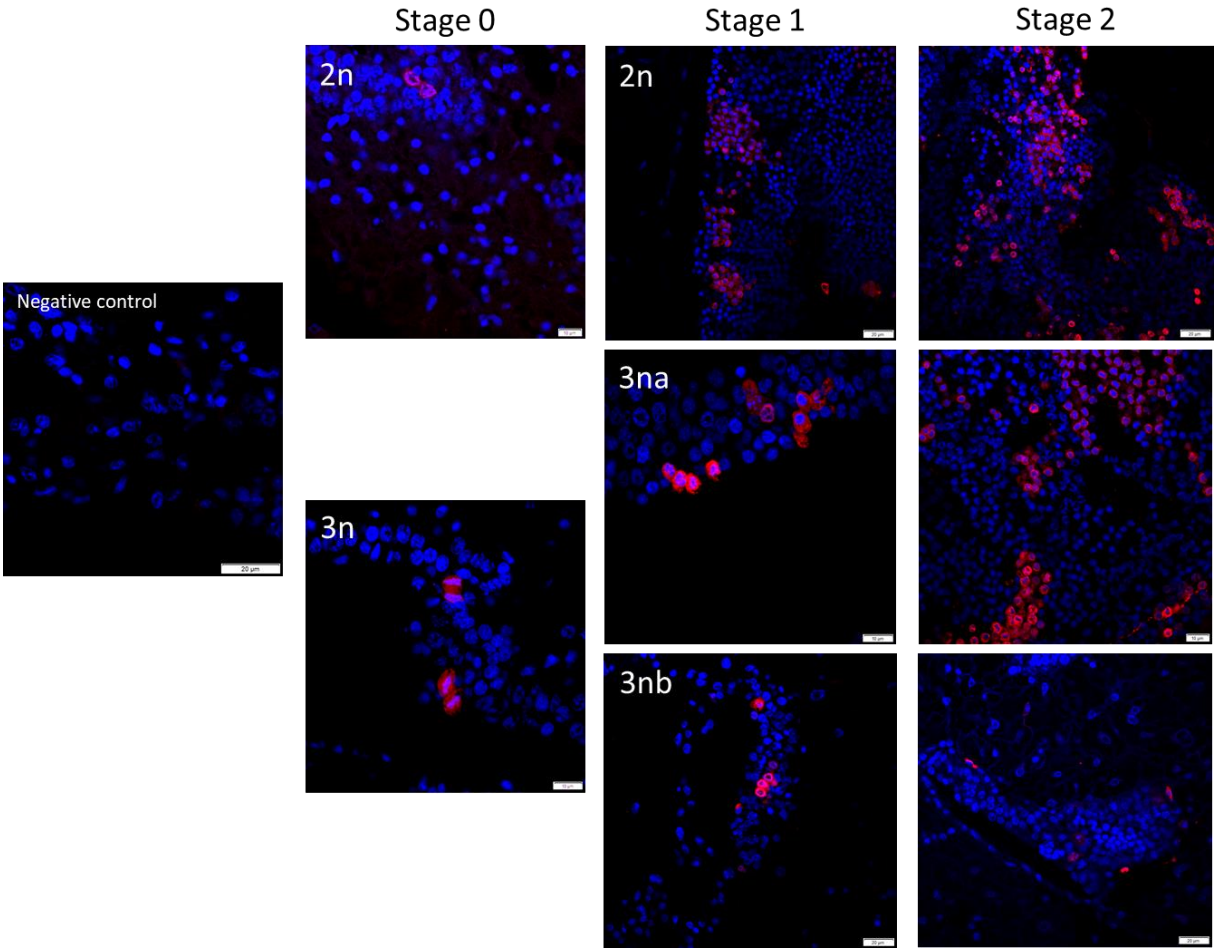


Figure 6: Immunofluorescence labelling of H3S10p (red) in cross sections of gonadal tubules in male diploid (2n) and triploid (3na: 3n alpha and 3nb: beta) oysters during the gametogenetic cycle (Stage 0: resting period, stage 1: gonia proliferations and stage 2: maturation). DNA was stained with Hoechst (blue).

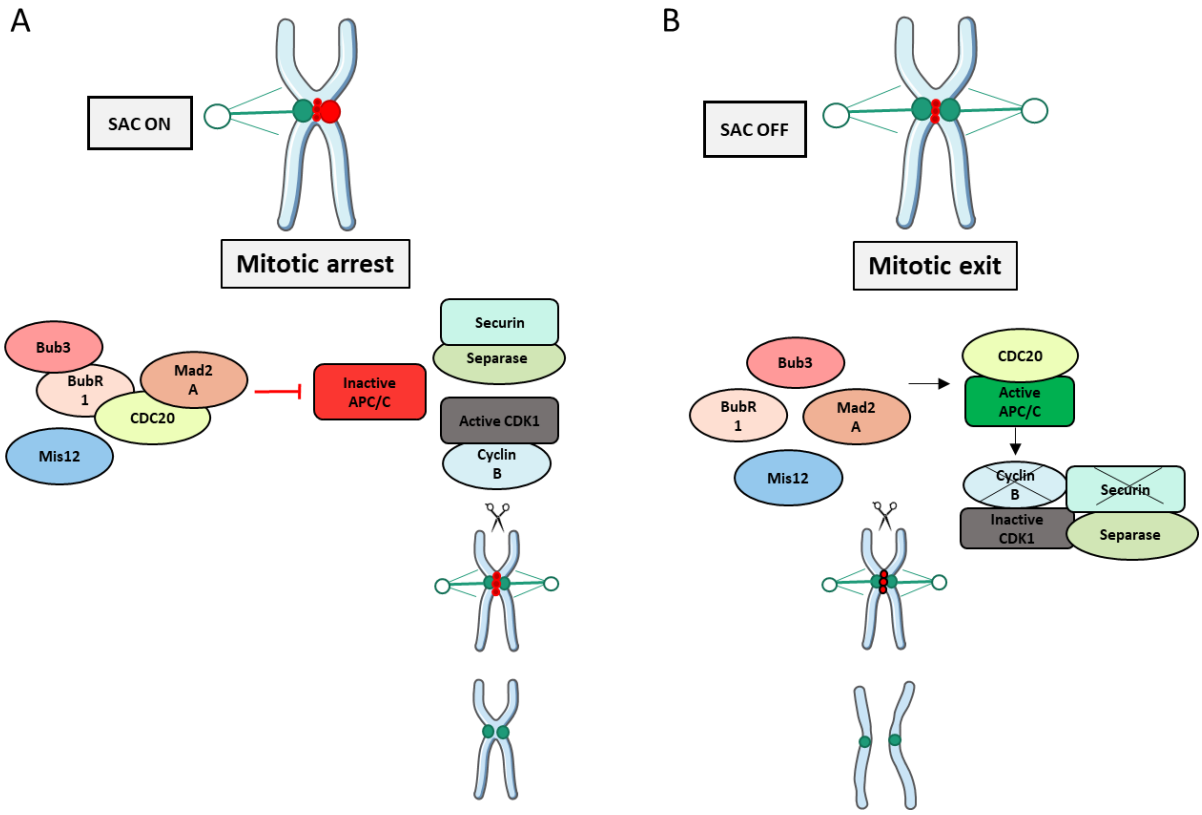
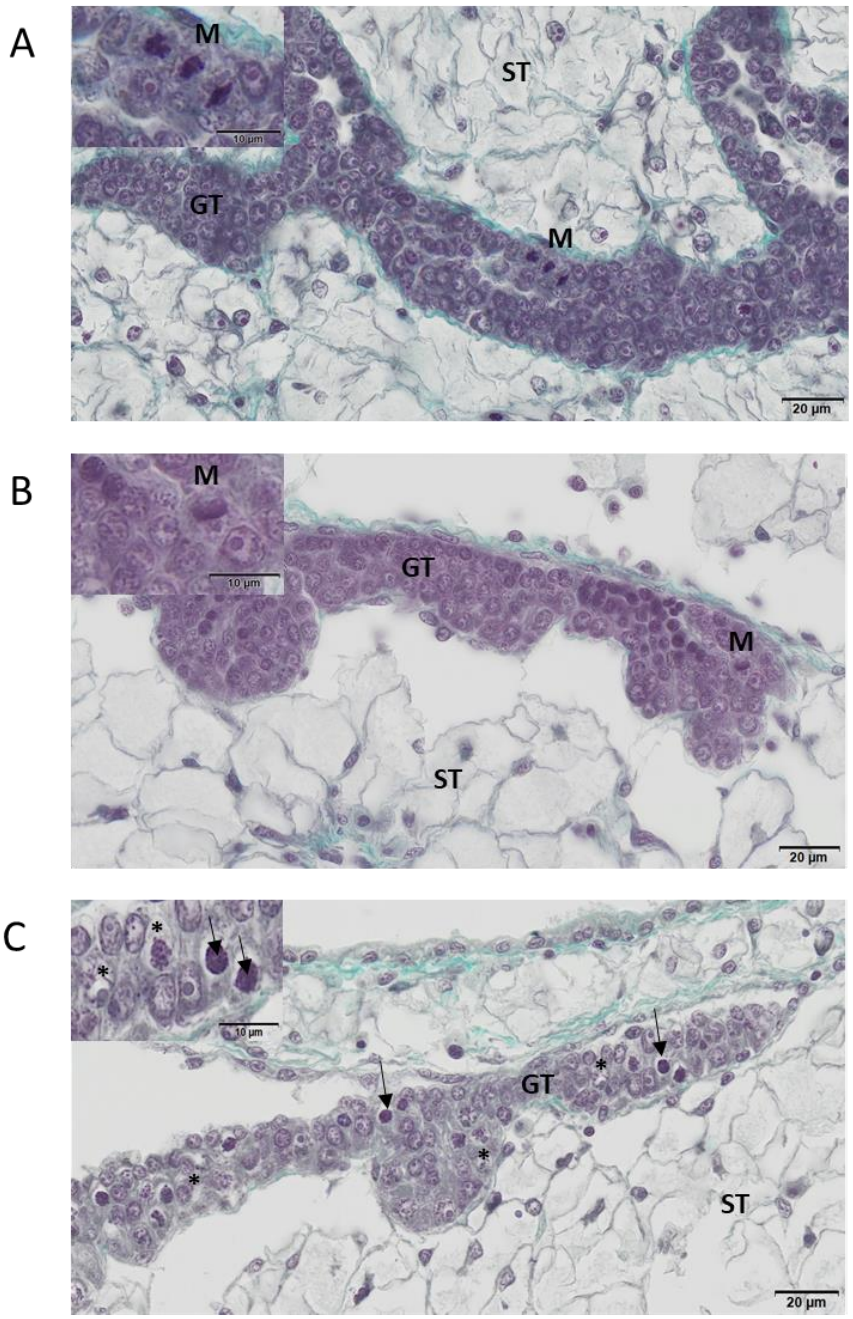


Figure 7: Speculative model for the coordination of the metaphase-anaphase transition. Mitotic and meiotic chromosome segregation is under the control of spindle assembly checkpoint (SAC). (A) The unpaired and mismatched kinetochores activate the SAC signals and block the cell cycle by keeping the Anaphase Promoting Complex (APC/C) inactive. (B) A correct and stable microtubule's attachment is sufficient for SAC silencing and mitotic exit via the activation of the APC/C.



Supplementary data 1: Histological cross sections of *Crassostrea gigas* male gonadal area at the stage 1 of gametogenesis (gonial proliferation). The gonadal area is composed to gonadal tubule (GT) and storage tissue (ST). Diploid (A) and alpha triploid male oysters (B) present a proliferation of germinal lineage in gonadal tubule with the figures of mitosis (M) especially for diploid oyster whereas beta triploid oyster (C) exhibit locking events (clear cytoplasmic area: asterisk and condensed nuclei: arrow).

Bibliography

Allen, S.K., and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *102*, 197–208.

Allen, and Downing (1990). Hatchery manual for producing triploid oysters: S.K. Allen, S.L. Downing and K.K. Chew. Washington Sea Grant Program, 1989. Price US$8.00, 27 pp., ISBN 0-295-77031-7. Aquaculture *89*, 390.

Bendjoudi, H., and Hubert, P. (2002). The Gravelius compactness coefficient: critical analysis of a shape index for drainage basins. Hydrological Sciences Journal *47*, 921–930.

Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C.N., Kausler, B.X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., et al. (2019). ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. Nat Methods *16*, 1226–1232.

Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., and Kellner, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). Invertebrate Reproduction & Development *40*, 79–86.

Broquard, C., Martinez, A.-S., Maurouard, E., Lamy, J.-B., and Dégremont, L. (2020). Sex determination in the oyster Crassostrea gigas - A large longitudinal study of population sex ratios and individual sex changes. Aquaculture *515*, 734555.

Cavelier, P., Cau, J., Morin, N., and Delsert, C. (2017). Early gametogenesis in the Pacific oyster: new insights using stem cell and mitotic markers. J. Exp. Biol. *220*, 3988–3996.

Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature Reviews Genetics *6*, 836–846.

Crane, C.F., and Sleper, D.A. (2011). A model of meiotic chromosome association in tetraploids. Genome.

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., and Favrel, P. (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster Crassostrea gigas: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. PLoS One *7*, e36353.

Dheilly, N.M., Jouaux, A., Boudry, P., Favrel, P., and Lelong, C. (2014). Transcriptomic Profiling of Gametogenesis in Triploid Pacific Oysters Crassostrea gigas: Towards an Understanding of Partial Sterility Associated with Triploidy. PLoS ONE *9*, e112094.

Eberhart, A., Feodorova, Y., Song, C., Wanner, G., Kiseleva, E., Furukawa, T., Kimura, H., Schotta, G., Leonhardt, H., Joffe, B., et al. (2013). Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina. Chromosome Res *21*, 535–554.

Eudeline, Allen, and Guo (2000). Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas, in relation to tetraploid production. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. *248*, 151–161.

Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., and Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in Crassostrea gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun. *315*, 897–904.

Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaine, P., and Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Mollusca, Bivalvia). Tissue and Cell *40*, 251–260.

Gabe, M. (1968). Techniques histologiques : par M. Gabe, ... (Paris : Masson et Cie).

Garnier-Géré, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., and Gérard, A. (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster Crassostrea gigas reared in contrasting natural environments. Molecular Ecology *11*, 1499–1514.

Gong, N., Yang, H., Zhang, G., Landau, B.J., and Guo, X. (2004). Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster Crassostrea gigas Thunberg. Heredity *93*, 408–415.

Gregory, T.R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol Rev Camb Philos Soc *76*, 65–101.

Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., and Chew, K.K. (1992). Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: II. Segregation of chromosomes. The Biological Bulletin *183*, 387–393.

Guo, X., and Allen, S.K. (1994). Reproductive Potential and Genetics of Triploid Pacific Oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). Biol Bull *187*, 309–318.

Guo, X., DeBrosse, G.A., and Allen, S.K. (1996). All-triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture *142*, 149–161.

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., and Allen, S.K. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, Crassostrea gigas Thunberg. Evolution *52*, 394–402.

Hara, M., and Fukagawa, T. (2020). Dynamics of kinetochore structure and its regulations during mitotic progression. Cell. Mol. Life Sci.

Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., and Kellner, K. (2010). Gametogenic stages in triploid oysters Crassostrea gigas: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *395*, 162–170.

Jouaux, A., Blin, J.L., Adeline, B., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., and Kellner, K. (2013). Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters Crassostrea gigas — Involvement of insulin signaling. Aquaculture *388–391*, 173–181.

Khan, A.M., Rajpoot, N., Treanor, D., and Magee, D. (2014). A nonlinear mapping approach to stain normalization in digital histopathology images using image-specific color deconvolution. IEEE Trans Biomed Eng *61*, 1729–1738.

Kitajima, T.S. (2018). Mechanisms of kinetochore-microtubule attachment errors in mammalian oocytes. Development, Growth & Differentiation *60*, 33–43.

Kuroki, S., Maeda, R., Yano, M., Kitano, S., Miyachi, H., Fukuda, M., Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2020). H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline. Stem Cell Reports *15*, 424–438.

Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A., and Thiriot-Quiévreux, C. (2001a). Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Aquatic Living Resources *14*, 233–237.

Leitão, A., Boudry, P., and Thiriot-Quiévreux, C. (2001b). Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Genome *44*, 735–737.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. Cell *128*, 707–719.

Mahamadou, K.B., Issa, O., Charles, B., J.m, A.K., and Bernard, T. (2017). Caractérisation morphologique des cuvettes oasiennes du Centre-Est du Niger. Physio-Géo: Géographie Physique et Environnement 255.

McCombie, H., Ledu, C., Phelipot, P., Lapègue, S., Boudry, P., and Gérard, A. (2005). A Complementary Method for Production of Tetraploid Crassostrea gigas Using Crosses Between Diploids and Tetraploids with Cytochalasin B Treatments. Marine Biotechnology *7*, 318–330.

Nell, J.A. (2002). Farming triploid oysters. Aquaculture *210*, 69–88.

Normand, J., Le Pennec, M., and Boudry, P. (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquaculture *282*, 124–129.

Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., and Boudry, P. (2009). Reproductive effort and growth in Crassostrea gigas: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquatic Biology *7*, 229–241.

Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. Trends Genet *20*, 214–220.

Otto, and J, W. (2000). Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet *34*, 401–437.

Otto, S.P. (2007). The Evolutionary Consequences of Polyploidy. Cell *131*, 452–462.

Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., and Tran, D. (2017). How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, Crassostrea gigas. PloS One *12*, e0185918.

Peters, J.-M. (2002). The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. Molecular Cell *9*, 931–943.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., and Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture *293*, 125–156.

Poleshko, A., Mansfield, K.M., Burlingame, C.C., Andrake, M.D., Shah, N.R., and Katz, R.A. (2013). The Human Protein PRR14 Tethers Heterochromatin to the Nuclear Lamina During Interphase and Mitotic Exit. Cell Rep *5*.

Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? Journal of Cell Science *116*, 3677–3685.

Shevelyov, Y.Y., and Ulianov, S.V. (2019). The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. Cells *8*.

Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., and Joffe, B. (2009). Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. Cell *137*, 356–368.

Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T.V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. Cell *152*, 584–598.

Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., and Koji, T. (2011). Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. Acta Histochemica Et Cytochemica *44*, 183–190.

Sousa, J.T., Allen, S., Wolfe, B.M., and Small, J.M. (2017). Mitotic instability in triploid and tetraploid one-year old Eastern oyster, Crassostrea virginica, assessed by cytogenetic and flow cytometry techniques. Genome.

Staiber, W. (2012). Germ line-limited and somatic chromosomes of Acricotopus lucidus differ in distribution and timing of alterations of histone modifications in male gonial mitosis and meiosis. Chromosome Res *20*, 717–734.

Stanley, J.G., Allen, S.K., and Hidu, H. (1981). Polyploidy induced in the American oyster, Crassostrea virginica, with cytochalasin B. Aquaculture *23*, 1–10.

Stormo, B.M., and Fox, D.T. (2019). Interphase cohesin regulation ensures mitotic fidelity after genome reduplication. Mol. Biol. Cell *30*, 219–227.

Volland, M., Blasco, J., and Hampel, M. (2017). Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary Ruditapes philippinarum hemocytes. Aquatic Toxicology *185*, 86–94.

Walt, S. van der, Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., and Yu, T. (2014). scikit-image: image processing in Python. PeerJ *2*, e453.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. Cell *97*, 99–109.

Zhu, Z., and Wang, X. (2018). Roles of cohesin in chromosome architecture and gene expression. Semin. Cell Dev. Biol.

B. Analyses cytogénétiques et transcriptomiques complémentaires.

Au cours de ce travail, plusieurs autres hypothèses ont été également explorées par des études préliminaires et complémentaires aux principaux travaux de la thèse.

A l'issue sur l'altération du SAC dans le contrôle de la spermatogenèse des huîtres triploïdes, la même analyse transcriptomique sur les régulateurs du SAC au niveau d'un tissu somatique (la branchie) a également menée pour déterminer si cette perturbation dans l'expression des marqueurs du SAC impacté uniquement la gonade ou aussi les tissus somatiques.

L'étude de Dheilly et al. (2014), a montré également que des régulateurs et des acteurs de l'apoptose et des réparations des dommages à l'ADN étaient différentiellement exprimés dans la gamétogenèse triploïde. De même, Jouaux et al. (2010) ont observé des marques d'apoptose chez les huîtres triploïdes, surtout alpha. Cela pourrait suggérer aussi que des régulations sur l'intégrité de l'ADN soient mises en jeu dans le cas d'apoptose trop importante. La plupart des études ont été menées soit sans distinction des stades de gamétogenèse, soit selon les catégories alpha/beta. Par conséquent, nous avons voulu approfondir ces observations en étudiant l'expression de différents marqueurs de réparation des dommages à l'ADN.

De même, nous nous sommes interrogés sur l'état réel de la ploïdie des individus, en se posant la question inverse. Est-ce que les huîtres triploïdes alpha, non bloquées en gamétogenèse ont un patrimoine génétique réellement triploïde ? Ou alors, leur capacité à s'engager dans une gamétogenèse pourrait-il être due soit à un complet rééquilibrage de ploïdie en redevant diploïdes, soit par aneuploïdie.

1. Expression des acteurs du SAC dans la branchie au cours du cycle de gamétogénèse

Afin de s'assurer que l'expression différentielle des acteurs régulateurs du cycle cellulaire observée au cours de la spermatogenèse était surtout associée aux cellules germinales et non aux tissus somatiques, ou alors aux deux stratégies de reproduction chez les individus triploïdes alpha et beta, l'expression des acteurs du kinétochore a également été réalisée à partir branchie au cours de la gamétogenèse chez les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta. Le niveau d'expression des acteurs du kinétochore dans la branchie est globalement plus faible vis-à-vis de la gonade pour l'ensemble des acteurs aux stades 0 de repos sexuel et stade 1 des

proliférations des spermatogonies, par contre plus importante dans les gonades mâles diploïdes et triploïdes alpha au stade 2 de maturation des gamètes (Figure 22). On constate surtout que le niveau d'expression de ces différents acteurs du SAC est semblable et faible dans la branchie et la gonade des huîtres triploïdes beta, quel que soit le stade de spermatogenèse. Quant aux huîtres triploïdes alpha, les profils d'expression de l'ensemble des transcrits sont globalement similaires à ceux des huîtres diploïdes que ce soit dans la branchie ou la gonade et pour tous les stades.

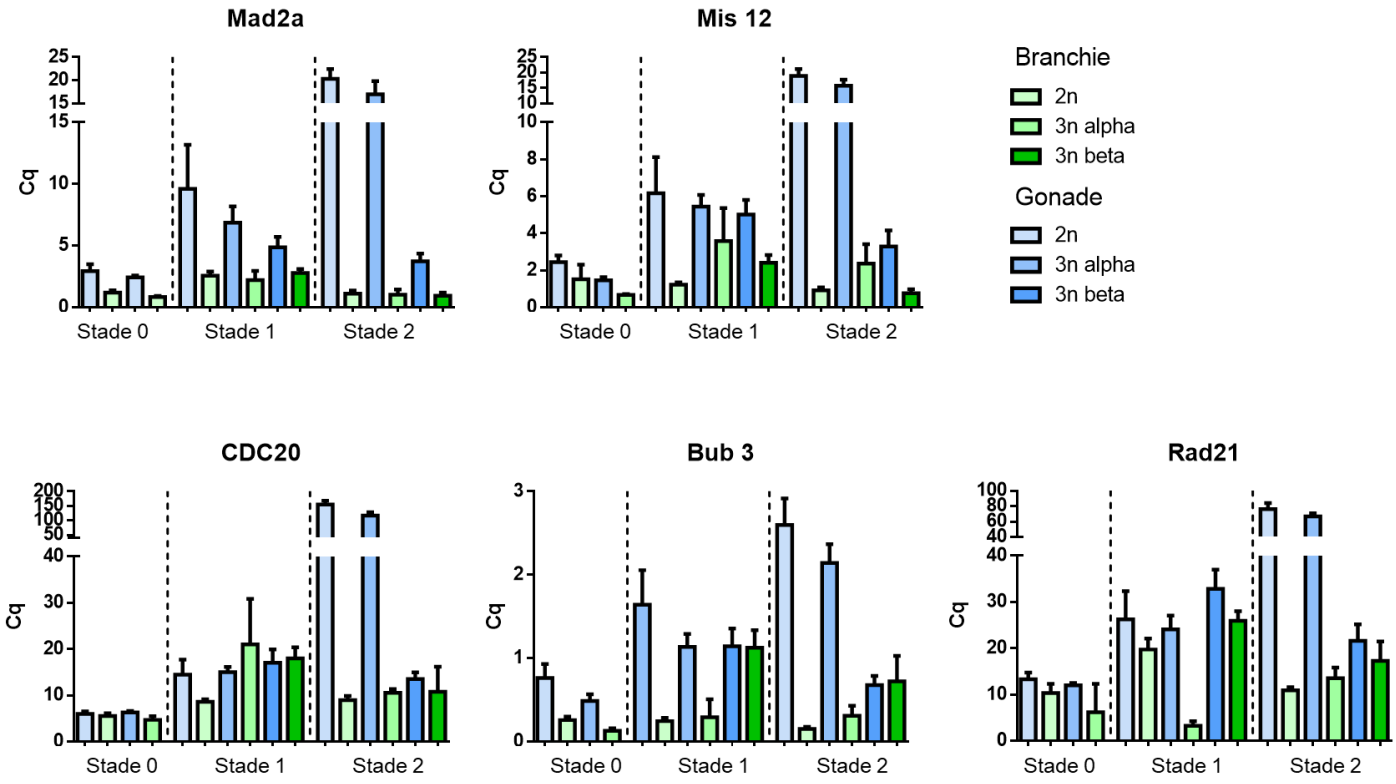


Figure 22 : Analyse transcriptionnelle de MAD2A, MIS12, CDC20, BUB3 et RAD21 par PCR quantitative dans la branchie et la gonade d'huîtres diploïdes et triploïdes mâles au cours du cycle gamétogénétique. Stades : 0 : repos sexuel, 1 : prolifération des cellules germinales et 2 : maturation des cellules germinales. Chaque colonne représente la moyenne du niveau d'expression du transcrit cible (n=6 pour la gonade et n=3 pour la branchie), rapportée au niveau d'expression du gène de référence EF1α.

Ces résultats suggèrent donc que les perturbations dans la régulation du SAC sont majoritairement associées aux cellules germinales chez les huîtres triploïdes beta et peu influencées dans le tissu somatique (partie VI.A). Une étude a montré effectivement que cdc20 était majoritairement exprimé dans le testicule au cours de la spermatogenèse de souris (Goto et Eddy, 2004). Et au regard de l'expression de ces protéines et de leurs transcrits chez l'homme,

l'ensemble de ces marqueurs (MIS12, MAD2L1, CDC20 et RAD21) sont des marqueurs caractéristiques du testicule, hormis bub3 (Thul et al., 2017) en particulier CDC20 et MAD2L1 au niveau des spermatogonies et plus tardivement dans les spermatocytes et les spermatides pour MIS12, CDC20 et RAD21.

2. Expression de facteurs impliqués dans les réparations des dommages à l'ADN

Suite à la caractérisation des régulateurs du point de contrôle du fuseau mitotique entre les individus diploïdes et triploïdes, nous nous sommes également intéressés au second point de contrôle du cycle cellulaire, le point de contrôle des dommages à l'ADN. En effet, les résultats de Dheilly et al., 2014 montraient des surexpressions des certains transcrits comme les caspases 3 et 7, l'anamorsine et les c-IAP dans les gonades des huîtres triploïdes et corroborant les observations d'apoptose chez les huîtres triploïdes alpha (Jouaux et al, 2010). L'analyse transcriptomique de trois acteurs impliqués dans la détection ou la réparation des dommages à l'ADN a été menée par qPCR dans la gonade et la branchie chez les individus diploïdes et triploïdes au cours du cycle gamétogénétique. Trois autres acteurs issus de l'analyse de Dheilly et al. 2014 ont été étudiés, la recombinase RAD51 possèdant un rôle fondamental dans la recombinaison mitotique et méiotique ainsi que dans la réparation des lésions doubles brins notamment pendant la réplication de l'ADN (Lundin et al., 2003), son paralogue RAD51B qui participe à la réparation des dommages à l'ADN en tant qu'unité fonctionnelle qui facilite l'action de RAD51 dans les recombinaisons homologues (Takata et al., 2001) et l'exonucléase RAD1 qui fait participe au complexe intervenant dans la réparation des dommages de l'ADN (Parrilla-Castellar et al., 2004). L'expression de ces acteurs est très significativement diminuée chez les individus triploïdes beta, au stade 2, dans la gonade par rapport aux individus diploïdes et triploïdes alpha. En revanche, peu de différences sont observées dans la branchie au cours de la gamétogenèse. Seul RAD1 est légèrement surexprimé au stade 1, chez les individus triploïdes alpha et beta par rapport aux individus diploïdes. Lorsque l'on compare le niveau d'expression de ces acteurs dans les deux tissus, on remarque que l'expression de ces acteurs est beaucoup moins importante dans la branchie par rapport à la gonade chez les individus diploïdes et triploïdes (Figure 23). Cette expression tissu-spécifique de nos marqueurs dans le tissu gonadique est également en cohérence avec leurs expressions dans les tissus humains (Thul et al., 2017).

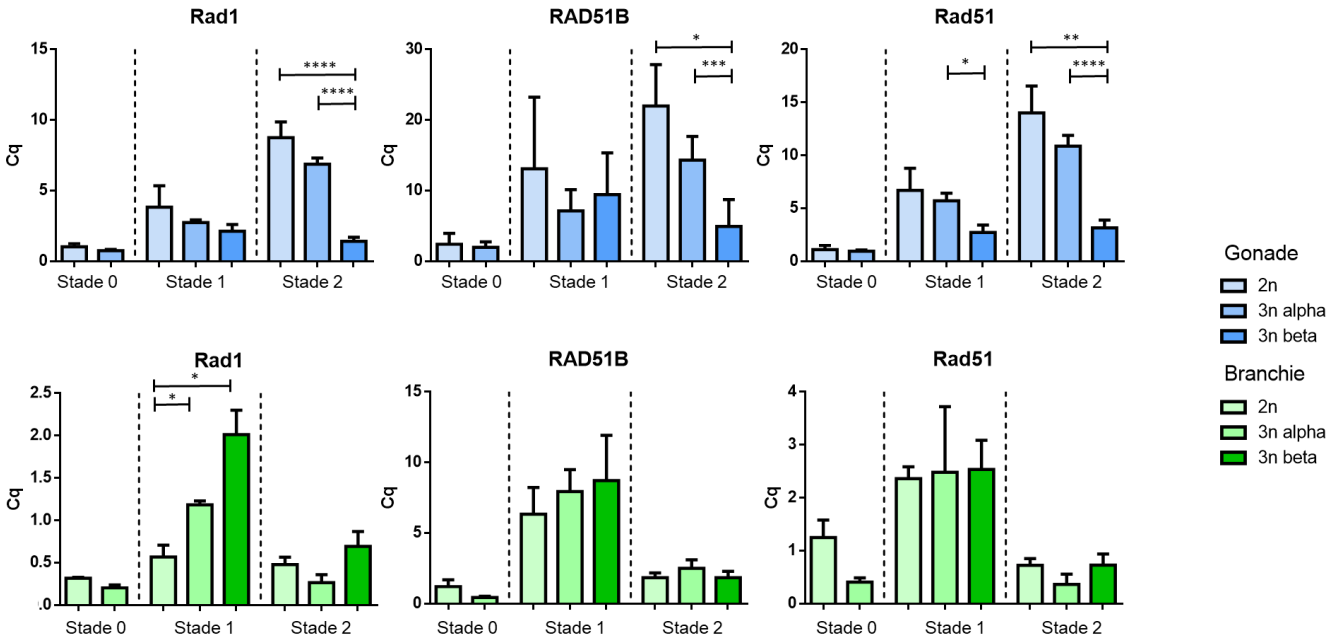


Figure 23: Analyse transcriptomique de rad1, rad51b et rad51. L'expression des transcrits a été menée par PCR quantitative dans l'aire gonadique et la branchie d'huîtres diploïdes et triploïdes mâles au cours du cycle gamétogénétique (Stade 0 : repos sexuel, stade 1 : prolifération des cellules germinales, stade 2 : maturation des cellules germinales). Chaque colonne représente la moyenne du niveau d'expression du transcrit cible (n=6 pour la gonade et n=3 pour la branchie) par rapport au niveau d'expression du gène de référence EF1α. Une analyse statistique (Test de Student) a permis la comparaison du niveau d'expression entre les individus diploïdes et triploïdes au cours des stades du cycle gamétogénétique. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (****: p <0,0001, ***: p< 0,0005, **: p<0,001 et * : p<0,05).

3. Analyse de la ploïdie des individus

Pour s'assurer de la ploïdie des animaux employés dans l'ensemble des expérimentations, la vérification de la diploïdie et de la triploïdie a été assurée par cytométrie en flux. En parallèle, nous nous sommes intéressés à déterminer si les deux stratégies de reproduction des huîtres triploïdes, alpha et beta, pouvaient être dues à des différences de ploïdie, soit par un rééquilibrage de la ploïdie, soit par de l'aneuploïdie. Aussi, une analyse plus précise de la ploïdie a été abordée par deux approches préliminaires, l'établissement de caryotypes et par cytométrie en flux.

a) Caryotypes

Dans un premier temps, la ploïdie a été étudiée par la réalisation de caryotypes d'individus diploïdes et triploïdes. Ces caryotypes ont été réalisés à l'aide de dissociation tissulaire de cellules branchiales et d'aire gonadique. Pour ce faire, les branchies ainsi que l'aire gonadique disséquées sont placées en condition de choc hypotonique (tampon citrate de sodium 0,9% (w/v) pendant 20 min, puis 0,45% (w/v) pendant 20 min) puis fixées dans une solution de Carnoy (1 volume d'acide acétique glacial et 3 volumes éthanol absolu), deux fois 10min puis deux fois 20min. Les tissus sont séchés, dissociés à l'aide d'un polytron, puis 150µL de solution d'eau acidifiée 60% (v/v) (acide acétique) sont ajoutés pendant 20min et la solution est ensuite déposée sur lame Superfrost préalablement chauffée à 44°C. Les lames sont ensuite colorées au Giemsa (KaryoMax®) dans du tampon Gurr (*Buffer Tablets Gurr*, pH 6,8 ; Sigma) pendant 5 à 10min). Les caryotypes sont visualisés en microscopie optique au grossissement total x1000.

Après plusieurs modifications dans les conditions d'obtention des caryotypes, il n'a pas été permis d'obtenir des caryotypes reproductibles et suffisants pour déterminer la ploïdie des individus quel que soit le tissu utilisé (branchie ou aire gonadique). Deux difficultés majeures ont été rencontrées. Un éclatement non total et très hétérogène des noyaux cellulaires a rendu l'obtention des caryotypes particulièrement difficile. De plus, un étalement insuffisant des chromosomes ne permet pas le dénombrement exact du nombre de chromosomes de chaque individu (Figure 24). Une autre contrainte à l'obtention d'un nombre suffisant de caryotypes est la difficulté à obtenir un nombre suffisant des cellules en prolifération, lié à l'incapacité à réaliser de la culture cellulaire de cellules d'huîtres, mais aussi à la difficulté d'isoler les cellules en prolifération à partir de la gonade, imbriquée dans d'autres tissus.

Si le but était de montrer des différences de ploïdie entre les huîtres triploïdes alpha et beta, cela s'est avéré infructueux. Cependant l'hypothèse d'une réversion de l'état triploïde à l'état diploïde est peu envisageable. Face à la difficulté d'aborder cette question par le caryotypage, nous avons entrepris une analyse en cytométrie en flux.

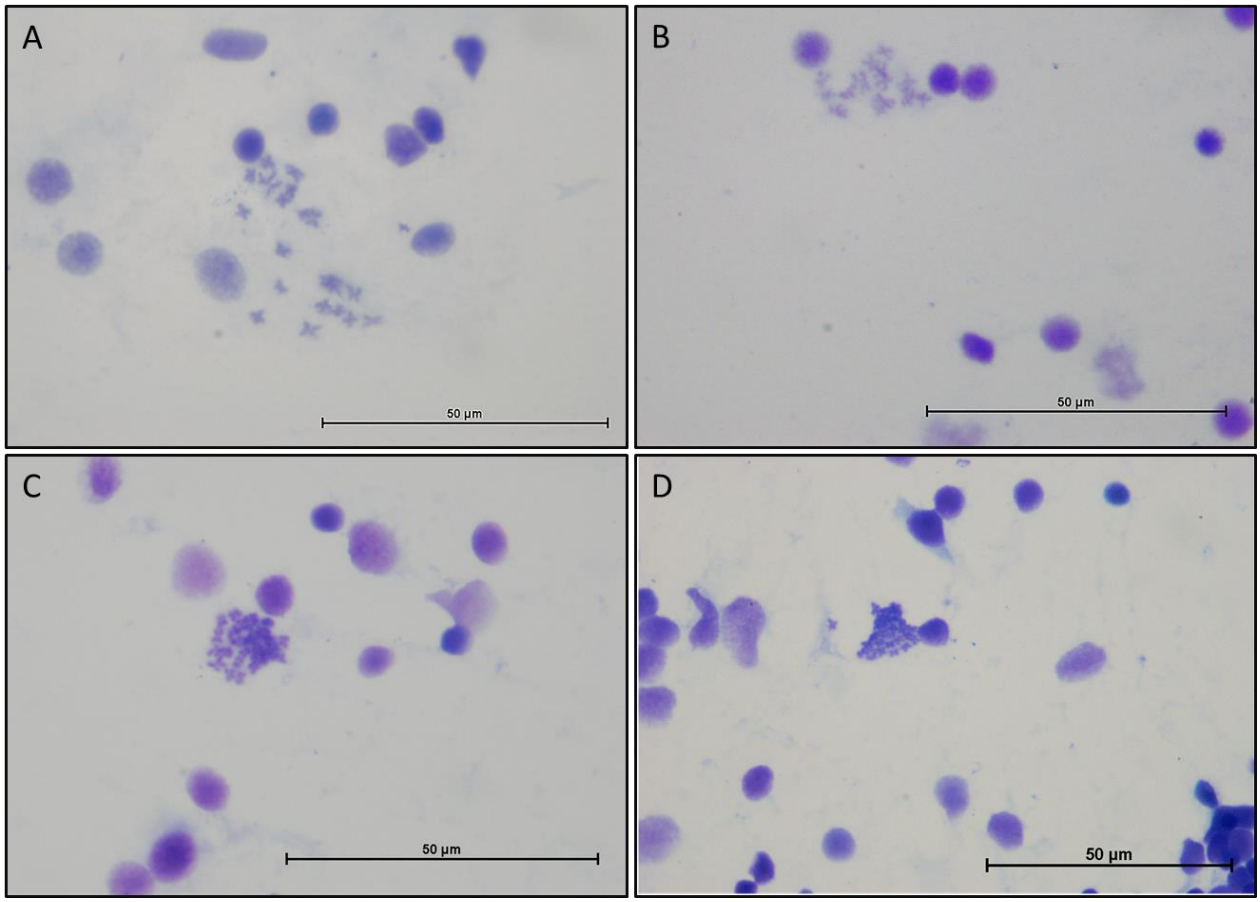


Figure 24 : Caryotypes obtenus à partir de cellules branchiales d'huître creuse diploïdes (A et B) et triploïdes (C et D) observés au microscope optique photonique après coloration au Giemsa.

b) Cytométrie en flux

La seconde approche permettant d'étudier la ploïdie des individus est la cytométrie en flux (Figure 25). Cette technique présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide mais également d'être quantitative et précise. Après dissociation tissulaire, l'ADN des cellules branchiales a été marqué à l'iodure de propidium. La mesure de fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'ADN des cellules, cela permet de construire un profil qui permet de conclure sur la ploïdie de chaque individu.

A l'issue de cette analyse, il n'a pas été possible d'étudier des variations de ploïdie entre les individus triploïdes alpha et beta, certainement par le fait que les échantillons de tissu de l'ensemble des individus diploïdes et triploïdes de l'étude avaient été conservés à -80°C pour les extractions d'ADN, d'ARN et de protéines. Cette conservation n'a donc pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants en cytométrie en flux.

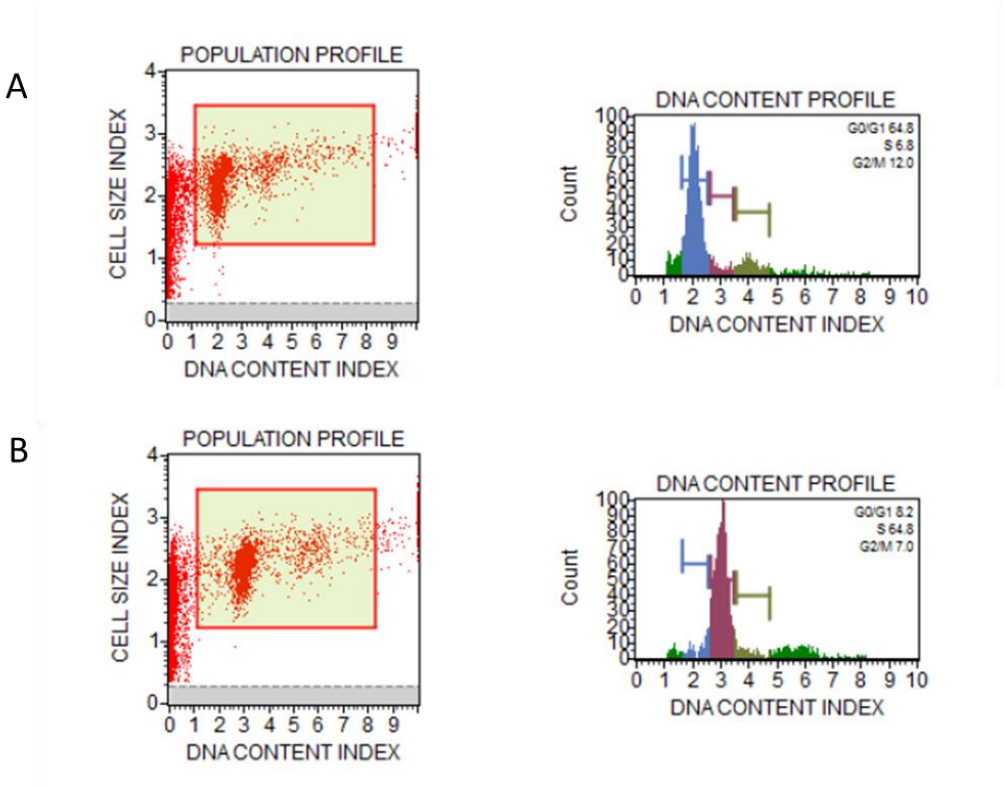


Figure 25 : Analyse de la ploïdie des cellules branchiales d'un individu diploïde (A) et triploïde (B) obtenue par cytométrie en flux.

VII. Discussion

A. Les stratégies de reproduction des animaux triploïdes sont-elles associées à des états de ploïdie différents ?

Les objectifs de ces recherches étaient d'une part d'initier des approches cytogénétiques pour vérifier la ploïdie des lots d'huîtres diploïdes et triploïdes utilisés, mais aussi d'étudier d'éventuelles variations de ploïdie chez les individus triploïdes alpha et beta.

A l'issue de l'analyse par caryotypage et par cytométrie en flux, il n'a pas été possible de conclure sur d'éventuelles variations de ploïdie expliquant les deux stratégies de reproduction chez les huîtres triploïdes alpha et beta.

Une grande partie des caryotypes de Mollusques sont réalisés chez l'embryon (Barranger et al., 2015) ou à partir de branchies où un grand nombre de cellules en prolifération sont retrouvées

(Leitão et al., 1999, 2001a). Cependant dans le cas de l'étude de la reproduction des huîtres triploïdes alpha et beta, nous avons appliqué les méthodes de caryotypage sur la branchie (tissu somatique) et sur l'aire gonadique (tissu germinal). Si l'aire gonadique est un tissu non utilisé en cytogénétique, il nous est paru intéressant de réaliser cette étude sur l'aire gonadique d'animaux en stade 1 (prolifération des gonies) où un plus grand nombre de métaphases est attendu. A l'issue de ces expérimentations, l'utilisation d'aire gonadique n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats que dans les branchies, employées en parallèle. Cependant, l'étalement des chromosomes a été amélioré par des modifications de la concentration en eau acidifiée, à savoir une concentration optimale à 45% et un dépôt sur des lames chauffées à 44°C. Toutefois, une augmentation considérable du nombre de figures de mitose par lame est nécessaire afin d'obtenir une qualité de caryotype satisfaisante. Au vu des difficultés rencontrées une seconde approche a été utilisée, la cytométrie en flux. Cette technique nous a permis de valider la ploïdie des lots huîtres diploïdes et triploïdes utilisés dans notre étude. En revanche, l'évaluation des variations de ploïdie n'a pas pu être réalisée. En plus des difficultés techniques rencontrées dû à une conservation des échantillons non adapté à la technique, il a été difficile de trouver un témoin diploïde satisfaisant. En effet, l'aneuploïdie est fréquente chez les individus diploïdes (Thiriot-Quiévreux et Insua, 1992; Leitão et al., 2001), par conséquent, il est difficile de choisir un individu diploïde comme témoin sans avoir vérifié en amont sa ploïdie avec certitude par l'obtention de nombreux caryotypes.

Peu d'études ont été réalisées sur les variations de ploïdie chez les triploïdes. Parmi celle-ci, l'analyse de la ploïdie menée par Gong et al., 2004 par croisements d'individus diploïdes et triploïdes n'a pas permis de vérifier cette hypothèse, mais surtout qu'à l'issue des croisements la descendance montrait de forts taux d'aneuploïdie. De manière similaire, Li et al., 2012, par croisements de loches (*Misgurnus anguillicaudatus*) 2n, 3n et 4n, n'a montré aucun retour à une ploïdie 2n dans la descendance, mais surtout une aneuploïdie importante.

B. Expression de facteurs impliqués dans les réparations des dommages à l'ADN

L'analyse des régulations des acteurs impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN a montré une diminution significative de l'expression de ces acteurs dans la gonade chez les individus beta par rapport aux individus alpha et diploïdes uniquement au stade 2 de

différenciation des cellules germinales. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'en stade 2 de maturation des cellules germinales, les méioses permettent la différenciation des cellules germinales impliquant de nombreux processus de recombinaison. Pour que ces recombinaisons se produisent, une bonne cohésion des chromosomes homologues est nécessaire ainsi que la réparation des cassures doubles brin de l'ADN. Une étude chez le mollusque bivalve *Nodipecten subnodosus* (la pétoncle patte de lion géante), a montré une augmentation significative de l'expression de RAD51 dans la gonade au cours du cycle gamétogenèse confirmant son rôle à la fois dans la réparation des dommages à l'ADN lors des processus de mitoses mais surtout au cours de la méiose (Llera-Herrera et al., 2013). De plus des niveaux élevés de RAD 51 ont été observés dans les tissus méiotique de poulet (Bezzubova et al., 1993), de souris (Morita et al., 1993) et humain (Shinohara et al., 1993) confirmant son rôle majeur dans les mécanismes de recombinaison homologue au cours de a méiose chez un grand nombre d'organismes. Rad 51 a été conservé au cours de l'évolution, de levures aux mammifères, par conséquent c'est un acteur clé dans les processus de recombinaison chez les Eucaryotes (Heyer, 1994; Morita et al., 1993; Shinohara et al., 1993). La diminution significative de l'expression de RAD 51, son paralogue RAD51B ainsi que RAD1 chez les individus triploïdes beta par rapport au individus alpha et diploïdes au cours du stade 2 de différenciation des cellules germinales montre leurs implications dans les perturbations de la gamétogenèse observées chez les individus triploïdes beta. Une étude, dont le but été d'identifier des candidats potentiels impliquées dans la stérilité des individus triploïdes chez *Nodipecten subnodosus,* avait sélectionné ces trois acteurs comme potentiellement impliquées dans les perturbations de la gamétogenèse des individus triploïdes (Llera-Herrera et al., 2013). Nos travaux confirment le rôle de ces acteurs dans les perturbations de la gamétogenèse observées chez l'huître triploïdes, *Crassostrea gigas.* Dans la branchie, l'expression de RAD51 et RAD51B n'est pas significativement différente au cours du cycle de gamétogenèse. Globalement, une expression beaucoup plus faible est retrouvée par rapport à la gonade. Les faibles variations observées dans la branchie peuvent être due au contrôle de la réplication de l'ADN avant l'entrée des cellules somatique en phase de mitose. Des études immunocytochimiques ont révélé que RAD 51 s'accumule sur l'ADN chromosomique au cours de la méiose au moment des recombinaison homologue mais également dans les cellules somatiques suite à des dommage de l'ADN (Haaf et al., 1995; Plug et al., 1996; Barlow et al., 1997).

RAD1 est un élément du complexe 9-1-1 (associant RAD9-RAD1-HUS1) et participe au point de contrôle méiotique chez la souris, et la perte de fonction par KO de HUS1 entraine une fertilité réduite masculine, mais aussi le blocage des cellules germinales en prophase 1 de méiose. Cette déplétion s'accompagne également d'une réduction des cellules germinales est associée à de l'apoptose (Lyndaker et al., 2013). RAD51 est également impliqué dans l'infertilité masculine. Notamment par son association avec MSH4 et -5 (« MutS Homologs ») pour la stabilisation au niveau des chiasmasta pendant la recombinaison, sa déplétion entraine un arrêt de la méiose (Gordon et Lamb, 2007; Mukherjee et al., 2010). Son homologue RAD51B, mais RAD51C sont également impliqués dans les réparations à l'ADN. Kuznetsov et al., 2007 ont démontré que des mutants de *rad51c* conduisaient à l'infertilité masculine de souris par un arrêt de la méiose en prophase I. Chez la femelle, ces mutants entrainaient également une infertilité par une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs pendant la métaphase II (Kuznetsov et al., 2007).

Ainsi, cette étude préliminaire semble suggérer que l'infertilité des huîtres triploïdes beta pourrait être due à des perturbations des recombinaisons homologues pendant la méiose résultant d'une diminution de l'expression des acteurs impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN.

Chapitre 2 : Etude des régulations traductionnelles et épigénétiques de la reproduction de l'huître creuse triploïde, *Crassostrea gigas*

Chapitre 2 : Etude des régulations traductionnelles et épigénétiques de la reproduction de l'huître creuse triploïde, *Crassostrea gigas*

Chez l'huître creuse triploïde, la caractérisation des cellules germinales précoces a permis de mettre en évidence des amas de gonies bloquées présentant une forte condensation nucléaire chez les individus triploïdes beta, dès le stade de prolifération des cellules germinales (stade 1) et persistant tout au long du cycle de gamétogenèse. L'aspect cellulaire des gonies des individus triploïdes beta est très différent de ce qui est observé chez les individus diploïdes et triploïdes alpha (Jouaux et al., 2010). Ces condensations nucléaires pourraient être associées aux fortes perturbations de la gamétogenèse observée chez les individus triploïdes beta. Ces observations suggèrent des régulations épigénétiques différentes entre les huîtres triploïdes alpha et beta, avec chez les individus alpha une structuration globalement proche des huîtres diploïdes. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à la compréhension des mécanismes de régulations génétiques (transcriptomique et protéique) et épigénétiques de la reproduction induisant deux catégories d'individus triploïdes alpha et beta. Pour permettre de montrer si des régulations au niveau de l'expression des gènes ou épigénétiques associées à une condensation de la structure de la chromatine des cellules germinales chez les individus triploïdes beta sont liées au blocage de la gamétogenèse, notre étude propose dans un premier temps, une analyse protéomique globale afin de compléter les résultats obtenus dans le chapitre 1 de ce manuscrit. L'analyse du protéome des individus triploïdes et des modifications post traductionnelles de ces protéines permettra dans un second temps de démontrer l'implication éventuelle de régulations épigénétiques dans les perturbations de la gamétogenèse chez les individus triploïdes. Enfin, une approche préliminaire de modifications chromatiniennes sera abordée dans une dernière partie.

I. Introduction

A. Les régulations épigénétiques

Le phénotype est l'ensemble des caractères exprimés par un individu (morphologiques, physiologiques et comportementaux). De nombreuses études montrent l'implication de mécanismes épigénétiques dans la mise en place du phénotype (Foret et al., 2012; Flores et al., 2013; Riviere et al., 2013; Herman et Sultan, 2016). En fonction des différents domaines de recherche dans lesquels l'épigénétique est impliquée, différentes définitions de l'épigénétique ont été proposées (Tableau 4) (Nicoglou et Merlin, 2017). Dans notre étude, l'épigénétique est définie par des modifications de l'expression des gènes (aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel) sans en altérer leurs séquences, mais moduler l'expression jusqu'aux protéines. Ces modifications sont réversibles, transmissibles sur une ou plusieurs générations et adaptatives. A l'heure actuelle, les principales modifications épigénétiques identifiées sont : l'ajout de composés chimiques sur l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et variantes d'histones et les ARNs non codants. Toutes ces mécanismes vont agir directement ou indirectement sur la structure de la chromatine entrainant des changements dans l'expression des gènes (Keung et al., 2015).

Tableau 3 : Résumé des différentes conceptions de l'épigénétique, de leurs définitions, des domaines de recherche concernés et des problèmes qu'elles tentent de résoudre. Tiré de : (Nicoglou et Merlin, 2017).

Conception	Definition The study of	Fields	Problem
W-epi (*Waddington's epigenetics*) 1940s	Causal mechanisms at work in development, by which the genes of the genotype bring about phenotypic effects. (1940s)	Classical genetics and experimental embryology → developmental biology	Development (at the organismal level)
N-epi (*Nanney's epigenetics*) 1950s-60s	Auxiliary integrative systems regulating the expression of genetic potentialities.	Chemical (molecular) genetics and developmental biology	Development (at the cellular level)
RH-epi (Rigg's and Holliday's epigenetics) 1970s → 1990s-2000s & **M-epi** (Molecular epigenetics) 2000s-10s	Mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence. Any chromatin modification affecting gene expression, whether it is heritable or not.	Molecular genetics and epigenetics	Development (at the molecular level)
ED-epi (Evo-Devo epigenetics)	Developmental mechanisms (above the level of DNA sequence) at the origin of the phenotype and its modification across evolution (1990s-2010s).	Developmental genetics Evo-devo biology Systems biology	The origin of phenotypic variation and the interplay between development and evolution
ES-epi (Extended Synthesis epigenetics)	Mix of N-epi & ED-epi; Focus on transgenerational epigenetic inheritance (2000s- 2010s).	Evo-devo biology Evolutionary biology Systems Biology	The origin of phenotypic variation and evolution → Towards an extended (or expanded) synthesis

B. La chromatine, support dynamique de l'information génétique

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est présent dans le noyau sous la forme d'une structure nucléoprotéique appelé chromatine. Outre sa fonction d'empaquetage, qui permet de condenser l'ADN, la chromatine joue un rôle dynamique essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN, mais aussi au cours de la mitose et la méiose. En servant de support à l'information génétique, la condensation et les modifications de la chromatine est un outil indispensable pour moduler l'expression des gènes (Margueron et Reinberg, 2010).

La chromatine est constituée d'un assemblage complexe d'ADN et de protéines. La chromatine est structurée en successions de nucléosomes qui sont des octamères protéiques composés de deux tétramères de protéines histoniques (les histones H2A, H2B, H3 et H4) autour desquels sont enroulées entre 145 à 147 paires de bases d'ADN (Kornberg, 1974). Ces histones sont caractérisées par un domaine C-terminal globulaire, formé de trois hélices alpha permettant la dimérisation des histones et servant de base à la formation du cœur du nucléosome. L'extrémité N-terminale des histones émerge de la surface du nucléosome et est la cible privilégiée de nombreuses modifications post-traductionnelles. Le réseau de nucléosomes associés à l'ADN est ordonné en une fibre structurée en « collier de perle » représentant le premier degré d'organisation de la chromatine (Figure 26) (Luger et al., 1997). La liaison à l'ADN internucléosomique est stabilisée par une autre protéine histone (H1) appelée histone de liaison qui va permettre l'organisation du réseau de nucléosomes en fibre de chromatine (ou appelée encore nucléofilament). Le nucléofilament est considéré comme le second niveau d'organisation de l'ADN (Happel et Doenecke, 2009). Le dernier niveau de compaction de la chromatine est atteint lorsque la fibre de chromatine se replie pour former le chromosome métaphasique (Figure 26).

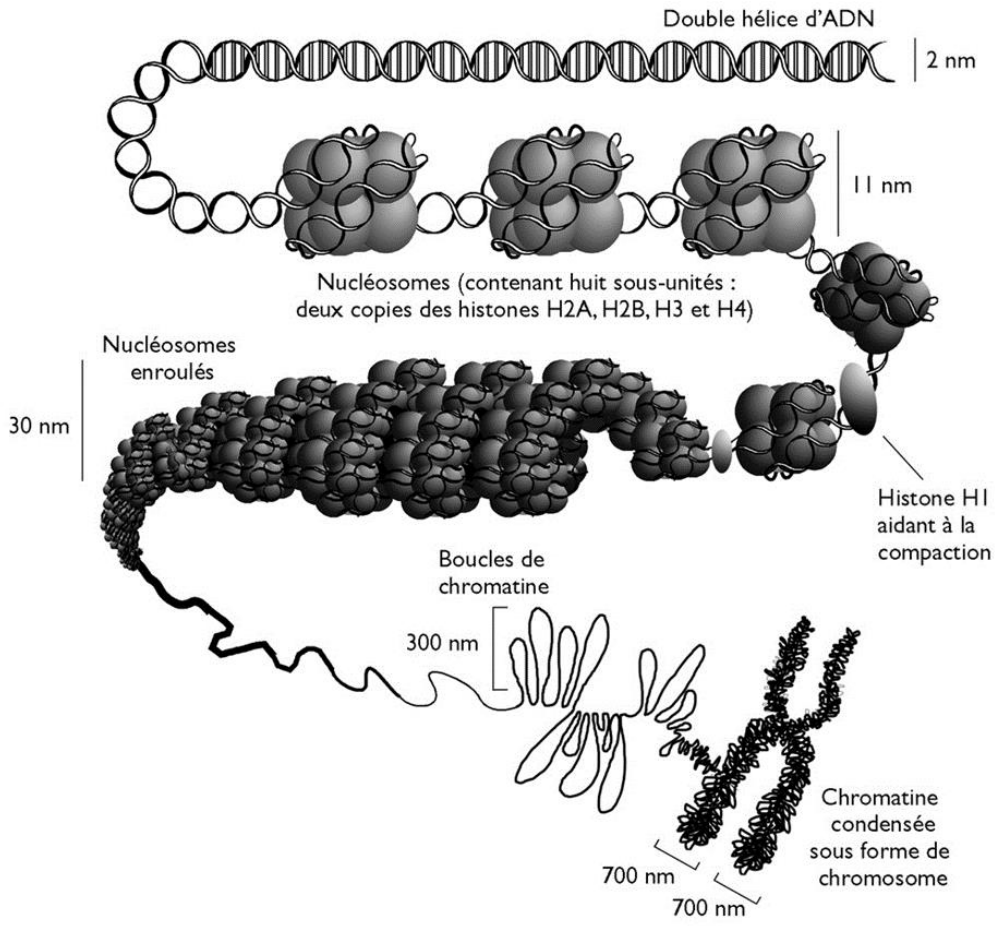


Figure 26 : Organisation de compactions successives de la chromatine nucléaire. Elle se compose d'un enchainement de nucléosomes (octamères d'histones autour desquels s'enroule l'ADN) et stabilisé par l'histone H1. Progressivement, cette structure s'enroule de nombreuses fois en fibres de plus en plus grosses. Les multiples niveaux de compactions successives peuvent mener au chromosome métaphasique, la structure la plus condensée de l'ADN. Tiré de (Brodeur et Toussaint, 2006).

La complexité de l'organisation de la fibre de chromatine reflète les états de conformation variés qui sont impliqués dans la transition entre l'hétérochromatine inactive (ou retardée comme pendant la réplication) et l'euchromatine active en terme de transcription et de réplication. L'hétérochromatine et l'euchromatine correspondent respectivement à différents états condensés et décondensés de la chromatine. Ainsi, la chromatine diffère dans ses propriétés structurales et dynamiques afin d'assurer ses différentes fonctions cellulaires (Woodcock et Ghosh, 2010).

Les états de compaction/décompaction de la chromatine peuvent ainsi moduler l'expression des gènes, ces modulations correspondant aux régulations épigénétiques. Parmi les

régulations épigénétiques, les principales sont les modifications chimiques de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non codants (Figure 27) (Berger et al., 2009).

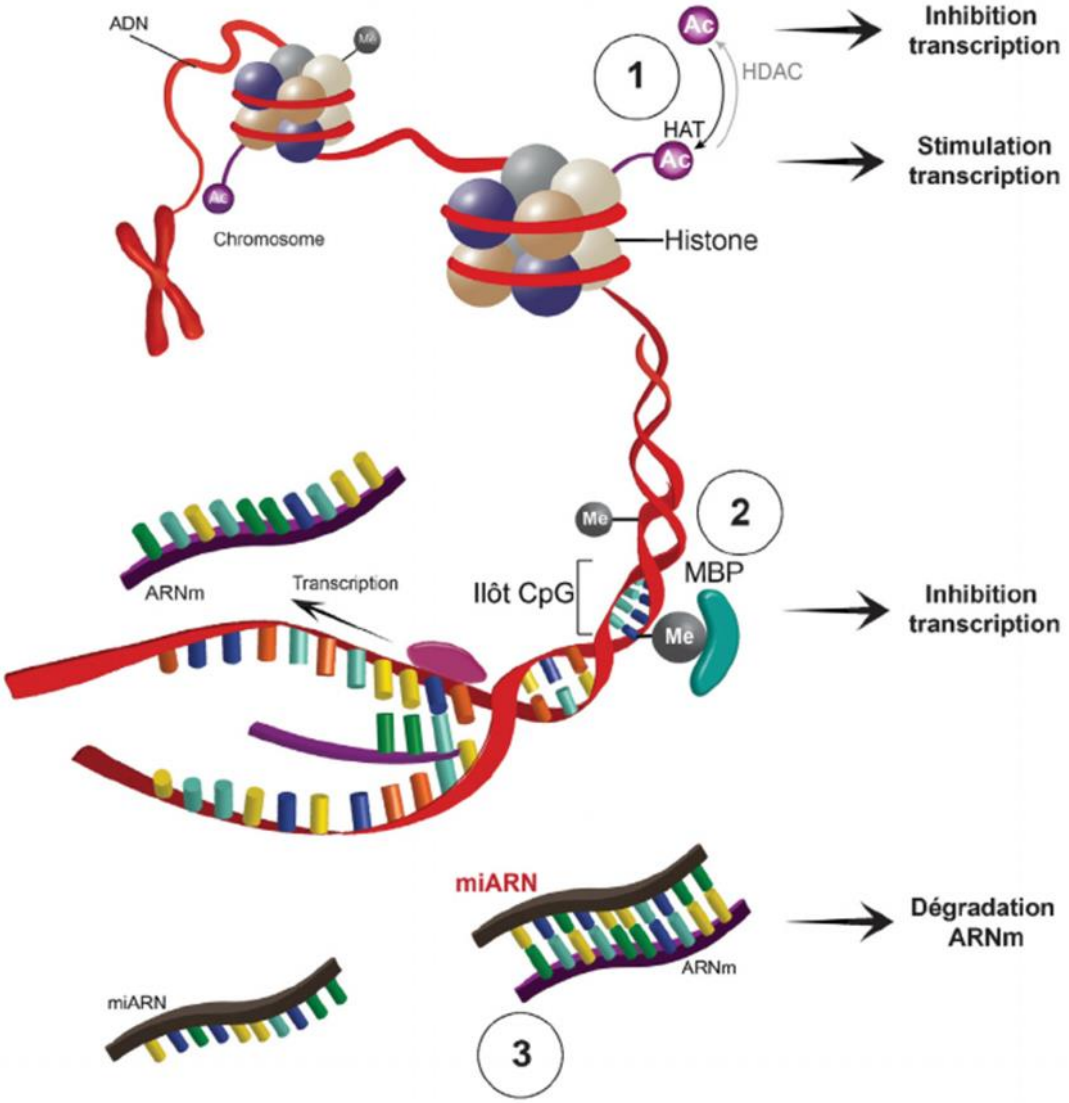


Figure 27 : Mécanismes épigénétiques impliqués dans la modulation de l'expression de gènes. Modifications des histones (1). L'ajout d'un groupement acétyl au niveau des histones catalysé par les histones acétylases (HAT), provoque une diminution de l'interaction entre histones et ADN ce qui favorise un déroulement de la chromatine permettant son accès à des facteurs de transcription. Contrairement aux HAT, les histones désacétylases (HDAC) provoquent l'effet inverse ce qui entraine une répression de la transcription. Modifications de l'ADN (2). La méthylation de l'ADN sur les cytosines des îlots CpG induit une compaction des nucléosomes provoquant une diminution de l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription réprimant ainsi la transcription. Modifications post-transcriptionnelles par les ARN non codants de type miARN (3). Les miARN sont capables de se lier à des ARNm complémentaires, cette fixation entrainant la dégradation de l'ARNm cible et inhibe ainsi sa traduction. Tiré de : (Melchior et Poisbeau, 2015).

C. Les différents modifications épigénétiques

1. Modifications chimiques de l'ADN

La principale modification chimique de l'ADN est la méthylation qui consiste à l'ajout d'un groupement méthyl sur un des carbones de certaines bases azotées de l'ADN (Figure 28). Elle est impliquée dans la formation et la maintenance de la chromatine. Elle constitue un élément clé de la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Flores et al., 2013). Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN se produit principalement sur les résidus cytosines de séquences dinucléotidiques palindromiques 5'-CG-3' appelés dinucléotides CpG (Cytosine phosphate Guanine) en 5 méthylcytosine (5-mC) et occasionnellement au sein de trinucléotides 5'-CHG-3' et 5'-CHH-3' où H=A, C ou T. La méthylation des cytosines est assurée par des enzymes qui sont très conservés au sein des eucaryotes, les ADN méthyltransférases (DNMT ou DNA MethylTransferases) (Figure 28) (Feng et al., 2010).

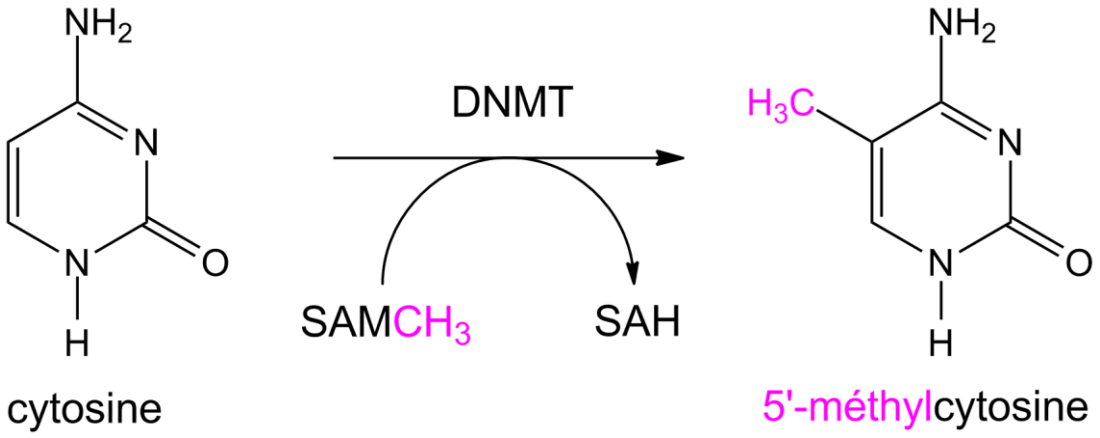


Figure 28 : Méthylation de l'ADN sur le carbone 5 d'un résidu cytosine. Les cytosines peuvent être modifiées par l'ajout d'un groupement méthyl (-CH3). Cette réaction est effectuée par des enzymes particuliers : les ADN méthyltransférases (DNMT ou DNA MethylTransferases). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyl du cofacteur S-Adénosyl-Méthionine (SAM) sur le C5 de la cytosine. Il en résulte la formation de la 5-méthyl-cytosine et la libération de la S-adénosyl-homocystéine (SAH).

Les profils de méthylation de l'ADN sont très diversifiés, il existe quatre types de degré de méthylation : le génome est très faiblement méthylé, le génome est faiblement méthylé, le génome est globalement fortement méthylé et la méthylation est de type mosaïque c'est-à-dire présentant des zones fortement méthylées séparées par des zones non méthylées (Aliaga et al., 2019). Chez les mammifères, la grande majorité des espèces présentent une méthylation globale du génome. Cette caractéristique est également retrouvée chez de nombreuses espèces de plantes, de poissons, quelques mollusques, insectes et amphibiens. A l'inverse chez de nombreuses autres espèces comprenant des insectes, des nématodes, la totalité des champignons et certaines algues et plantes, la méthylation de l'ADN est globalement faible voire très faible dans le génome. Enfin, la méthylation de type mosaïque est retrouvée chez certaines espèces d'insectes, de plathelminthes et de mollusques notamment chez *Crassostrea gigas* (Feng et al., 2010; Aliaga et al., 2019).

2. Modifications épigénétiques des histones

Grâce à leur domaine C-terminal globulaire, les histones forment le cœur des nucléosomes, unité de base de la chromatine. Leur extrémité N-terminale est la cible privilégiée des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou encore la sumoylation (Kouzarides, 2007; Rando et Chang, 2009; Bannister et Kouzarides, 2011). Ces modifications constituent un processus clé dans la régulation épigénétique puisqu'elles vont permettre de moduler l'expression des gènes en régulant l'accessibilité à la chromatine (Bannister et Kouzarides, 2011). Ainsi selon le résidu concerné et le type de modification présente, les modifications des histones peuvent conduire à l'activation ou à la répression de gènes (Figure 29).

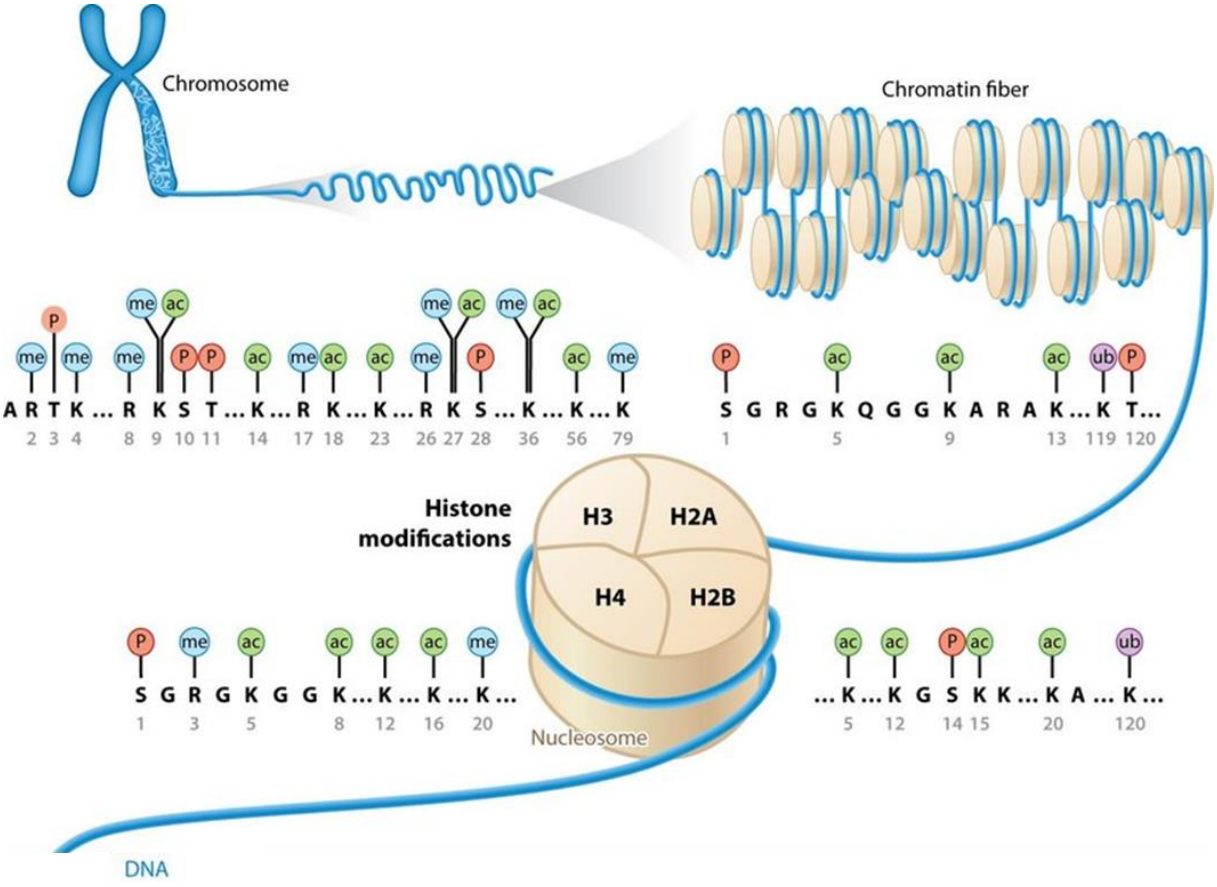


Figure 29 : Modifications post-traductionnelles des histones chez les Mammifères. Toutes les histones sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles qui sont localisées principalement au niveau de leurs queues N-terminales. Les principales modifications sont représentées sur cette figure : acétylation (ac, vert), phosphorylation (P, rouge), méthylation (me, bleu) et ubiquitination (ub, violet). Les nombres en gris situés en dessous de chaque acide aminé représente la position des modifications dans la séquence à partir de l'extrémité N-terminale. Tiré de : (Chen et al., 2017).

a) Acétylation des histones

L'acétylation des histones est un processus dynamique qui se produit sur les résidus lysines. Elle est réalisée par deux familles d'enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC) (Lee et Workman, 2007; Bannister et Kouzarides, 2011). Les HAT catalysent le transfert d'un groupement acétyl vers le groupement aminé de la chaine latérale du résidu lysine. Leur action conduit à la neutralisation de la charge positive des lysines qui affaiblit l'interaction électrostatique entre l'ADN et les histones cibles, la chromatine adopte ainsi une structure plus relaxée permettant la transcription (Yang et Seto, 2007). A l'inverse des HAT, les HDAC enlèvent l'acétyl des résidus lysines en restaurant leur charge positive et en

stabilisant l'architecture de la chromatine. Ainsi, les HDAC sont associées à des complexes répresseurs. De plus, contrairement aux HAT, elles sont peu spécifiques et sont capables de désacétyler de multiples sites au sein des histones (voir Figure 27) (Bannister et Kouzarides, 2011).

b) La méthylation des histones

La méthylation des histones se produit sur les résidus lysines (mono-, di- ou triméthylés), ou sur les résidus arginines (mono-, diméthylés) (Bedford et Clarke, 2009; Ng et al., 2009; Bannister et Kouzarides, 2011). Comme l'acétylation, la méthylation des histones est un processus dynamique qui requiert deux types d'enzymes, les histones méthytransférases (HMT) et les déméthylases. Les HMT catalysent le transfert d'un groupement méthyl vers le groupement aminé de la chaine latérale du résidu lysine (PKMT « Protein lysine methyltransferase ») ou le groupement guanidine du résidu arginine (PRMT « Protein arginine methytransferase »). A l'inverse les groupements méthyls sont éliminés par deux familles d'enzymes, les Jumonji (Tsukada et al., 2006) et les déméthylases des lysines (LSD « lysine specific histone demethylase ») (Shi et al., 2004). Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones n'altère pas la charge de l'histone et n'a donc pas d'effet direct sur la structure de la chromatine (Bannister et Kouzarides, 2011). Ainsi en constituant des sites de fixation pour des protéines et des complexes spécifiques, la méthylation des histones entraine selon le cas l'activation ou la répression des gènes.

c) Autres modifications des histones

Outre l'acétylation et la méthylation, les histones subissent de multiples modifications telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation … Seule la phosphorylation sera décrite dans ce paragraphe.

La phosphorylation des histones est gouvernée par deux types d'enzymes : les kinases et les phosphatases. Elle a principalement lieu sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine (Oki et al., 2007). Tout comme l'acétylation, la phosphorylation influence directement la structure de la chromatine en modifiant les charges des histones (Bannister et Kouzarides, 2011). D'autre

part, elle semble influencer les autres modifications post-traductionnelles en stimulant ou en inhibant l'activité des enzymes des histones (Banerjee et Chakravarti, 2011).

Les histones subissent des modifications post-traductionnelles sur divers acides aminés. Ces modifications post-traductionnelles peuvent interagir les unes avec les autres, leurs effets peuvent s'annuler ou s'additionner. Collectivement, ces modifications constituent « un code histone » complexe qui régit la structure de la chromatine. De façon générale ce n'est pas une marque mais un ensemble de marques qui va agir sur la conformation de la chromatine et à l'établissement de la transcription (Gardner et al., 2011).

3. *ARN non codants*

Une partie importante du génome est transcrite mais ne donne pas obligatoirement naissance à des protéines (Nowak, 1994). Les ARN non codants sont issus de la transcription de l'ADN mais ne seront pas traduits en protéines par les ribosomes. Ces ARN non codants peuvent intervenir dans la régulation de la structure de la chromatine. Ils permettent notamment de guider les protéines ciblant la chromatine à des régions génomiques spécifiques. Les ARN non codants comprennent notamment les microARN (miARN), les longs ARN non codants (lncARN ou long non coding RNA) et les larges ARNs non codants intergéniques (LincARN ou Long intervening/intergenic non coding RNA) (Mattick et Makunin, 2006; Zhang et al., 2019).

a) *Les longs ARNs non codants*

Les lncARN possèdent des structures tridimensionnelles variées et peuvent réguler l'expression des gènes selon des mécanismes distincts (Wang et Chang, 2011; Zhang et al., 2019). Par exemple, les lncARN peuvent constituer des leurres et lier des protéines cibles telles que les facteurs de transcription, des protéines de remodelage de la chromatine les empêchant ainsi d'agir sur leurs cibles originelles et d'exécuter leurs fonctions. D'autre part, ils peuvent se lier à des protéines et leur servir de guide en les dirigeant au niveau de cibles spécifiques. Par ce mécanisme, ils induisent des variations de l'expression de gènes proches dans la séquence ou éloigneés sur un autre chromosome (Wang et Chang, 2011). Ainsi, les lncARN sont impliqués dans des mécanismes biologiques essentiels et constituent un processus épigénétique capable d'intégrer des informations de l'environnement et de moduler l'expression des gènes

selon leur structure et leur partenaire (Saxena et Carninci, 2011; Grote et Herrmann, 2013; Dey et al., 2014).

b) Les microARN non codants

Les miARN sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides (Starega-Roslan et al., 2011) qui agissent en sous-régulant des ARN messagers (ARNm) cibles, en s'y liant complétement ou partiellement entrainant ainsi la suppression de la traduction ou encore la dégradation de l'ARNm concerné (Chuang et Jones, 2007). Les miARN participent activement aux mécanismes épigénétiques en contrôlant l'expression de gènes tels que les DNMT (Rajewsky, 2006) et les HDAC (Noonan et al., 2009). Ils constituent un mécanisme supplémentaire de régulation épigénétique qui agit en collaboration avec les enzymes de remodelage de la chromatine et de l'ADN pour réguler l'expression des gènes (voir Figure 27).

D. L'épigénétique chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Parmi les mollusques, l'huître est un organisme chez qui les mécanismes épigénétiques ont été les plus étudiés. La méthylation de l'ADN est de type mosaïque avec des zones d'ADN très méthylées séparées par des zones non méthylées (Aliaga et al., 2019) et les gènes codant les DNMT1, 2 et 3 ont été identifiés (Wang et al., 2014). La méthylation des cytosines a été également démontrée chez *Crassostrea gigas* (Gavery et Roberts, 2010). Les cytosines méthylées sont localisées principalement dans les ilots CpG et essentiellement à l'intérieur des gènes (exons et introns). Par contre, les éléments répétés et les régions intergéniques sont faiblement méthylés. Enfin, le niveau de méthylation chez l'huître est proportionnel à la taille des gènes ainsi qu'à leur taux d'expression (Olson et Roberts, 2014; Wang et al., 2014), mais aussi de leurs fonctions. Les gènes liés au fonction de ménage sont hyperméthylés tandis que les gènes liés aux fonctions inductibles sont hypométhylés (Gavery et Roberts, 2010). Les modifications au niveau des histones ont été également montrées. Par exemple, l'histone déméthylase, Jumonji, intervient au cours de la gamétogenèse et de l'embryogenèse (Fellous et al., 2014). Enfin, l'intervention d'ARN non codants a été peu étudiée. Toutefois, 11668 lincARN intergéniques ont été identifiés et 1175 d'entre eux sont exprimés différemment selon le tissu étudié dont 32,5% sont préférentiellement exprimés dans la gonade mâle. De plus, l'expression des ARN non codants identifiés varie au cours du temps avec des surexpressions

de certains d'entre eux pendant les stades juvéniles suggérant un rôle dans la reproduction et le développement (Yu et al., 2016). L'expression de certains miARN varie aussi en réponse à un stress osmotique révélant le rôle important des miARN dans la réponse aux stress et la tolérance à la salinité (Zhao et al., 2016).

II. Objectifs

Afin de comprendre les mécanismes de régulation de la reproduction chez les huîtres triploïdes mâles alpha et beta, deux approches seront menées, sur les modifications épigénétiques des protéines et de L'ADN. Ces approches permettront de répondre aux questions suivantes : Y a-t-il des protéines impliquées dans les modifications épigénétiques retrouvées différentiellement exprimées entres les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta ? Trouve-t-on des profils de méthylation de l'ADN différents entre les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta au cours du cycle de gamétogenèse ?

Premièrement, une analyse protéomique globale à partir de tissu gonadique d'huîtres mâles diploïdes et triploïdes sera entreprise au cours de la gamétogenèse (stade 0 de repos sexuel jusqu'au stade 2 de maturation des cellules germinales) par une analyse en LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry). A l'issue du traitement des résultats, l'identification des protéines et leur expression relative permettra de caractériser les régulations associées à la perturbation de la gamétogenèse des huîtres triploïdes en comparant leur niveau d'expression différentielle entre les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta. Ces résultats viendront compléter les résultats transcriptomiques obtenus dans le chapitre 1 de ce manuscrit et permettront d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de régulations de la reproduction des individus triploïdes.

Dans un second temps, les modifications épigénétiques de l'ADN seront étudiées. En effet, il peut être envisagé que certains mécanismes de régulations épigénétiques au sein du génome soient mis en place chez les huîtres triploïdes afin de compenser leur génome par rapport aux individus diploïdes, notamment par la méthylation du génome ou par le « silencing » de gènes cibles. Une quantification de la méthylation totale de l'ADN dans la gonade sera alors réalisée sur les mêmes stades de la gamétogenèse mâle employés dans l'analyse protéique. Ainsi, l'ensemble des niveaux de régulation : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel aura été pris en compte dans cette étude.

III. Matériel et méthodes

A. Matériel biologique

Les huîtres *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes juvéniles proviennent d'une ferme ostréicole (Calvados, France). Elles ont été placées sur le terrain à Cricqueville en Bessin (Calvados France) en décembre 2017 jusqu'à septembre 2018. Ces huîtres ont été échantillonnées onze fois tous les quinze jours puis mensuellement jusqu'en septembre 2018. Pour chaque individu, un prélèvement de gonade a été réalisé puis congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C pour l'extraction de l'ADN génomique et des protéines. Le sexe et le stade gamétogenétique a été déterminé par histologie. Ainsi, une sélection des individus a pu être établie pour réaliser les différentes expériences (Chapitre 1- Partie-IVA).

B. Analyse protéomique globale dans l'aire gonadique d'huîtres mâles diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse

1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales des échantillons de tissu d'aire gonadique est réalisée pour chaque huître diploïde et triploïde (alpha et beta) (n=5) au cours du cycle gamétogénétique (stades 0, 1 et 2). Le tampon A (HEPES 10mM (pH 7,9) ; $MgCl_2$ 1,5mM ; KCl 10mM ; Dithiothreitol (DTT) 0,5mM ; Protease inhibitor cocktail 1X (Promega)) est ajouté à chaque échantillon d'aire gonadique à raison de 3,5 volumes par rapport à unvolume de tissu. Une homogénéisation est réalisée à la multipipette, suivie d'une incubation pendant 10min à 4°C. Les échantillons sont ensuite broyés à l'aide d'une seringue puis centrifugés à 2000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est ensuite repris dans 0,11 volumes de tampon B (HEPES 0,3M (pH 7,9) ; KCl 1,4M ; $MgCl_2$ 0,03M). Après homogénéisation et centrifugation à 10000g pendant 60min à 4°C, le surnageant est prélevé et conservé à -80°C jusqu'au dosage de l'échantillon. Pour quantifier les protéines totales extraites, un dosage de Bradford est réalisé.

2. Analyse LC-MS/MS

a) Généralités appliquées à l'analyse protéique

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique permettant l'ionisation des molécules d'un échantillon puis la séparation et la détection des ions ainsi produits en fonction de leur rapport masse sur charge noté m/z (m : masse et z : charge). Le signal électrique fourni est proportionnel au nombre d'ions détectés. Un spectromètre de masse se compose de trois parties : une source, un analyseur et un détecteur. Les espèces ionisées amenées en phase gazeuse au sein de la source sont séparées par l'analyseur en fonction de leur masse sur charge (m/z) avant d'atteindre le détecteur (Menet, 2011). Le mode d'acquisition par spectrométrie de masse en tamdem (MS/MS) se différencie de la spectrométrie de masse simple (MS) par une étape supplémentaire de fragmentations des ions sélectionnés. En MS/MS, un spectre de fragmentation représente la liste des rapports m/z des fragments issus de la fragmentation d'un peptide en fonction de l'intensité du signal généré par ces derniers (Domon, 2006; Domon et Aebersold, 2010).

D'une manière générale, l'identification des protéines se fait en deux étapes. Tout d'abord, il convient de retrouver et d'associer à chaque spectre produit par l'analyse d'un échantillon le peptide correspondant. Pour cela, nous disposons à la fois de la masse du peptide et d'informations complémentaires liées à la composition en acides aminés du peptide. L'identification des protéines en spectrométrie de masse est établie par la comparaison des masses expérimentales peptidiques avec les masses théoriques extraites de banques de données. Ces approches permettent de définir des peptides signatures à partir desquels il est possible d'identifier sans ambiguïté une protéine dans un matrice biologique donnée au regard des autres protéines potentiellement présentes. L'interprétation des spectres est facilitée par des logiciels de bio-informatiques associées à des banques de données (Nesvizhskii, 2010; Chen et al., 2020). Ces outils permettent d'identifier les peptides et de remonter aux protéines présentes dans l'échantillon. Les recherches de séquences dans ces banques de données se font par l'intermédiaire d'algorithmes commerciaux tel que PEAKS (Ma et al., 2003) ou OMSSA (Geer et al., 2004). Les analyses en LC-MS/MS ont été réalisées sur la plateforme PROTEOGEN de la SF ICORE (Unicaen).

b) Préparation des échantillons pour une analyse de type nanoLC-MS/MS (nano Liquid Chromatography-MS/MS)

Pour l'analyse protéomique, cinq microgrammes de protéines extraites de chaque échantillon de gonades mâles d'huîtres diploïdes et triploïdes ont été préparés selon un protocole de Gel-aided sample preparation (GASP) (Fischer et Kessler, 2015) avant d'être digérés à 37°C pendant la nuit, par un cocktail enzymatique de Lysine C endoprotéase et de trypsine. Les peptides sont ensuite concentrés en micro-colonne C18 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) avant injection. Dans un premier temps, les peptides sont fractionnés sur une UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) nanoElute ® (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) selon un gradient de 100 minutes (de 2 à 15% de tampon B (acétonitrile ; 0,1% acide formique) en 60 min, augmentation à 25% de tampon B en 30 min puis à 37% en 10 min, suivi par une étape de lavage à 95% de tampon B avant rééquilibration à un débit de 400 nL/minute (Le tampon A : 0,1% acide formique dans H_20 est utilisé pour dilué le tampon B)). Les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées sur un instrument de type TIMS-TOF-Pro (Trapped Ion Mobility Spectrometry – Time of Flight) (Bruker Daltonics) en mode « Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation » (PASEF) (Meier et al., 2018), dans la gamme de m/z 100-1700, avec exclusion des ions monochargés. L'appareil est calibré, chaque semaine, avec une précision de masse supérieure à 1ppm. Les données ainsi obtenues sont, dans un premier temps, analysés par le logiciel Preview (ProteinMetrics) afin d'estimer la qualité de la digestion enzymatique réalisée et de prédire les modifications post-traductionnelles présentes. La recherche en banques est ensuite réalisée par le logiciel PeaksX+ sur la base des fragmentations obtenues en MS/MS en utilisant le protéome actualisé de *Crassostrea gigas* (UniProt database : 29159 séquences). Les modifications paramétrées comme « non fixes » sélectionnées pour l'identification sont les suivantes : carbamylation (K), oxydation (M), acétylation (K), méthylation (Prot N-term) et déamination (NQ). La modification propionoamide (C) est paramétrée comme « fixe ». Le paramètre « trypsine » est sélectionné et l'erreur de masse est fixée à 20 ppm en MS et 0,05Da en MS/MS. La quantification relative est réalisée par la méthode « Label Free » (LFQ), en utilisant le XIC (Extracted Ion chromatogram ou chromatogramme ionique extrait) (Higgs et al., 2013) et les analyses statistiques sont réalisées dans PeaksX+ en sélectionnant un ratio de 1,5 et un calcul de significativité Peaks > 10.

c) Analyses fonctionnelles

Les analyses fonctionnelles des protéines ont été réalisées avec le logiciel Cytoscape. v3.8.0 (Shannon et al., 2003) et l'application Cluego v2.5.7 (Bindea et al., 2009). Les protéines ont été classées en trois catégories incluant les processus biologiques, le compartiment cellulaire et la fonction moléculaire à l'aide des annotations fonctionnelles extraites de la base de données Uniprot-GOA (« Gene Ontologie Annotation »). Les critères de sélection pour qu'un terme soit représenté sont qu'au moins 3 gènes soient associés à ce terme et que ces gènes représentent au minimum 4% du nombre de gènes totaux associés à ce terme. Les groupes fonctionnels ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'un test de Fisher avec une p-value <0,05 suivi d'un test de correction d'erreur de Benjamini Hochberg.

C. Quantification de la méthylation totale de l'ADN

1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir d'aire gonadique d'huîtres creuses mâles diploïdes et triploïdes à l'aide du kit Nucleospin® Tissue XS (Macherey Nagel) selon le protocole du fournisseur. La quantité et la qualité de l'ADN génomique (ADNg) sont déterminées par spectrophotométrie (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®).

2. Mesure du statut global de méthylation de l'ADN

La quantification de la méthylation totale de l'ADN a été réalisée à partir de 100ng d'ADNg de chaque individu grâce au kit Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Abcam, ab117128) selon les recommandations du fournisseur. La méthylation totale a été comparée entre les individus par l'intermédiaire d'un test de Kruskal-Wallis et d'un test de comparaison multiple de Dunn.

IV. Résultats

A. L'analyse protéomique globale dans l'aire gonadique d'huîtres diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse mâle

1. Analyses des échantillons

A l'issue de l'extraction des protéines et les analyses en spectrométrie de masse, les données spectrales ainsi obtenues ont été analysées par le logiciel PeaksX+ sur la banque de données UniProt de *Crassostrea gigas*. Ainsi, 2769 protéines ont été identifiées en stade 0 (Figure 30A), 4124 en stade 1 (Figure 30B) et 4540 en stade 2 (Figure 30C) dans les gonades mâles des huîtres diploïdes et triploïdes. Au cours des stades 1 et 2, la répartition des protéines identifiées est semblable entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta conduisant à deux diagrammes de Venn présentant de forte similitude de répartition. On trouve 1812 protéines communes aux huîtres diploïdes et triploïdes en stade 0, 2157 en stade 1 et 2332 en stade 2. Ce sont donc 65% des protéines identifiées en stade 0 qui sont communes aux huîtres diploïdes et triploïdes et environ 50% pour les stades 1 et 2.

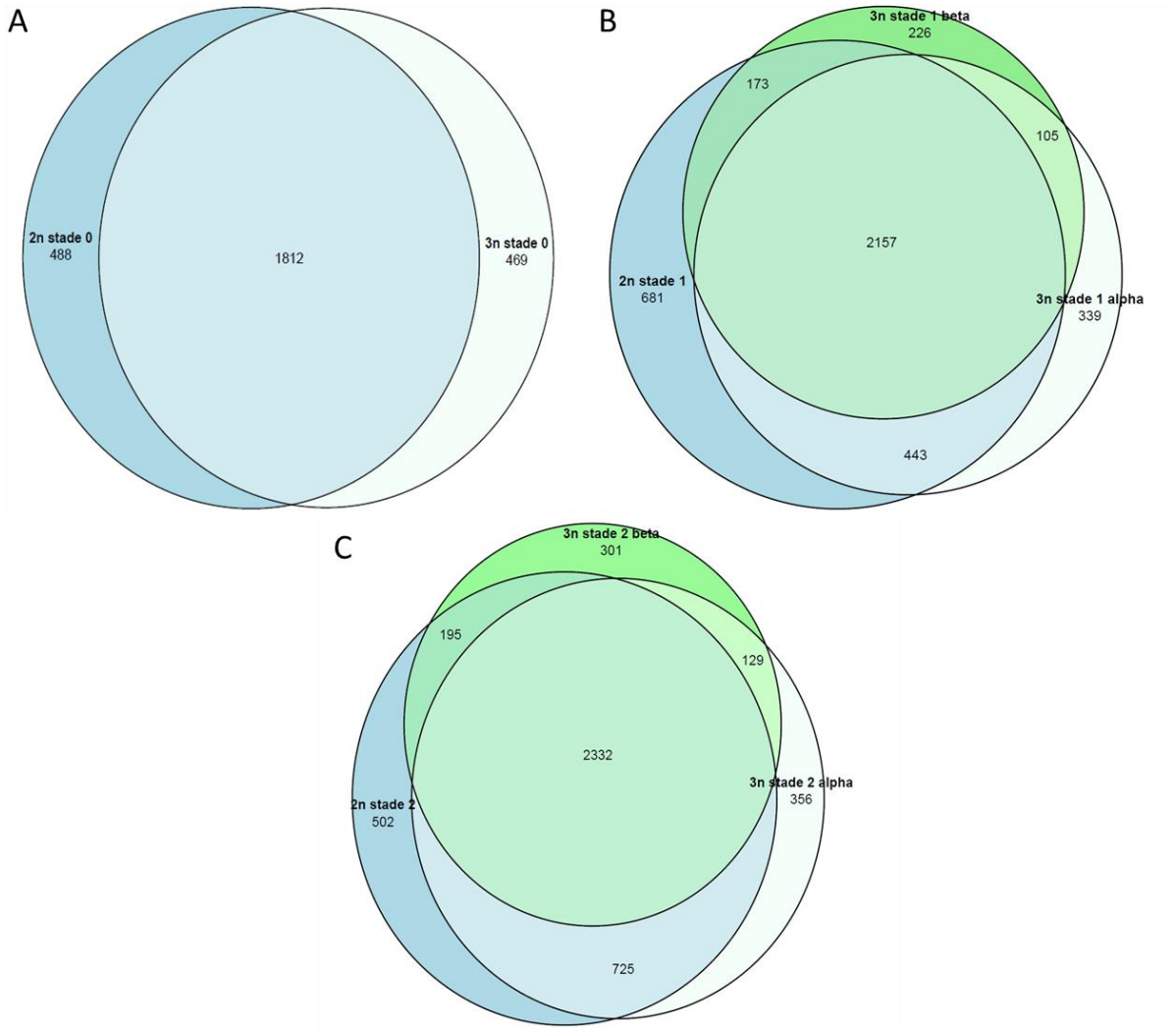


Figure 30 : Diagrammes de Venn représentant le recouvrement des protéines identifiées en spectrométrie de masse dans les gonades mâles d'huîtres diploïdes et triploïdes (alpha et beta) au cours de la gamétogenèse (A : stade 0 : repos sexuel ; B : stade 1 : prolifération des cellules germinales et C : stade 2 : maturation des cellules germinales).

Une analyse fonctionnelle des protéines identifiées spécifiquement chez les huîtres diploïdes, triploïdes alpha et beta a été menée grâce au logiciel Cytoscape et à l'application Cluego au cours du cycle gamétogénétique (stades 0, 1 et 2) (Annexe 1). Au vu des résultats obtenus dans le chapitre précédent, les régulations de la gamétogenèse chez les huîtres triploïdes alpha et beta semblent principalement être associées au stade de prolifération des cellules germinales (stade 1) et au stade de différenciation des cellules germinales (stade 2). Par

conséquent, nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'analyse des protéines identifiées uniquement chez les huîtres triploïdes alpha et beta au cours des stades 1 et 2 de la gamétogenèse mâle. Au stade 1, les protéines présentes uniquement chez les triploïdes beta sont uniquement associées au terme « microtubule binding » indiquant que ces protéines interagissent de manière sélective et non covalente avec les microtubules. Au même stade, les protéines présentes chez les huîtres triploïdes alpha appartiennent principalement (75%) au terme « nucleoside triphosphate biosynthetic process » indiquant que ces protéines jouent un rôle dans la synthèse de l'énergie cellulaire mais aussi dans la synthèse des acides nucléiques et au terme « lipid transport » (25%) impliquant un rôle dans le transport intra et extra cellulaire des lipides. Au stade 2, pour les huîtres beta, on retrouve de nouveau des protéines appartenant au terme « microtubule binding » (37,5%). Pour les huîtres triploïdes alpha, trois termes sont principalement représentés « GTPase regulator activity » (37,5%), « organophosphate biosynthetic process » (25%) et « cell cycle » (18,75%). Ceci implique, que les protéines présentes uniquement chez les huîtres triploïdes alpha ont un rôle dans l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Ces processus sont généralement couplés à un autre processus biologique comme la transduction du signal. On retrouve comme au stade 1, des protéines impliquées dans la synthèse des acides nucléiques. Enfin, des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, dans les modifications de la conformation de l'ADN et l'organisation des chromosomes sont présentes. L'analyse des termes associés aux différentes protéines spécifiquement retrouvées chez les huîtres triploïdes alpha et beta au cours des stades 1 et 2 de la gamétogenèse nous a permis dans un premier temps d'avoir une vue globale des régulations potentiellement impliquées dans les deux stratégies de reproduction des huîtres triploïdes alpha et beta. Toutefois, une quantification de l'expression relative des protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta est indispensable pour confirmer l'implication des voies de régulation précédemment identifiées.

Cette quantification relative a donc ensuite été réalisée par la méthode LFQ (« Label Free Quantification ») consistant à analyser en spectrométrie de masse les peptides issus de la digestion trypsique des protéines. L'information quantitative est ensuite obtenue à partir des courant d'ions (XIC). Cette méthode se base sur l'hypothèse que plus un peptide est abondant, plus il sera sélectionné pour la fragmentation et donc plus il générera de spectres MS/MS. Le logiciel PeaksX+ permet ensuite un traitement automatisé des données, de l'identification jusqu'à la normalisation. Cette quantification relative va permettre d'évaluer l'expression des

protéines en fonction des huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta. Puis, l'analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes permettra d'affiner la compréhension des régulations associées à la triploïdie.

2. Quantification des protéines identifiées

Au stade 0, peu de protéines sont différentiellement exprimées entre les huîtres diploïdes et triploïdes. On trouve seulement 10 protéines qui sont sous exprimées chez les huîtres triploïdes par rapport aux huîtres diploïdes (Annexe 2). L'analyse fonctionnelle de ces protéines n'a pas pu être réalisée au vu du faible nombre de protéines différentiellement exprimées. Au stade 2, 23 protéines sont retrouvées différentiellement exprimées entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta, 40 différentiellement exprimées entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha, 37 entre les diploïdes et triploïdes beta et 38 entre les triploïdes alpha et beta (Annexe 2). La construction d'une « Heat map » n'a pas permis l'identification de groupe (cluster) spécifique aux individus diploïdes et triploïdes alpha ou beta. De plus, l'analyse fonctionnelle n'a pas pu être réalisée au vu du faible nombre de protéines différentiellement exprimées. En revanche, au stade 1, 337 protéines sont différentiellement exprimées entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta (Figure 31), 355 différentiellement exprimées entre diploïdes et triploïdes alpha, 258 entre diploïdes et triploïdes beta et 153 entre triploïdes alpha et beta (Annexe 2). Parmi les 337 protéines retrouvées différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta, deux clusters principaux sont spécifiquement identifiés (Figure 31). Globalement, le premier est caractérisé par une légère surexpression des protéines des individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes et le second est beaucoup plus marqué en terme de différentiel d'expression avec une forte sous expression des protéines des individus triploïdes par rapport aux diploïdes. L'analyse fonctionnelle des protéines du cluster 2 a donc été réalisée.

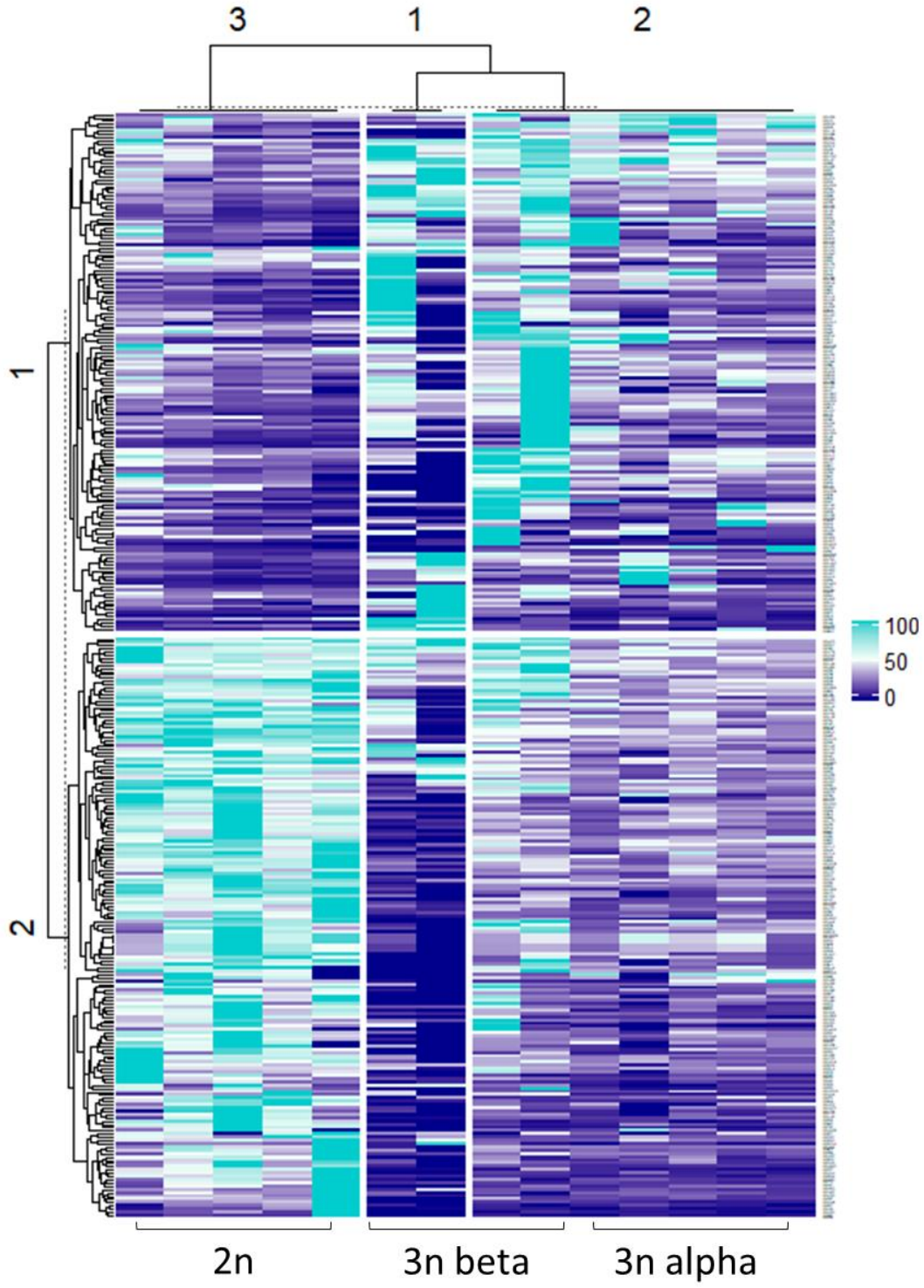
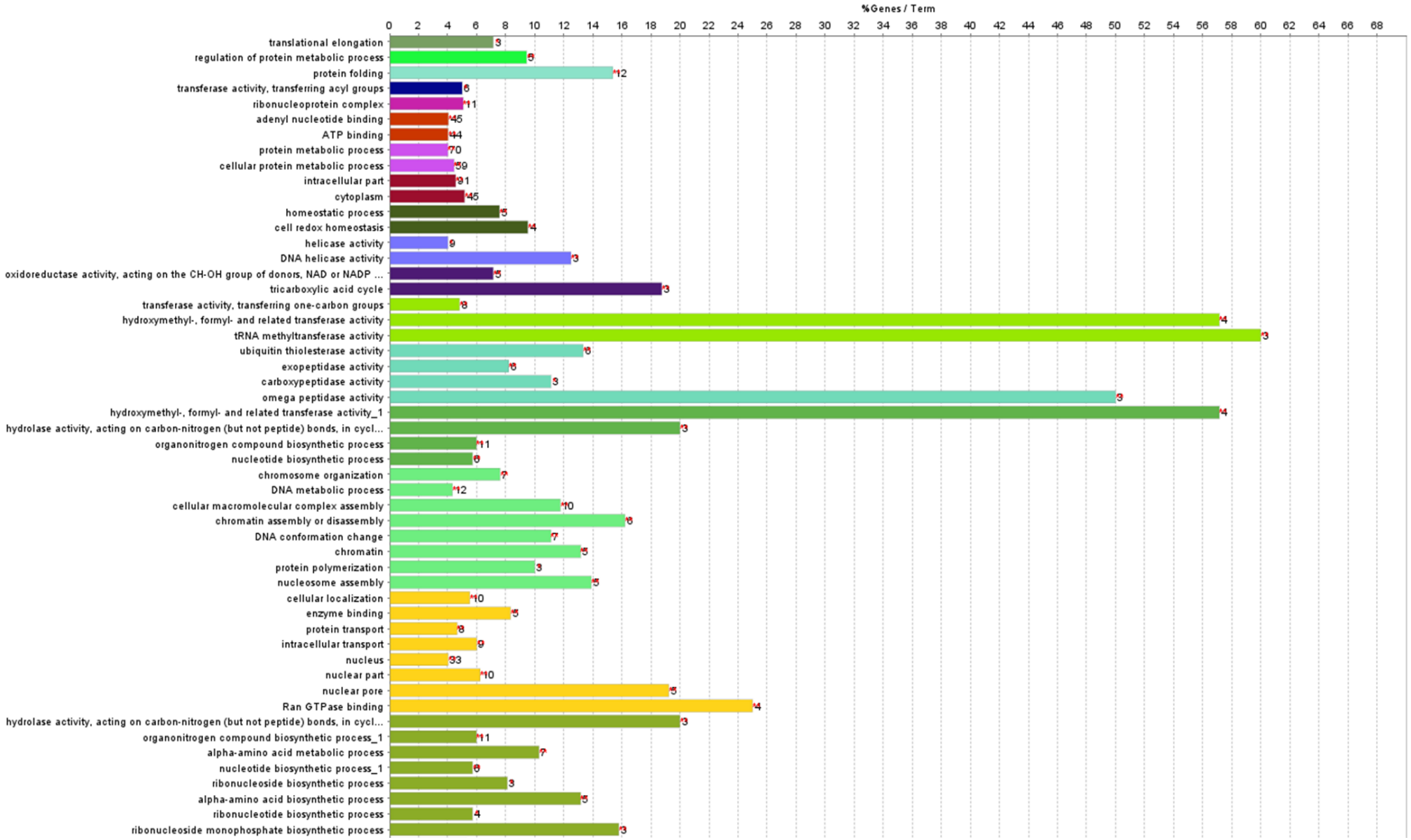
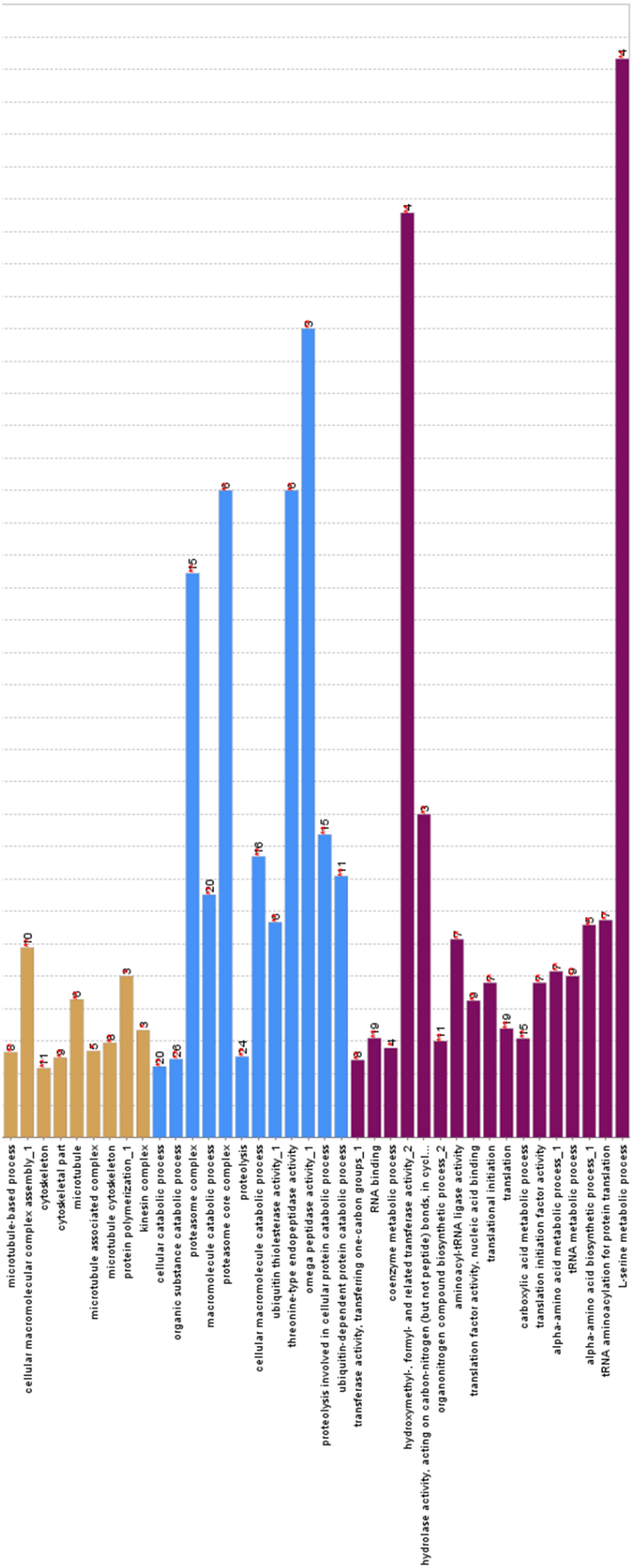


Figure 31 : « Heat map » des niveaux d'expression des protéines différentiellement exprimées dans les gonades mâles d'huîtres diploïdes (n=5) et triploïdes alpha (n=5) et beta (n=4) au stade 1 de prolifération des cellules germinales. Les variations d'abondance des protéines sont représentées par une échelle de couleur, dans laquelle les nuances turquoise représentent une expression élevée et les nuances bleu foncé représentent une expression plus faible. Deux clusters principaux ont été identifiés, indiqués sur l'axe des ordonnées par les chiffres 1 et 2. L'analyse du clustering des échantillons (1, 2 et 3) a été réalisée dans R en utilisant le test de corrélation de Pearson.

L'analyse fonctionnelle des protéines sous exprimées chez les triploïdes alpha par rapport aux huîtres diploïdes est associée aux principaux termes suivants, « translation » (19%) ; « proteasome complex » (13%), « microtubule » (10%), « nucleus » (9%) et « cellular macromolecular complex assembly » (9%) (Figure 32). Ces résultats suggèrent que chez les huîtres triploïdes alpha, un grand nombre de processus biologiques sont sous régulés. Les principales protéines associées au terme « cellular macromolecular complex assembly » sont : ASF1 (Anti-Silencing Function 1), CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1), Nucleosome assembly protein 1, les histones H2A, H2B, H3, H4 ainsi que de nombreuses méthyltransférases : PRDM9 (PR/SET Domain 9), TRMT61A (tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit), Protein arginine N-methyltransferase, Serine hydroxymethyltransferase, NSUN2 (tRNA (Cytosine-5-)-methyltransferase) et tRNA (guanine(46)-N(7))-methyltransferase. On trouve également des protéines impliquées dans la régulation des cellules germinales telles que DDX 4 (VASA), 5 et 47 (DEAD-Box Helicase, Putative ATP-dependent RNA helicase), PIWI like Proteins 1 et 2, Tudor domain-containing protein 1 et Protein BOULE like.


%Genes / Term
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68
translational elongation 8
regulation of protein metabolic process 9
protein folding 12
transferase activity, transferring acyl groups 6
ribonucleoprotein complex 11
adenyl nucleotide binding 45
ATP binding 44
protein metabolic process 70
cellular protein metabolic process 59
intracellular part 91
cytoplasm 45
homeostatic process 5
cell redox homeostasis 4
helicase activity 9
DNA helicase activity 3
oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP ... 5
tricarboxylic acid cycle 3
transferase activity, transferring one-carbon groups 8
hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity 4
tRNA methyltransferase activity 3
ubiquitin thiolesterase activity 6
exopeptidase activity 6
carboxypeptidase activity 8
omega peptidase activity 3
hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity_1 4
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in cycl... 3
organonitrogen compound biosynthetic process 11
nucleotide biosynthetic process 6
chromosome organization 7
DNA metabolic process 12
cellular macromolecular complex assembly 10
chromatin assembly or disassembly 6
DNA conformation change 7
chromatin 5
protein polymerization 8
nucleosome assembly 5
cellular localization 10
enzyme binding 5
protein transport 8
intracellular transport 9
nucleus 33
nuclear part 10
nuclear pore 5
Ran GTPase binding 4
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in cycl... 3
organonitrogen compound biosynthetic process_1 11
alpha-amino acid metabolic process 7
nucleotide biosynthetic process_1 6
ribonucleoside biosynthetic process 8
alpha-amino acid biosynthetic process 5
ribonucleotide biosynthetic process 4
ribonucleoside monophosphate biosynthetic process 3


microtubule-based process
cellular macromolecular complex assembly_1
cytoskeleton
cytoskeletal part
microtubule
microtubule associated complex
microtubule cytoskeleton
protein polymerization_1
kinesin complex
cellular catabolic process
organic substance catabolic process
proteasome complex
macromolecule catabolic process
proteasome core complex
proteolysis
cellular macromolecule catabolic process
ubiquitin thiolesterase activity_1
threonine-type endopeptidase activity
omega peptidase activity_1
proteolysis involved in cellular protein catabolic process
ubiquitin-dependent protein catabolic process
transferase activity, transferring one-carbon groups_1
RNA binding
coenzyme metabolic process
hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity_2
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in cycl...
organonitrogen compound biosynthetic process_2
aminoacyl-tRNA ligase activity
translation factor activity, nucleic acid binding
translational initiation
translation
carboxylic acid metabolic process
translation initiation factor activity
alpha-amino acid metabolic process_1
tRNA metabolic process
alpha-amino acid biosynthetic process_1
tRNA aminoacylation for protein translation
L-serine metabolic process

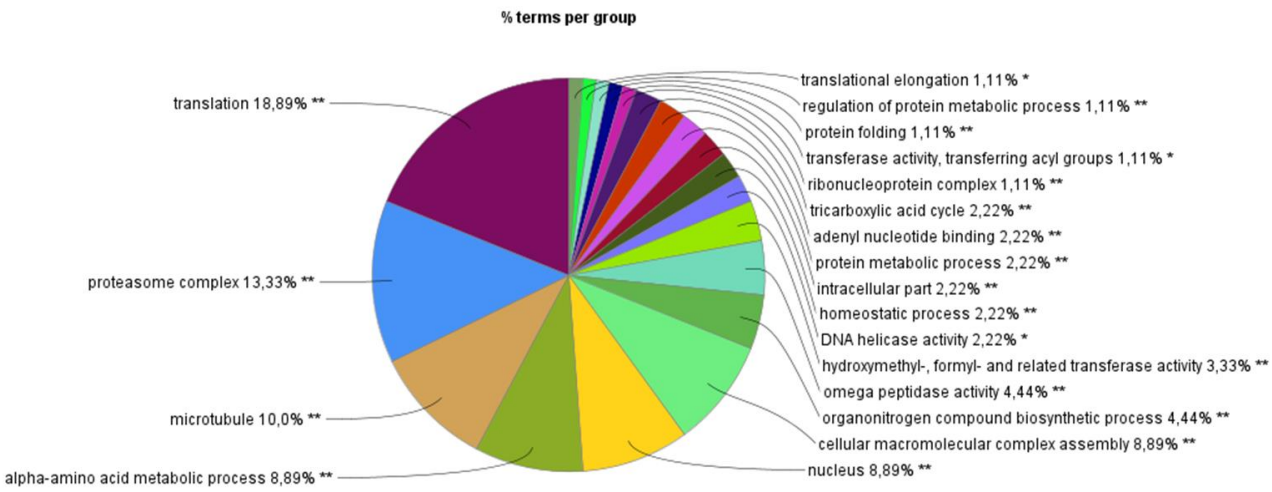


Figure 32 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes alpha par rapport aux huîtres diploïdes après l'analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales). Les critères de sélection pour qu'un terme soit représenté sont qu'au moins 3 gènes soient associés à ce terme et que ces gènes représentent au minimum 4% du nombre de gènes totaux associés à ce terme. Les groupes fonctionnels ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'un test de Fisher avec une p-value <0,05 suivi d'un test de correction d'erreur de Benjamini Hochberg. Les résultats significatifs sont représentés par des astérisques (* p<0,05 ; ** p<0,005 et *** p<0,0005).

Dans un second temps, une comparaison des protéines sous exprimées chez les huîtres triploïdes beta a été réalisée par rapport aux huître diploïdes. Cette analyse fonctionnelle montre que les protéines sous exprimées appartiennent aux voies d'assemblage des nucléosomes [terme « nucleosome » (80%)] et de la conformation de la chromatine [terme « ubiquitin dependent protein catabolic process » (20%)] (Figure 33). Les principales protéines identifiées dans le terme « nucleosome » sont les suivantes : CAF1 (Chromatin Assembly factor 1), les histones H2A, H2B et H4 et PRDM9 (PR/SET Domain 9). On trouve également des protéines impliquées dans la régulation des cellules germinales telles que PIWI like protein 1, Protein BOULE like et DDX4. Cependant les protéines Tudor domain-containing protein 1, PIWI like 2, DDX5 et 47 ne sont pas retrouvées chez les individus triploïdes beta.

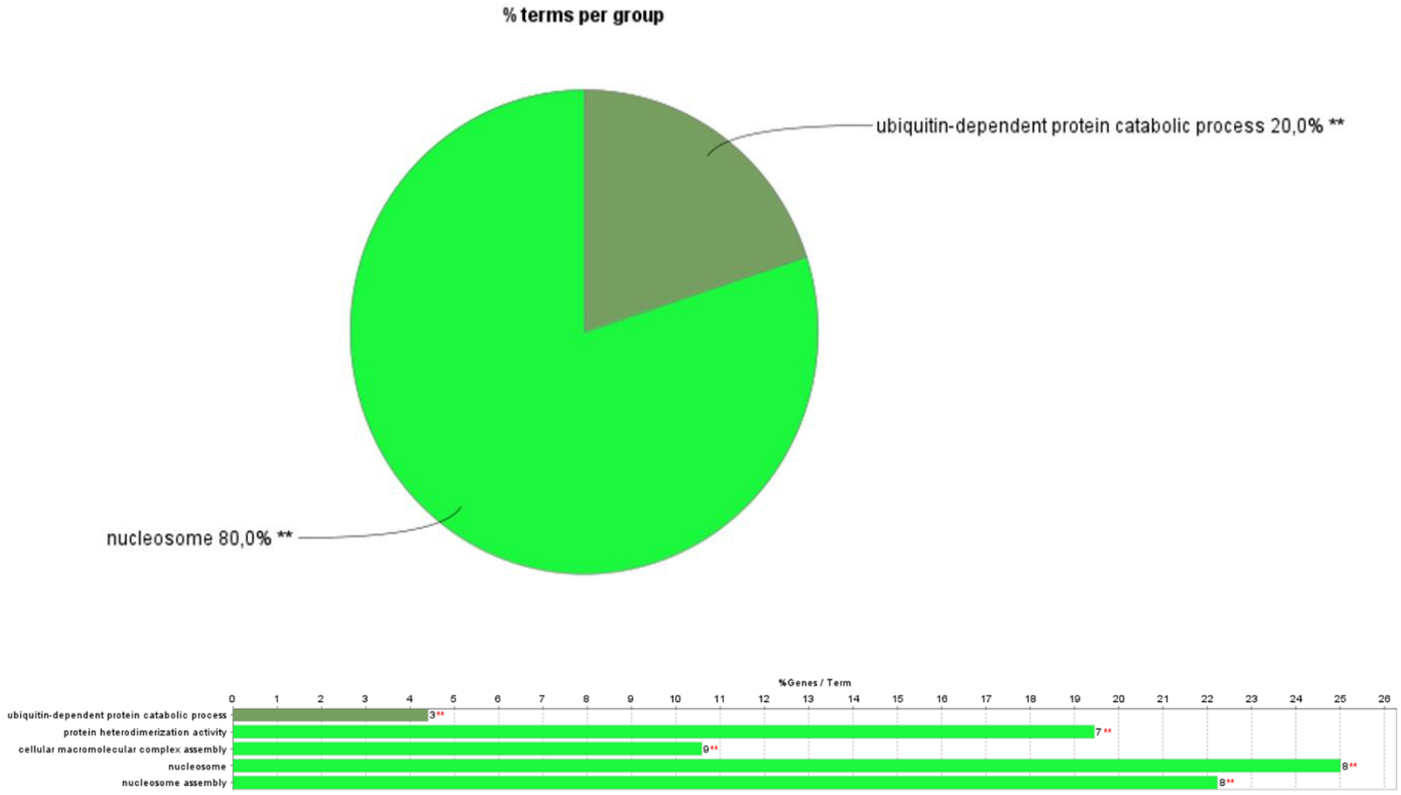


Figure 33 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes beta par rapport aux huîtres diploïdes après analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales). Les critères de sélection pour qu'un terme soit représenté sont qu'au moins 3 gènes soient associés à ce terme et que ces gènes représentent au minimum 4% du nombre de gènes totaux associés à ce terme. Les groupes fonctionnels ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'un test de Fisher avec une p-value <0,05 suivi d'un test de correction d'erreur de Benjamini Hochberg. Les résultats significatifs sont représentés par des astérisques (** p<0.005).

Enfin, une comparaison des protéines sous exprimées chez les huîtres triploïdes alpha a été réalisée par rapport aux huître triploïdes beta. Cette analyse fonctionnelle montre que les protéines sous exprimées appartiennent aux voies associées aux processus métaboliques (58%) et à la régulation de la traduction (42%) (Figure 34). On trouve parmi les protéines associées à la régulation de la traduction de nombreuses protéines ribosomales des sous unités 40S et 60S ainsi que les protéines Eukaryotic translation initiation factor 3 (E, J) and 5 subunit. Ces résultats suggèrent que les huîtres triploïdes beta essayent probablement de compenser la traduction au vu des mécanismes de blocage mis en place par rapport aux individus triploïdes alpha.

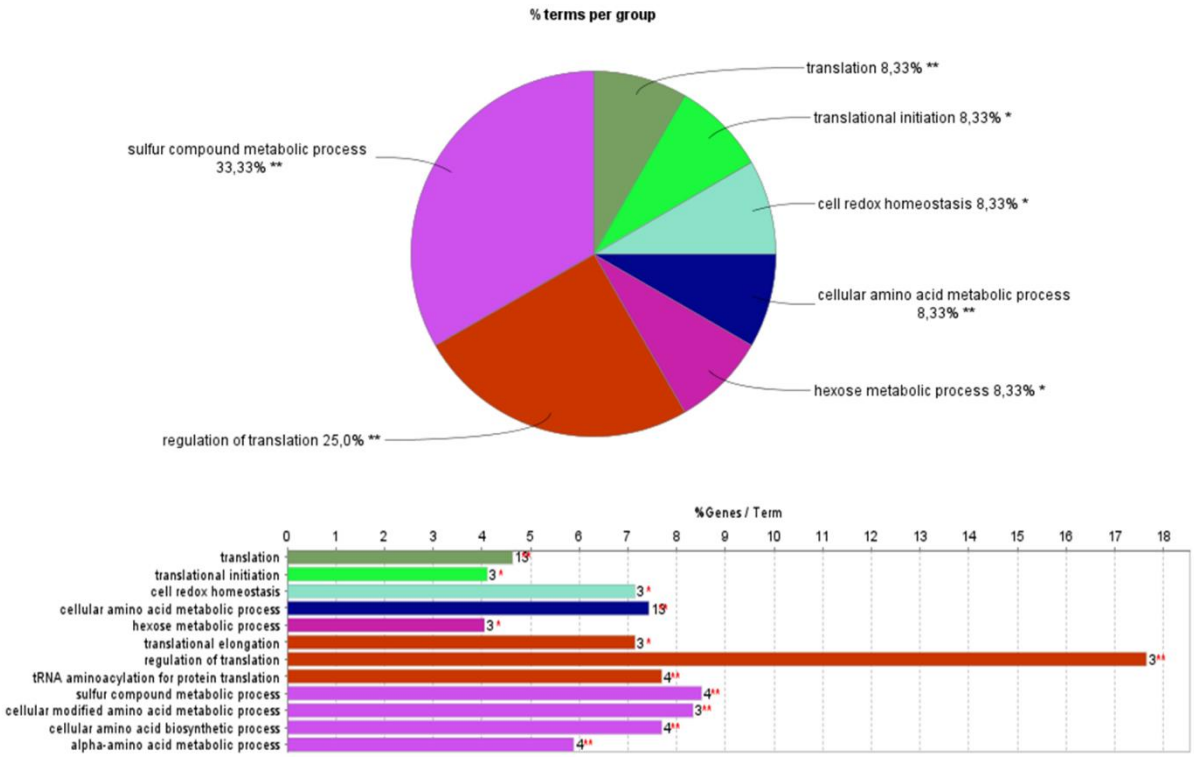


Figure 34 : Classification fonctionnelle des protéines sous exprimées dans les gonades mâles d'huîtres triploïdes alpha par rapport aux huîtres triploïdes beta après analyse de l'ontologie des gènes au stade 1 (prolifération des cellules germinales). Les critères de sélection pour qu'un terme soit représenté sont qu'au moins 3 gènes soient associés à ce terme et que ces gènes représentent au minimum 4% du nombre de gènes totaux associés à ce terme. Les groupes fonctionnels ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'un test de Fisher avec une p-value <0,05 suivi d'un test de correction d'erreur de Benjamini Hochberg. Les résultats significatifs sont représentés par des astérisques (** p<0.005).

B. Quantification de la méthylation totale dans l'aire gonadique mâle d'huîtres diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse

Les précédentes analyses protéomiques, mais aussi d'autres études au niveau transcriptomique suggèrent que des modifications chromatiniennes se mettent en place entre les états diploïdes et triploïdes chez l'huître. Une des voies de régulation est la modulation de la méthylation de l'ADN est l'addition covalente d'un groupement méthyl sur le carbone 5 du résidu cytosine par les ADN méthyltransférases conduisant à la formation d'une 5-méthylcytosine (5-mC). Chez *Crassostrea gigas*, il a été montré que la méthylation de l'ADN est associée à l'expression génique (Roberts et Gavery, 2012; Riviere et al., 2013). Dans ce contexte, la quantification du taux global de méthylation en 5-mC a été réalisée dans les gonades d'huîtres diploïdes et triploïdes afin d'identifier le profil de méthylation des individus en

fonction de leur ploïdie et de leur stade gamétogénétique. La méthylation de l'ADN de la gonade a été observée au cours du cycle gamétogénétique montre que le niveau de méthylation est globalement inférieur à 1%. Aucune variation statistique de la méthylation totale de l'ADN n'est constatée au sein des stades 0 (repos sexuel), 1 (prolifération des cellules germinales) et 2 (maturation des cellules germinales) entre les individus diploïdes et triploïdes, hormis entre les individus triploïdes alpha entre les stades 1 et 2. Globalement, au stade 1 et au stade 2, les profils de méthylation des individus diploïdes sont proches de ceux des individus triploïdes beta. Chez les individus triploïdes alpha, au stade 1, le taux de méthylation de l'ADN semble inférieur aux individus diploïdes et triploïdes beta. De plus, chez les individus alpha, une augmentation significative de la méthylation de l'ADN entre le stade 1 et le stade 2 est observée, le taux de méthylation global de l'ADN passe de 0,06% en stade 1 à 0,92% en stade 2 (Figure 35). Toutefois, cette variation significative du taux global de méthylation de l'ADN chez les individus alpha ne permet de déterminer les régions génomiques concernées par ces méthylations.

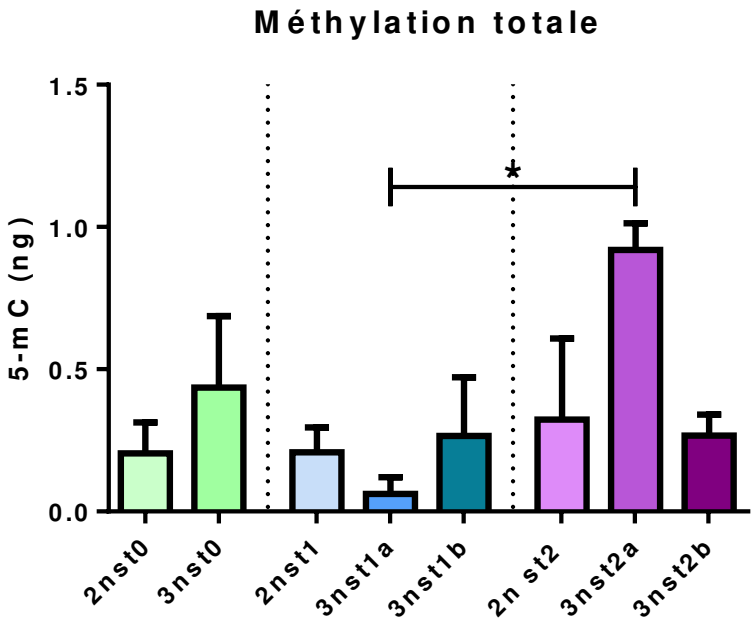


Figure 35 : Quantification de la méthylation de l'ADN dans l'aire gonadique d'huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3na: alpha et 3nb: beta) mâles au cours de la gamétogenèse (stade 0 : repos sexuel (st0), stade 1 : prolifération des cellules germinales (st1) et stade 2 : maturation des cellules germinales (st2)) (n=4 par condition). Une analyse statistique (Test de Kruskal-Wallis et Test de comparaison multiple de Dunn) a permis la comparaison du niveau de méthylation entre les individus diploïdes et triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (*: $p<0,05$).

V. Discussion

Afin de comprendre les mécanismes de régulation de la reproduction chez les huîtres triploïdes mâles alpha et beta par rapport aux huîtres diploïdes, deux approches ont été menées, sur les modifications épigénétiques des protéines dans un premier temps et de l'ADN dans un second temps. L'étude du protéome des gonades mâles d'huîtres diploïdes et triploïdes a permis d'identifier des protéines associées majoritairement au terme « microtubule » en stades 1 et 2 chez les huîtres beta. Parmi ces protéines on trouve plusieurs kinésines (KIF27, KIF16B1), Cep57 (Centrosomal protein 57) et PRC1 (Protein regulator of cytokinesis 1). La protéine CEP 57 est une protéine centrosomale qui intervient dans la stabilisation des liaisons des microtubules à la fois au niveau du centrosome et des kinétochores (De Luca, 2007). PRC1 est une protéine de liaison aux microtubules impliquée dans l'achèvement de la cytokinèse lors de la télophase (Jiang et al., 1998). De plus, l'organisation centrale du fuseau de division nécessite des kinésines ainsi que la protéine PRC1 de regroupement des microtubules (Fu et al., 2007). Ceci implique que chez les individus beta des protéines impliquées dans la formation du fuseau de division sont identifiées, pouvant être associées à l'arrêt des proliférations et de la méiose. La quantification relative des protéines pourra nous éclairer davantage sur la régulation de ces protéines par rapport aux individus diploïdes et alpha. Chez les individus alpha, aux stades 1 et 2, les fonctions des protéines identifiées sont principalement associées à la synthèse de l'énergie cellulaire et des acides nucléiques ainsi qu'au cycle cellulaire et aux modifications de la structure de la chromatine. Les principales protéines identifiées sont : CSPP1 (Centrosome and spindle pole-associated protein 1), SMC (Structural maintenance of chromosomes protein) et HP1BP3 (Heterochromatin protein 1-binding protein 3 DNA topoisomerase I). HP1BP3 est une protéine intervenant dans le cycle cellulaire, elle permet le maintien de l'intégrité de l'hétérochromatine pendant la progression G1-S et régule la durée de la phase G1 pour influencer de manière critique la prolifération cellulaire (Dutta et al., 2014). CSPP1 est une protéine qui stabilise la liaison kinétochore/microtubule pendant la division cellulaire. Elle est essentielle pour les mouvements chromosomiques en mitose. Il a été montré que sa suppression perturbe la progression mitotique et compromet la satisfaction du point de contrôle du fuseau (Zhu et al., 2015). Les protéines SMC participent à des complexes qui régissent la structure et la dynamique des chromosomes. Ces complexes créent des topologies chromosomiques essentielles pour la mitose, la méiose, l'expression génique et les recombinaisons homologues (Chao et al., 2017). Pris ensemble, ces résultats montrent que les protéines identifiées chez les

individus triploïdes alpha aux stades 1 et 2 sont des protéines impliquées dans la progression des phases du cycle cellulaire aussi bien lors des phases G1-S que G2-M, afin de promouvoir la division des cellules. Une quantification de ces protéines reste indispensable pour une bonne compréhension des régulations associées à la gamétogenèse des individus triploïdes alpha et beta.

Afin de caractériser les régulations mises en place entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta une quantification relative du niveau d'expression des protéines a été réalisée. Peu de protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes ont été retrouvées au stade 0. Ces résultats, ne sont pas surprenant puisqu'au stade 0 de repos sexuel, les cellules germinales sont dans un état de quiescence, en attente de conditions favorables pour commencer un nouveau cycle de gamétogenèse (Berthelin et al., 2001; Franco et al., 2008). C'est au stade 1, de prolifération des cellules germinales que le plus grand nombre de protéines différentiellement exprimées a été retrouvé entres les individus diploïdes et triploïdes alpha et beta. Le stade 1, correspond à la reprise de la gamétogenèse, par conséquent de nombreuses régulations sont misent en place (Franco et al., 2008). Notre étude a permis d'identifier au stade 1, 337 protéines différentiellement exprimées entre les huîtres diploïdes et triploïdes, 355 différentiellement exprimées entre diploïdes et triploïdes alpha, 258 entre diploïdes et triploïdes beta et 153 entre triploïdes alpha et beta. L'analyse de ces données a mis en évidence deux clusters principaux, le premier correspond à une surexpression des protéines chez les individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes et un second beaucoup plus marqué en termes de différentiel d'expression avec une forte sous expression de l'ensemble des protéines chez les individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes. Une analyse fonctionnelle des protéines du second cluster a été réalisée pour identifier les fonctions des protéines significativement sous exprimées chez les huîtres triploïdes alpha et beta par rapport aux huîtres diploïdes.

Chez les huîtres triploïdes alpha, on trouve une sous expression des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la transcription (transcription initiator factor IIA, trancription elongation factor B polypectide 2, leucine zipper like transcriptional regulator 1), la dégradation protéique (Proteasome subunit alpha, beta, 26S proteasome non ATPase regulatory subunit 1, 2,5,7,8,11,12 et 14), la synthèse des microtubules (tubulin alpha, beta chain), le transport intra- et extracellulaire (transport protein Sec31A, Putative sodium/potassium-transporting ATPase) et de l'organisation de la chromatine, dont ses modifications et sa structuration. Au cours de la formation des nucléosomes, l'ensemble des protéines constituant les nucléosomes (H2A, H2B, H3 et H4) ainsi que l'histone chaperonne

ASF1-B (Anti silencing factor 1-B) et la protéine de liaison aux histones CAF1 (Chromatin Assembly factor 1) sont sous exprimées chez les individus triploïdes alpha par rapport aux diploïdes. ASF1 ainsi que son partenaire de liaison CAF1 ont été identifiées pour la première fois chez l'embryon de drosophile (Tyler et al., 1999). Ces deux protéines chaperonnes interagissent physiquement et fonctionnent en synergie pour la promotion de la phase S chez de nombreuses espèces telles que la levure, la drosophile et le poulet (Tyler et al., 1999; Sharp et al., 2002; Mello et al., 2002; Sanematsu et al., 2006). CAF1 se localise sur la fourche de réplication et interagit directement avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) chez la drosophile (Tyler et al., 2001). Quant à ASF1, elle se lie au facteur de réplication C (complexe ATPase de PCNA) et maintient la stabilité de la fourche de réplication chez la levure (Franco et al., 2005) et chez la drosophile (Schulz et Tyler, 2006). Ces données montrent que ASF1 et CAF1 sont des protéines essentielles pour déposer des histones nouvellement synthétisées pendant la réplication de l'ADN par des contacts directs avec la machinerie de réplication Une étude chez *Crassostrea gigas*, a montré qu'au cours du stade 1 de prolifération des cellules germinales, une forte expression de PCNA été observé chez les individus alpha traduisant une prolifération importante des cellules germinales (Jouaux et al., 2010). En plus d'interagir avec CAF1, ASF1 interagit également avec le complexe HIR (Histone Regulation Complex) (Tyler et al., 1999). CAF 1 et le complexe HIR sont localisés au niveau du centromère de la chromatine et contribuent au bon fonctionnement des kinétochores (Sharp et al., 2002). Il a donc été proposé que ASF1 fonctionne avec le complexe HIR et CAF1 pour maintenir la stabilité génomique pendant la division cellulaire (Sanematsu et al., 2006). En effet, il a été montré que des cellules de poulet présentant un KO (knock out) conditionnel pour ASF1 présentent plusieurs pôles de fuseau et des alignements chromosomiques aberrants lors de la mitose. Cela n'empêche pas ces cellules de pouvoir passer la mitose, en revanche un fort taux d'apoptose a été observé à l'issue des mitoses. Bien que l'intégrité du kinétochore n'ait été affecté par le KO de ASF1 dans les cellules de poulet, un rôle de celui-ci dans la ségrégation des chromosomes n'est pas à exclure (Sanematsu et al., 2006). ASF-1 pourrait potentiellement participer à la régulation de l'hétérochromatine centromérique, qui joue un rôle décisif dans la formation du kinétochore et de la ségrégation chromosomique pendant la mitose. Ainsi chez les individus triploïdes alpha, la sous expression des différentes histones ainsi que l'histone chaperonne ASF1-B et la protéine de liaison aux histones CAF1 pourraient être responsables des faibles perturbations de la gamétogenèse observée chez cette catégorie d'huître triploïde. De plus, ces perturbations n'empêcheraient pas les cellules germinales de proliférer et de passer la mitose avec succès mais engendreraient toutefois de l'apoptose. Une étude montre chez les huîtres triploïdes alpha,

que la prolifération des cellules germinales en stade 1 s'accompagne d'une forte apoptose par rapport aux huîtres diploïdes de même stade de gamétogenèse. En revanche, chez les individus beta, les auteurs suggèrent que l'absence d'apoptose s'explique par le très faible taux de prolifération cellulaire, les mécanismes de contrôle ne sont par conséquent pas activés (Jouaux et al., 2010).

En ce qui les protéines sous exprimées ayant des fonctions associées aux modifications de la structure de la chromatine, on trouve principalement chez les individus alpha des protéines associées aux transferts de groupement méthyl (méthyltransférases). Au vu de ces résultats, une quantification de la méthylation totale de l'ADN a été réalisée au cours du cycle de gamétogenèse mâle. Après avoir mis en évidence que de nombreuses méthyltransférases sont sous exprimées chez les individus triploïdes alpha par rapport aux diploïdes, nous nous sommes intéressés à l'étude de la méthylation de l'ADN génomique dans les gonades mâles des huîtres diploïdes et triploïdes. Notre étude montre qu'une méthylation des cytosines de l'ADN est observée dans les gonades chez les huîtres diploïdes et triploïdes mâles avec un niveau de méthylation compris entre 0,1 et 1% au cours du cycle de gamétogenèse. Une précédente étude s'est intéressée à la quantification du niveau de méthylation des cytosines dans la branchie de l'huître, *Crassostrea gigas* diploïde. Un niveau de méthylation des cytosines proche de celui trouvé dans la gonade a été détecté dans la branchie (1,8%) (Gavery et Roberts, 2014). En effet, le niveau de méthylation est susceptible de varier en fonction des étapes du cycle de vie de l'animal et du tissu considéré (Riviere et al., 2013). Toutefois, chez les mollusques, le niveau de méthylation des cytosines est supérieur à celui retrouvé chez d'autres espèces d'invertébrés (2 à 0,15% chez les insectes) (Gavery et Roberts, 2013). Ceci suggère que les mollusques présentent des caractéristiques spécifiques de la méthylation de l'ADN pouvant être associées à des rôles fonctionnels.

Nos travaux montrent que le niveau de méthylation de l'ADN est stable au cours du cycle de gamétogenèse chez les individus mâles diploïdes et triploïdes beta. En revanche, chez les individus triploïdes alpha, on observe une augmentation significative de la méthylation de l'ADN entre les stades 1 de prolifération des cellules germinales et 2 de maturation des cellules germinales. Des résultats similaires ont été trouvés entre le stade 0 de repos sexuel et le stade 3 de maturité sexuel chez les huîtres diploïdes, lors de l'analyse de la méthylation des cytosines par MeDIP-seq (Methylated DNA ImmunoPrecipitation Sequencing) au cours de la gamétogenèse (Rivière, 2014). Ces résultats montrent que chez les individus triploïdes alpha mâle dès le stade 2, une augmentation significative du niveau de méthylation totale est observée.

Par conséquent, chez les individus triploïdes alpha, une régulation du niveau de méthylation de l'ADN dans les cellules germinales pourrait contribuer à augmenter le niveau de transcription de certains gènes impliqués dans la régulation de la gamétogenèse leur permettant ainsi d'avoir une gamétogenèse proche des individus diploïdes. De plus, il a été montré chez l'huître creuse diploïde, qu'une méthylation limitée de l'ADN peut contribuer à une plasticité phénotypique accrue dans des environnements très fluctuants qui faciliterait une variété d'opportunités de transcription y compris l'accès à des sites d'activation de la transcription (Roberts et Gavery, 2012). Pour corroborer ces résultats de surméthylation de la chromatine chez les huîtres 3n alpha, l'étude protéomique par spectrométrie de masse a montré que chez ces individus, plusieurs méthyltransférases telles que PRDM9 (PR/SET Domain 9), TRMT61A (tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit), Protein arginine N-methyltransferase, Serine hydroxymethyltransferase, NSUN2 (tRNA (Cytosine-5-)-methyltransferase) et tRNA (guanine(46)-N(7))-methyltransferase étaient sous exprimées par rapport aux individus diploïdes. Ces résultats suggèrent qu'une diminution des modifications post traductionnelles induite par la sous expression des méthyltransférases maintient un niveau de méthylation supérieur chez les huîtres triploïdes alpha.

Chez les huîtres triploïdes beta, aucune variation du niveau de méthylation globale n'a été détecté par rapport aux individus diploïdes et triploïdes alpha au cours du cycle de gamétogenèse. Afin de comprendre plus précisément les mécanismes épigénétiques mis en place et aboutissant à une condensation des noyaux des cellules germinales chez les huîtres triploïdes beta dès le stade de prolifération des cellules germinales, il est nécessaire d'aller plus loin. Dans un premier temps il est nécessaire de s'intéresser à l'ensembles des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones et aux fonctions des ARN non codants). Dans un second temps il est indispensable de caractériser les cibles de ces modifications épigénétiques et la région des gènes impactés par ces modifications.

Chez les huîtres triploïdes beta, contrairement aux huîtres alpha, peu de fonctions biologiques sont associées à une sous expression significative des protéines par rapport aux huîtres diploïdes. La principale fonction qui apparait sous exprimée concerne la formation des nucléosomes. En effet, les protéines constituant les nucléosomes (H2A, H2B et H4) ainsi que la protéine de liaison aux histones CAF1 sont sous exprimées. En revanche, on ne retrouve pas l'histone H3 et la protéine chaperonne ASF1 comme chez les huîtres triploïdes alpha. Il a été montré chez la levure, qu'un appauvrissement des histones active le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC ou Spindle Assembly Complex) et altère la ségrégation des chromatide sœurs,

conduisant à une mauvaise ségrégation des chromosomes ou à la létalité des cellules possédant un SAC défectueux (Murillo-Pineda et al., 2014). De plus, l'activation du SAC par déplétion des histones est associée à des altérations médiées par la condensation de la chromatine centromérique (Murillo-Pineda et al., 2014). Ces résultats montrent que chez les individus beta une déplétion des histones entraine potentiellement une activation du SAC et donc un arrêt du cycle cellulaire en mitose. De plus, cette activation s'accompagne de condensation de la chromatine centromérique qui pourrait expliquer la forte condensation nucléaire des noyaux des cellules germinales bloquées chez les individus beta. Ceci vient conforter les résultats obtenus dans le chapitre 1 qui supposent que chez les individus beta, les perturbations de la gamétogenèse sont associées à un arrêt du cycle cellulaire des cellules germinales en mitose via une activation du SAC.

Enfin, l'analyse de l'expression relative des protéines entre les individus diploïdes et les individus triploïdes a permis de mettre en évidence des protéines spécifiques des cellules germinales, les protéines DDX4 (VASA) et PIWI. Chez les huîtres triploïdes alpha et beta, la protéine DDX4 (VASA) est significativement sous exprimée par rapport aux huîtres diploïdes. VASA est impliqués dans la formation de la lignée germinale chez de nombreux eucaryotes (Lasko, 2013). Son profil d'expression a été caractérisé dans les tissus adultes au cours du cycle de gamétogenèse chez *Crassostrea gigas*. Une expression forte a été retrouvée dans les cellules germinales précoces et son expression diminuait à mesure que la maturation des cellules germinales progressait (Fabioux et al., 2004). On retrouve également une sous expression significative de la protéine PIWI chez les huîtres alpha et beta par rapport aux huîtres diploïdes. Les protéines PIWI sont essentielles pour la gamétogenèse, l'embryogenèse et le maintien des cellules souches (Watanabe et Lin, 2014) Une étude a montré au cours du cycle de gamétogenèse une absence d'expression du gène *piwi* aux stades 0 et 1 dans la gonade chez les individus triploïdes mâles en revanche une plus forte expression été observée au stade 2 chez les individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes. (Rui et al., 2020). Cependant, les auteurs ne dissocient par les individus triploïdes alpha des individus beta. De plus nos résultats concernent l'expression protéique alors que les auteurs ont quantifié l'expression du transcrit par PCR quantitative ce qui peut expliquer les différences observées en terme d'expression. De plus, la voie PIWI est reconnue comme une première ligne de défense contre la mobilisation du rétrotransposon par liaison avec les piRNA pendant le développement de la gamétogenèse (Aravin et al., 2008; Reuter et al., 2011; Ku et Lin, 2014). Il a été suggéré que la voie PIWI/piRNA pourrait fournir une défense adaptative dans le « silencing » des transposons chez

les individus triploïdes pour assurer la stabilité génomique (Rui et al., 2020). Les résultats de ce chapitre feront l'objet d'un prochain article.

Une étude des modifications post traductionnelles (méthylation de l'ADN et méthylation des histones) chez les huîtres triploïdes alpha et beta plus ciblée est donc à envisager afin de comprendre les régulations fines associées à l'augmentation du niveau de méthylation totale de l'ADN chez les huîtres triploïdes alpha et à une condensation de la structure de la chromatine chez les individus triploïdes beta. Il pourra également être envisagé d'étudier les acétylations et les phosphorylations des histones. Pour se faire il est indispensable d'extraire uniquement la fraction nucléaire des protéines des cellules germinales de la gonade afin d'enrichir l'extrait protéique en protéine nucléaire avant l'analyse en spectrométrie de masse. Cette étape est indispensable pour une identification spécifique des acides aminés modifiés ainsi que de leur position dans la séquence de la protéine. Ainsi, une compréhension détaillée des mécanismes épigénétiques associés aux deux stratégies de reproduction chez les individus triploïdes pourra être envisagée.

Chapitre 3 : Etude des capacités reproductives et de la croissance de l'huître creuse triploïde, *Crassostrea gigas,* en conditions environnementales contrastées

Chapitre 3 : Etude des capacités reproductives et de la croissance de l'huître creuse triploïde, *Crassostrea gigas,* en conditions environnementales contrastées

Chez l'huître creuse, le cycle gamétogénétique est influencé par les conditions environnementales induisant dans les écosystèmes tempérés une rythmicité du développement gonadique (Pouvreau et al., 2006). Le cycle de gamétogenèse est constitué de quatre stades principaux alternant entre la phase de repos sexuel où le tissu gonadique est très peu développé en hiver et les phases de prolifération, différenciation et maturation des gamètes avec un fort développement gonadique en été (Berthelin et al., 2001). Parallèlement à cette variabilité temporelle, le cycle de gamétogenèse dépend également de la disponibilité en phytoplancton et de la température qui conditionnent les performances de croissance (Cardoso et al., 2007). Il existe donc un lien étroit entre les variations des paramètres environnementaux, l'effort de reproduction et la croissance des individus (Ernande et al., 2004). De nombreuses études se sont intéressées à l'influence des conditions environnementales telles que la température, la salinité, la disponibilité en nourriture sur la croissance et la reproduction des huîtres diploïdes (Chávez-Villalba et al., 2002 ; Fabioux et al., 2005 ; Antonio et Camacho, 2018). Toutefois, peu de données sont disponibles concernant l'influence des paramètres environnementaux sur la reproduction et la croissance des huîtres triploïdes (Garnier-Géré et al., 2002; Villanueva Fonseca et al., 2017). A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée aux performances de croissance des huîtres triploïdes alpha et beta en conditions environnementales contrastées. Ainsi, ce chapitre propose de compléter les connaissances déjà acquises chez les huîtres triploïdes en prenant en compte les deux catégories d'huîtres triploïdes alpha et beta.

I. Introduction

A. Notion d'effort de reproduction

L'effort de reproduction est un concept théorique central de l'écologie, la biologie des populations et la physiologie. Il découle du postulat selon lequel un être vivant bénéficie d'un quantité d'énergie limitée, apportée par la nutrition est répartie entre trois grandes fonctions : la survie, la croissance et la reproduction (Kooijman, 2000; Nisbet et al., 2012). L'effort reproducteur correspond à la fraction de cette énergie allouée à la reproduction aux dépens des deux autres fonctions. Chez les mollusques, on considère que le volume de la gonade reflète l'investissement énergétique dans la reproduction. Chez l'huître, l'effort reproducteur peut être estimé par le calcul de l'occupation gonadique proposé par Normand et al., 2009 à partir de la relation décrite par Enriquez-Diaz, 2004. Il s'agit du rapport de la surface gonadique sur la surface totale estimé sur une coupe histologique (Figure 36). Par ailleurs, supposer que l'occupation gonadique est une mesure de l'effort de reproduction repose sur l'hypothèse que l'allocation à la croissance somatique est constante au cours des saisons de reproduction. Le développement cyclique de la gonade de l'huître rend difficile l'analyse séparée de la dynamique de la maturation et de l'allocation à la reproduction qui sont intimement liées. Une mesure de la masse gonadique effectuée à un instant t du cycle de reproduction des individus ne peut être représentative de l'effort de reproduction annuel de l'individu. Seules des mesures répétées au cours du cycle de gamétogenèse peuvent être représentatives de l'effort de reproduction des individus (Enriquez-Diaz, 2004; Normand et al., 2009).

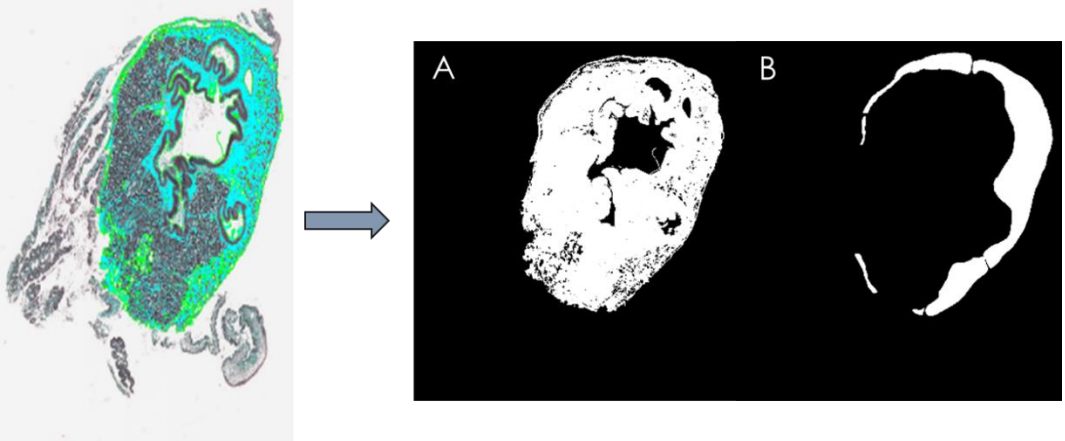


Figure 36 : Mesure de l'effort reproducteur à partir d'une coupe histologique transversale d'huître creuse, *Crassostrea gigas* colorée au trichrome de Prenant Gabe. L'effort de reproduction est défini comme étant le rapport de la surface gonadique (B) sur la surface totale de l'individu (A) (sans les branchies et les franges du manteau).

B. Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la reproduction

La plupart des étapes spécifiques du cycle de vie de l'huître, le développement, la croissance et la reproduction sont liées aux phénomènes de saisonnalité c'est-à-dire aux changements de conditions du milieu et à la disponibilité en nourriture (Bayne, 2017). Les conditions environnementales affectent les fonctions biologiques de l'huître telles que l'alimentation, l'utilisation des réserves et la croissance. Une étude, chez l'huître creuse, *Crassotrea gigas* adulte montre que les différences environnementales des variables liées à l'alimentation (matière organique particulaire, la concentration en caroténoïdes et la concentration en chlorophylles a et b), la salinité de l'eau et la température ont une influence significative sur les courbes de croissance et la hauteur de coquille (Brown et Hartwick, 1988). Sarà et Mazzola., 1997 mentionnent également une relation entre la quantité et la qualité de la nourriture disponible et la croissance (longueur de coquille et poids sec) des animaux élevés sur des palangres liées à des récifs artificiels. Un effet de la composition de l'alimentation sur la croissance [énergie (J) et poids (g)] a été mis en évidence (Hyun et al., 2001). Selon Costil et ses collaborateurs, la croissance de la coquille et des tissus mous pourrait être influencée par des apports fluviaux notamment la quantité et/ou la qualité des ressources trophiques, la température et de façon moins importante par l'oxygène dissous, la chlorophylle a et la matière en suspension. Enfin, plus récemment, une étude a montré que des taux de croissance différents (longueur de coquille et poids corporel) étaient observés pour des huître réparties dans trois

lagunes américaines. L'hypothèse proposée pour expliquer ce différentiel de croissance chez les individus est une influence des facteurs environnementaux tels que la température, les courants, les marées, la diversité et l'abondance du phytoplancton, la profondeur et la méthode de culture (Villanueva Fonseca et al., 2017).

L'étude de l'écophysiologie des bivalves marins est fondée sur l'analyse des corrélations existant entre les variations d'un ou plusieurs facteurs du milieu (température, disponibilité en nourriture …) et certains évènements caractéristiques du cycle reproductif (initiation de la gamétogenèse, maturation gonadique, émission des gamètes…).

Les facteurs environnementaux jouent également un rôle déterminant sur la reproduction notamment au niveau de la gamétogenèse et de la fécondité des individus. L'influence des facteurs environnementaux sur l'effort reproducteur chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été très étudiée dans l'espoir de prédire le recrutement larvaire et d'améliorer la disponibilité en naissain pour l'aquaculture (His, 1976). Ces travaux ont montré une influence importante de l'environnement pour l'allocation aux fonctions physiologiques de l'huître par l'analyse de la croissance des individus dans le milieu naturel combinée à celle des paramètres environnementaux. Plus spécifiquement, deux paramètres jouent un rôle central : la température et la disponibilité en nourriture. Ainsi les faibles températures et le manque de nourriture inhibent la gamétogenèse (Ruiz et al., 1992; Steele et Mulcahy, 1999). La température est considérée comme le facteur principal affectant le développement gonadique chez les bivalves marins. De nombreuses études chez *Crassostrea gigas,* ont montré un lien entre l'évolution de la gamétogenèse et la température du milieu ambiant (Chávez-Villalba et al., 2002; Fabioux et al., 2005; Cardoso et al., 2007; Dutertre et al., 2009, 2010; Antonio et Camacho, 2018). En 2005, Fabioux et al., soumettent des huîtres à différentes modalités d'élevage sur la base de cycle de photopériode et de température reproduisant dans un premier temps l'évolution de ces paramètres sur le site de Marennes-Oléron, dans un second temps la même évolution mais accélérée deux fois et enfin des conditions hivernales (Figure 36). Les huîtres soumises à un cycle accéléré connaissent deux épisodes de maturation gonadique en un an et émettent deux fois des gamètes. A l'inverse, les huîtres soumises au conditionnement « hivernal » développent une gonade mature mais présentent une dynamique de gonadogenèse ralentie. De plus aucune émission de gamètes n'est observée chez ces individus (Figure 37). Il est désormais admis que les périodes de gamétogenèse et d'émission gamétique sont directement sous la dépendance de la température de l'eau. Cependant, la température a souvent été considéré comme le seul facteur influençant le cycle de gamétogénèse. L'huître montre pour

sa reproduction des caractéristiques plus complexes pour lesquels la nourriture semble jouer un rôle tout aussi important. En milieu naturel, la reproduction semble sous la dépendance des efflorescences phytoplanctoniques saisonnières (Deslous-Paoli et Héral, 1988; Kang et al., 2000; Chávez-Villalba et al., 2002). Cependant d'un point de vue quantitatif, l'effet de la nourriture sur la reproduction reste encore peu décrit.

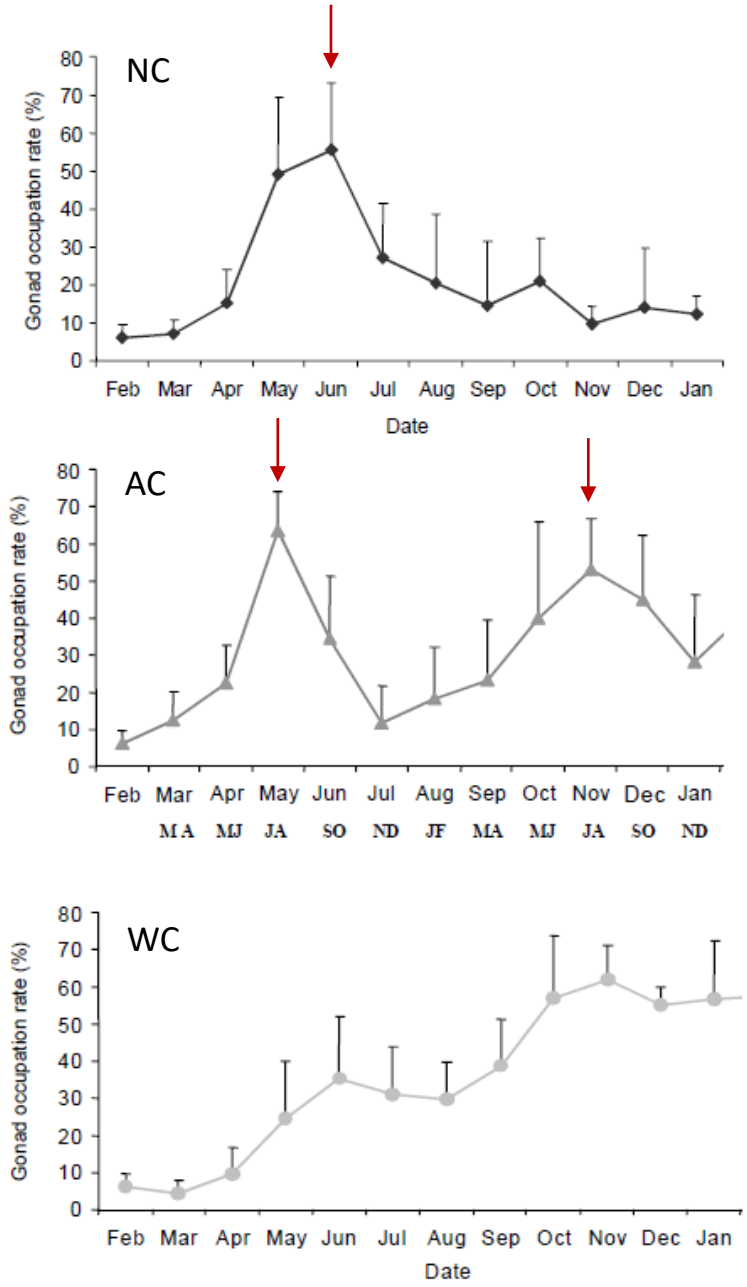


Figure 37 : Evolution de l'occupation gonadique (calculée à partir de la surface standardisée de gonade sur la surface de la masse viscérale totale) d'huîtres creuses issues d'un même lot et soumises à trois modalités de conditionnement contrastées (NC : conditions imitant l'évolution annuelle de la photopériode et de la température à Marennes-Oléron, AC : cycle de Marennes-Oléron accéléré par deux et WC : conditions hivernales) Les flèches indiquent les émissions gamétiques. Tiré de : (Fabioux et al., 2005).

C. Covariation des traits physiologiques

L'huître creuse peut investir jusqu'à 65% de son budget énergétique annuel dans la reproduction, ce qui est considérable si on compare à d'autres bivalves filtreurs (Van der Veer et al., 2006). L'émission des gamètes, quand elle se produit, représente une importante perte de masse de chair qui peut attendre 62% du poids frais de l'animal (Deslous-Paoli et Héral, 1988). D'autre part la quantité de tissu gonadique produit subit une très forte variabilité spatio-temporelle du fait de l'hétérogénéité des conditions de vie. Du fait de l'interdépendance entre les traits phénotypiques, il n'est pas surprenant que des corrélations apparaissent entre l'intensité du développement gonadique et la moyenne des autres traits. Il existe une relation entre le développement gonadique et somatique puisque la gamétogenèse coïncide avec une augmentation de la masse somatique (Royer et al., 2008). A l'inverse, une émission des gamètes incomplète ou absente en raison des conditions du milieu entraine une réallocation de cette énergie vers la croissance somatique (Pouvreau et al., 2006). De plus, la période de la gamétogenèse coïncide avec l'apparition des mortalités estivales dans le milieu naturel. L'existence d'une relation entre l'intensité de l'allocation à la reproduction et la survie estivale a été rapidement supposée. Une déplétion des réserves énergétiques somatiques réorientées vers la gonade en période de reproduction entraine une mobilisation des fonctions vitales vers la gamétogenèse. Les individus sont par conséquent fragilisés et cela contribue probablement aux mortalités estivales récurrentes observées chez cette espèce (Deslous-Paoli et Héral, 1988; Samain et al., 2007; Soletchnik, 2008). Ces résultats illustrent la covariation des variables physiologiques au cours de la saison et l'orientation prioritaire du métabolisme des huîtres vers la croissance gonadique.

D. Modifications des caractères reproducteurs induites par la triploïdie.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'induction de la triploïdie entraine des perturbations importantes de la gamétogenèse. Deux catégories d'individus sont retrouvées, les huître alpha et beta qui sont très différentes du point de vue du déroulement et surtout du résultat de la gamétogenèse. Les huîtres alpha correspondent à des animaux possédant une gamétogenèse peu perturbée avec en début de cycle des phases de prolifération des cellules germinales et en fin de cycle des tubules bien développés contenant des gamètes matures. Les

huîtres beta présentent une gamétogenèse fortement perturbée avec en début de cycle très peu de proliférations des cellules germinales associées à des cellules goniales bloquées dès le stade 1. En fin de cycle, ces individus présentent seulement quelques gamètes matures dans des tubules réduits (Jouaux et al., 2010). Par conséquent, la triploïdie induit une réduction de la quantité de tissu gonadique produit ainsi qu'une diminution de la production de gamètes matures (Allen et al., 1987; Guo et Allen, 1994; Gong et al., 2004). Ainsi chez les huîtres triploïdes, la diminution de l'allocation à la reproduction s'accompagne d'une réallocation de l'énergie vers la croissance somatique et la survie entrainant une croissance plus rapide des individus triploïdes (Allen et Downing, 1986; Hawkins et al., 1994). Cependant, cette réallocation énergétique ne peut pas expliquer à elle seule l'augmentation de la croissance des individus triploïdes avant la période de maturité sexuelle

E. Influence des facteurs environnementaux sur la croissance des huîtres triploïdes

Les huîtres triploïdes présentent de nombreux avantages par rapport aux huîtres diploïdes, comme une croissance plus rapide (Allen et Downing, 1986; Nell, 2002; Normand et al., 2009). De nombreuses études écologiques ont montré que les facteurs environnementaux tels que la disponibilité en nourriture, la salinité de l'eau ou la température jouent un rôle important sur la croissance et la survie des individus (Garnier-Géré et al., 2002; Villanueva Fonseca et al., 2017; Wadsworth et al., 2019; Vialova, 2020). Villanueva et al. (2017) ont montré des taux différents de croissance entre les huîtres diploïdes et triploïdes (longueur de coquille et poids corporel) présentent sur trois sites mexicains différents. Pour expliquer ce différentiel de croissance, ils ont émis l'hypothèse que les facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, les courants, les marées, la diversité et l'abondance du phytoplancton ainsi que la profondeur influencent la croissance des huîtres. Ils ont également montré que les conditions environnementales spécifiques aux trois sites d'étude influencent la croissance dans une bien plus grande mesure que la ploïdie des individus. Wadsworth et al. (2019) ont réalisé une analyse globale de la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes en compilant les résultats de 29 études publiées. Lorsque les données étaient disponibles, l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des individus a été prise en compte. Ils ont montré un taux de croissance (longueur de coquille et poids corporel) plus important chez les huîtres triploïdes par rapport aux diploïdes avec un avantage considérable pour les huîtres triploïdes issues de

croisement 4n x 2n par rapport aux huîtres triploïdes induites chimiquement ce qui suggère que les deux techniques d'obtention ne sont pas équivalentes. De plus, ils mettent également en évidence une forte influence de la température et de la salinité sur la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes.

II. Objectifs

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à comprendre l'influence des variations des paramètres environnementaux sur la reproduction et la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta au cours du premier cycle de gamétogenèse. En effet, de nombreuses études rapportent une influence des facteurs environnementaux telles que la disponibilité en nourriture, la salinité de l'eau ou la température sur l'augmentation de la croissance des individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes (Allen et Downing, 1986; Nell, 2002; Normand et al., 2009). En cas de conditions environnementales défavorables, les huîtres triploïdes, ont-elles une croissance supérieure à des individus diploïdes dans des conditions similaires ? Certaines études posent l'hypothèse que cette augmentation de la croissance des individus triploïdes est due à la diminution de l'allocation à la reproduction qui s'accompagne d'une réallocation de l'énergie vers la croissance somatique (Allen et Downing, 1986; Hawkins et al., 1994). Cette réallocation énergétique ne peut pas expliquer à elle seule l'augmentation de la croissance des individus triploïdes. Quels sont les facteurs impliqués dans l'augmentation de la croissance des individus triploïdes ? A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées à l'influences des paramètres environnementaux à la fois sur la croissance et la reproduction des individus diploïdes et triploïdes. De plus, le peu d'études disponibles dans la littérature ne prend pas en compte les deux catégories d'huîtres triploïdes alpha et beta qui possèdent des différences considérables à la fois au niveau du déroulement du cycle de gamétogenèse et au résultat de la gamétogenèse. En effet, les individus alpha ont une gamétogenèse proche des individus diploïdes (Jouaux et al., 2010). Comment expliquer l'augmentation du taux de croissance chez ces individus malgré un investissement énergétique non négligeable dans la gamétogenèse ? Les individus beta présentent une gamétogenèse très perturbée avec un effort reproducteur fortement réduit par rapport aux individus alpha et diploïdes (Jouaux et al., 2010), Ont-ils par conséquent une croissance supérieure par rapport aux individus triploïdes alpha ?

Afin d'étudier les capacités reproductives et la croissance des huîtres triploïdes alpha et beta par rapport aux huîtres diploïdes, deux sites ont été choisis d'une part sur leurs situations

géographiques respectives et d'autre part sur leurs caractéristiques biotiques et abiotiques distinctes. Le cycle de reproduction des individus a été étudié sur les deux sites au cours de la gamétogenèse par histologie. Cela a permis d'obtenir le sexe et le stade gamétogénétique de chaque individu. A partir de ces coupes histologiques, l'effort de reproduction des individus diploïdes et triploïdes a été quantifié. En parallèle de l'étude de la gamétogenèse, un suivi de la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes a été réalisée grâce à la mesure de la longueur et de la surface maximale de la coquille ainsi que le poids des tissus frais pour chaque individu lors des différents prélèvements. Enfin, une analyse trophique des deux sites à partir des données extraites du modèle ECOMARS-3D de la région manche Gascogne (Ménesguen et al., 2019) a permis de caractériser les variations des paramètres environnementaux telles que la température, la salinité et la production primaire sur les deux sites d'élevage.

L'objectif de ce chapitre est de comprendre l'influence des facteurs environnementaux telles que la température, la salinité et la disponibilité en nourriture sur la gamétogenèse et la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes. Cet objectif vise à comprendre dans quelle mesure la ploïdie conditionne la gamétogenèse au niveau du sex-ratio et le niveau d'individus bloqués, de l'effort de reproduction, le déroulement temporel de la gamétogenèse (les périodes de changements des stades.

III. Résultats

A. Etude de la gamétogenèse et de l'effort reproducteur des huîtres diploïdes et triploïdes en conditions environnementales contrastées

1. Suivi de la gamétogenèse des individus diploïdes et triploïdes à Cricqueville en Bessin en 2018

Un échantillonnage d'huîtres diploïdes et triploïdes a été mis en place en décembre 2017. Deux poches contenant chacune 500 individus diploïdes et triploïdes ont été placées sur une table ostréicole en mer à Cricqueville en bessin (concession expérimentale de l'Université de Caen Normandie, Normandie, France). Les huîtres triploïdes ont été obtenues par des croisements de géniteurs tétraploïdes et diploïdes. Un prélèvement d'individus a été réalisé tous les quinze jours jusqu'en septembre 2018 (Figure 38). Le sexe et le stade gamétogénétique de l'ensemble des individus ont été déterminés par histologie (Chapitre 1, Partie.VI.A). Cet échantillonnage nous a permis de suivre la mise en place et l'évolution de la première

gamétogenèse chez des individus diploïdes et triploïdes. Ainsi, pour les expériences des chapitres 1 et 2, les tissus des animaux diploïdes et triploïdes de cet échantillonnage ont été utilisés. Cela a permis de réaliser l'ensemble des expériences avec la même cohorte d'individus. En revanche, seul l'étude du cycle de gamétogenèse et la quantification de l'effort de reproduction a été réalisée sur les huîtres diploïdes et triploïdes de cet échantillonnage dans le chapitre 3, ainsi une comparaison du cycle de gamétogenèse et de l'effort de reproduction a pu être menée entre les années 2018 et 2019 sur le site de Cricqueville en bessin.

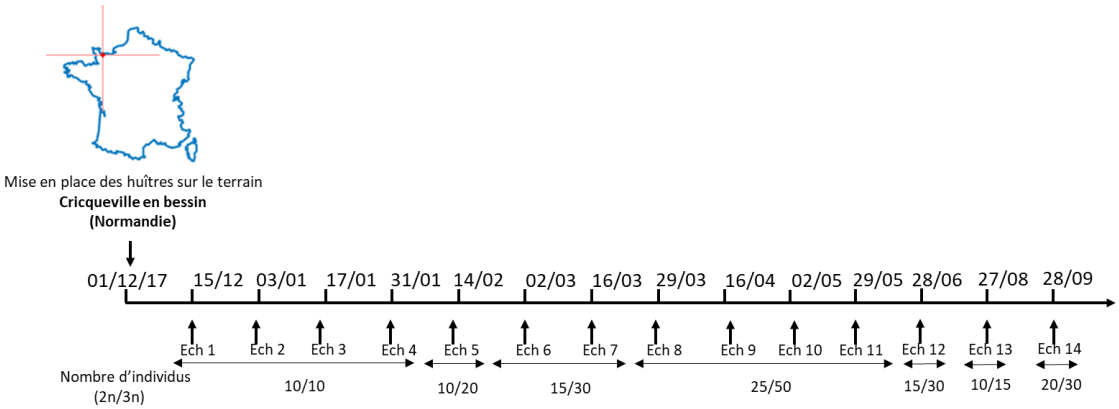


Figure 38 : Description de l'échantillonnage (prélèvements réalisés tous les quinze jours de décembre 2017 à septembre 2018 ce qui représente 140 huîtres diploïdes et 260 huîtres triploïdes) des individus diploïdes et triploïdes réalisé à Cricqueville en Bessin (Normandie, France) de décembre 2017 à septembre 2018.

a) Etude du sex-ratio

A l'issue de la période d'échantillonnage, le sexe des 400 individus prélevés (140 individus diploïdes et 260 individus triploïdes) a été identifié (Figure 39). Un sex-ratio majoritairement mâle a été observé chez les individus diploïdes et triploïdes avec respectivement 73,72% et 79,23% de mâles contre 24,82% et 13,85% de femelles. Un nombre supérieur d'animaux hermaphrodites simultanés a été retrouvé chez les huîtres triploïdes représentant 7% des individus contre 1,46% chez les huîtres diploïdes.

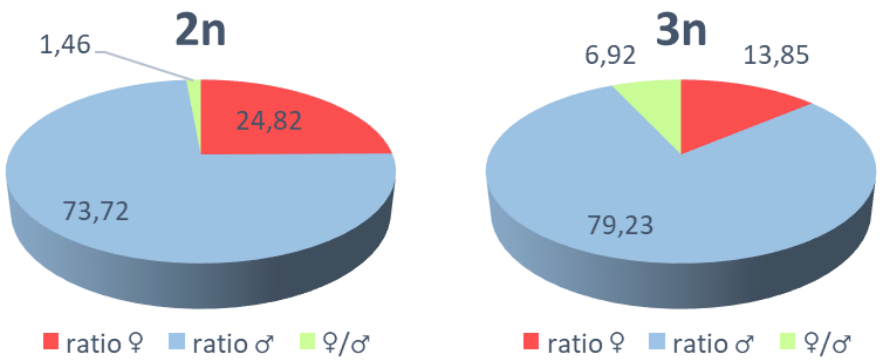


Figure 39 : Sex-ratio des individus diploïdes (2n) et triploïdes (3n) échantillonnés de décembre 2017 à septembre 2018.

b) Etude du cycle gamétogenétique

Le stade de maturité gonadique de chaque individu a été qualifié par une observation microscopique en utilisant les classifications disponibles pour les individus diploïdes (Berthelin et al., 2001) et triploïdes (Jouaux et al., 2010). Comme nous l'avons vu précédemment, les individus triploïdes sont répartis en deux sous catégories, les individus alpha avec une gamétogenèse proche des individus diploïdes et les individus beta présentant des perturbations importantes de la gamétogenèse. Au sein de notre étude, 87% des huîtres triploïdes sont alpha et on trouve seulement 13% d'huîtres triploïdes beta. Le cycle de gamétogenèse des individus diploïdes et triploïdes mâles et femelles semble être synchronisé en ce qui concerne la période d'apparition des différents stades de maturité (Figure 40A et B). La reprise de la gamétogenèse intervient au cours du mois de mars pour les individus diploïdes et triploïdes puisque à la fin mars, la totalité des individus diploïdes est en stade 1 (stade de prolifération des cellules germinales) et à cette même période on trouve 70% des individus triploïdes mâles en stade 1 et 30% en stade 0 (repos sexuel). La faible proportion d'individus triploïdes femelles ne permet pas d'avoir une idée précise de la reprise et du déroulement de la gamétogenèse. De plus, la distinction des huîtres triploïdes femelles alpha et beta n'a pas pu être réalisée au vu du très faible nombre d'individus. La reprise de la gamétogenèse des individus triploïdes mâles semble être synchronisée avec celle des individus diploïdes. A la fin mai, 75% des individus diploïdes sont en stade 2 et 25% en stade 3 alors que chez les individus triploïdes on trouve 15% des individus en stade 1 et 85% en stade 2. Enfin, au cours de l'été, les mêmes proportions d'individus diploïdes et triploïdes sont retrouvées en stade 2 (15%) et 85% en stade 3 (85%)

(maturité sexuelle). Globalement, très peu de variations sont observées en ce qui concerne l'initiation ou le déroulement du cycle de gamétogenèse chez les individus diploïdes et triploïdes. Lorsque l'on s'intéresse aux deux catégories d'individus triploïdes mâles, alpha et beta, on remarque bien que le cycle de gamétogenèse des individus beta est très perturbé et n'aboutit pas à un stade de maturité sexuelle contrairement aux individus alpha qui présentent un cycle de gamétogenèse proche des individus diploïdes (Figure 40 A et C).

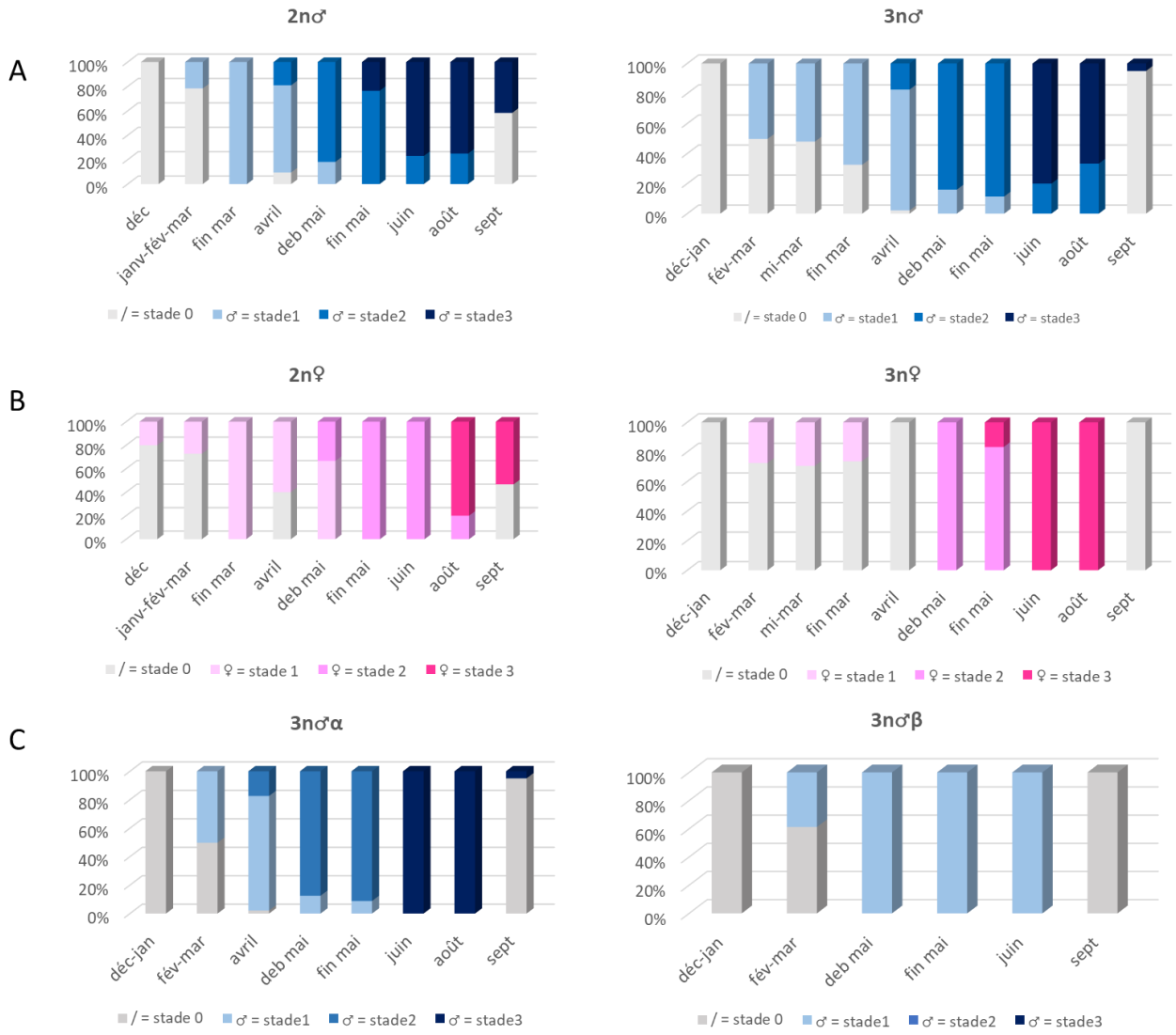


Figure 40 : Evolution de la gamétogenèse chez les individus diploïdes et triploïdes mâles (A) et femelles (B) au cours du cycle gamétogénétique en 2018, déterminée par histologie sur des coupes transversales de coupes gonadiques. Les individus triploïdes mâles ont été séparés en fonction de leur catégorie alpha ou beta (C).

2. Etude de la gamétogenèse et des capacités reproductives des huîtres diploïdes et triploïdes à Cricqueville en Bessin et Géfosse, deux sites contrastés en 2019

A l'issue du premier échantillonnage, un second échantillonnage d'huîtres diploïdes et triploïdes a été mis en place sur deux sites distants d'environ 4 kilomètres, Cricqueville en Bessin (concession expérimentale de l'Université de Caen Normandie, Normandie, France sans autres cultures marines environnantes) et Géfosse (concession expérimentale de l'IFREMER, Baie des Veys, Normandie, France, zone conchylicole) de janvier à novembre 2019 (Figure 41). Ces deux sites proches géographiquement ont été choisis initialement sur la base de faibles variations de certains paramètres, comme la température de l'eau de mer et la bathymétrie, mais présentent des caractéristiques géomorphologiques et hydrodynamiques différentes (montrées au cours du chapitre). Les animaux de chaque site ont été échantillonnés 11 fois de janvier à septembre 2019, tous les quinze jours ou tous les mois selon les périodes. Cet échantillonnage représente une cohorte de 1179 individus, 738 huîtres diploïdes (370 à Cricqueville et 368 à Géfosse) et 441 huîtres triploïdes (215 à Cricqueville et 226 à Géfosse). Pour l'ensemble des individus de chaque site, date et ploïdie, la longueur maximale de la coquille (axe antéro-postérieur) ainsi que la surface maximale de l'animal ont été mesurées par analyse d'images photographiques. Le poids frais des individus a ensuite été mesuré et un prélèvement de gonade a été réalisé pour déterminer le sexe et le stade gamétogénétique de chaque individu. Cet échantillonnage a permis une étude comparative de la mise en place et l'évolution de la première gamétogenèse des huîtres diploïdes et triploïdes sur les sites.

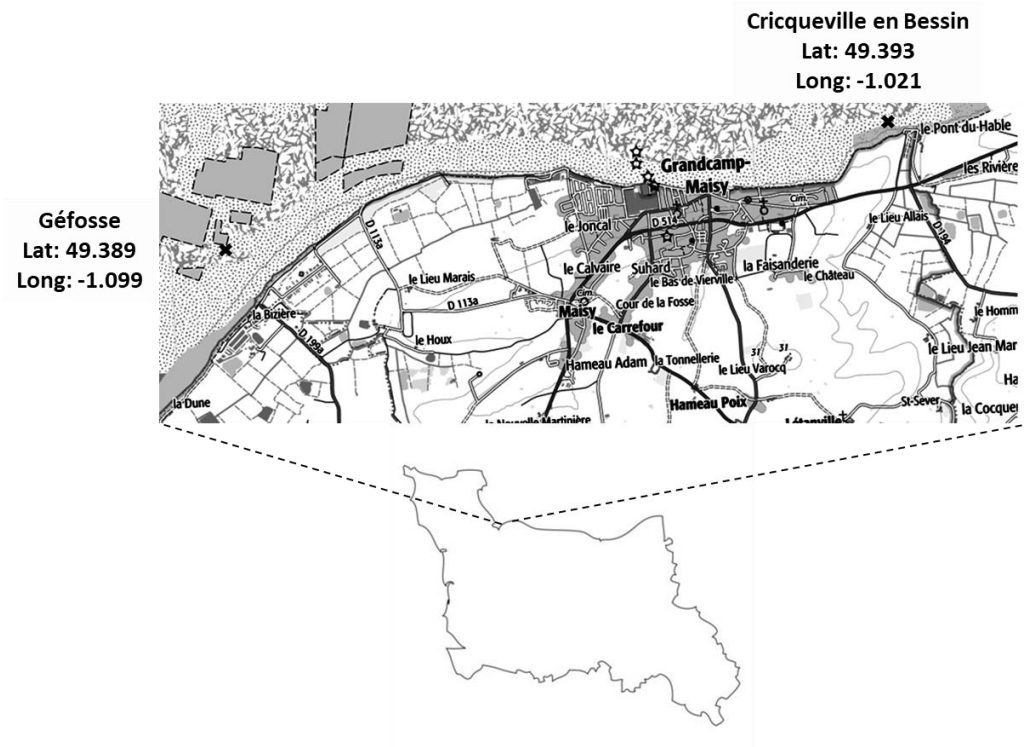


Figure 41: Localisation des deux sites expérimentaux Normands (France), Cricqueville en Bessin (Concession expérimentale de l'Université de Caen Normandie) et Géfosse (Concession expérimentale de l'IFREMER, Baie des Veys).

a) Etude du sex-ratio

A l'issue de chaque prélèvement, le sexe des individus a été identifié par histologie (Figure 42). Un sex-ratio proche est obtenue quels que soient la ploïdie des individus ou le site expérimental. Celui-ci est majoritairement mâle avec 65 à 74% des individus mâles pour 25 à 27% des individus femelles. On trouve 5% d'animaux hermaphrodites de plus chez les individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes.

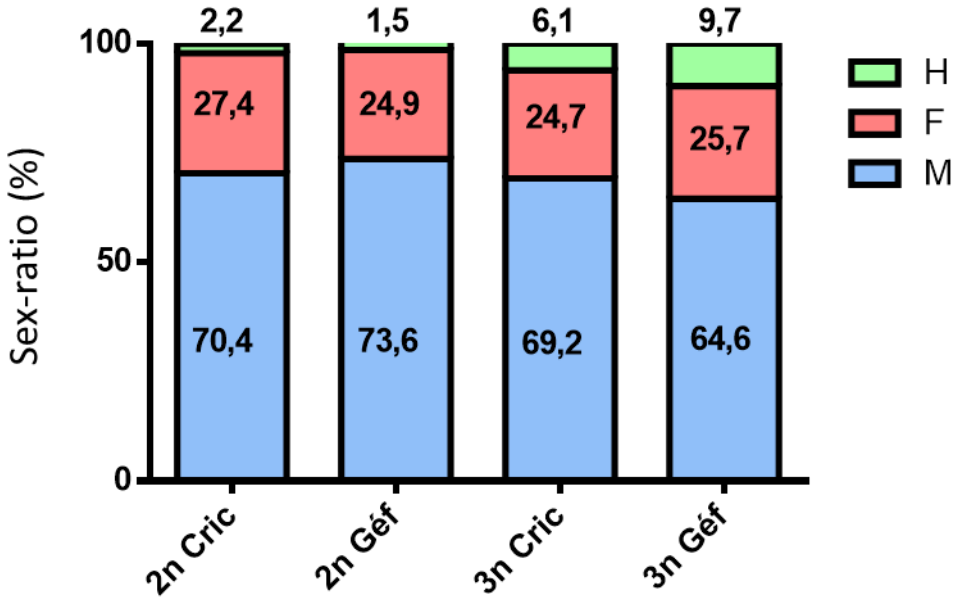


Figure 42 : Sex-ratio des huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3n) sur les sites de Cricqueville en Bessin et Géfosse (Normandie, France) en 2019 (M : Mâle, F : Femelle, H : Hermaphrodite).

b) Etude du cycle gamétogenétique

Le stade de maturité gonadique de chaque individu a été qualifié par une observation microscopique en utilisant les classifications disponibles pour les individus diploïdes (Berthelin et al., 2001) et triploïdes (Jouaux et al., 2010). Les individus triploïdes ont été répartis en deux sous catégories : alpha ou beta. Peu de différences été observées par rapport au pourcentage d'individus bloqués de chaque sexe sur les deux sites. En revanche, le nombre de femelles bloquées semble être inversement proportionnel par rapport aux mâles (Figure 43). Le nombre d'individus mâles bloqués quel que soit le site d'élevage est compris entre 12 et 19% alors que le nombre de femelles bloquées est compris entre 78 à 87%.

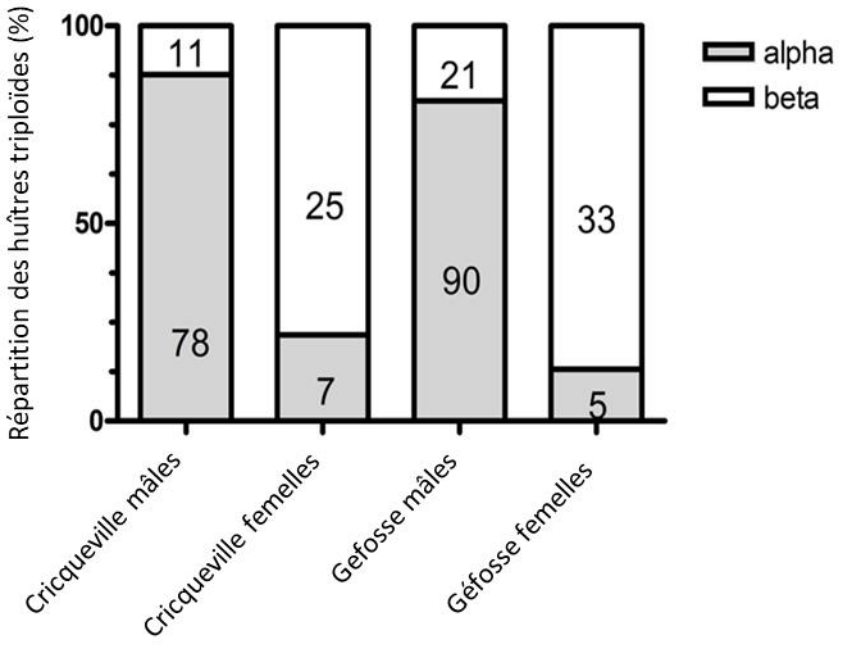


Figure 43 : Répartition des huîtres triploïdes alpha et beta en fonction du sexe et du site d'étude. Les chiffres dans les colonnes représentent le nombre d'animaux par catégorie.

Dans la temporalité du déroulement de la gamétogenèse, le cycle des individus diploïdes mâles et femelles présente un décalage entre les deux sites. La progression dans le cycle est plus rapide au printemps à Cricqueville par rapport à Géfosse, avec en Mai 80% des individus mâles en stade 3 à Cricqueville et 70% en stade 2 à Géfosse. On constate également ce même décalage chez les femelles à la même période avec 60% des individus en stade 2 à Géfosse alors que l'ensemble des individus est au stade 2 à Cricqueville. Malgré ce démarrage plus précoce du cycle de gamétogenèse à Cricqueville, ce décalage se réduit entre les deux sites en été. Et surtout en Juillet 70 à 80% des individus diploïdes des deux sexes sont en stade 3 (maturité sexuel) et engagés dans une régression de la gonade à Géfosse alors que seulement 50% d'animaux atteint le stade 3 à Cricqueville (Figure 44), y compris jusqu'à fin Août pour les mâles. En comparaison des sites, il apparait une proportion de mâles avec une spermatogenèse complète très proche entre les deux sites. Mais, la proportion de femelles atteignant une ovogenèse complète semble moins importante sur Cricqueville que Géfosse.

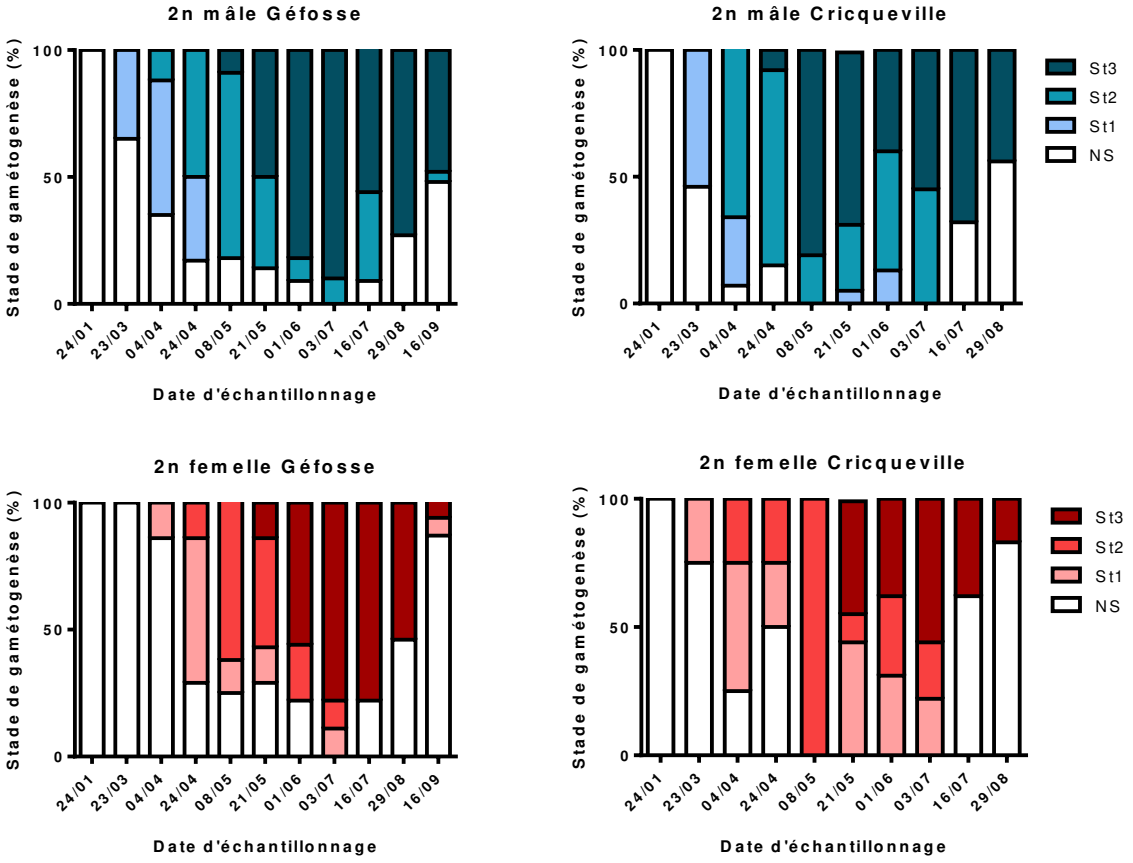


Figure 44 : Evolution de la gamétogenèse des huîtres diploïdes femelles et mâles situés sur les sites de Géfosse (gauche) et Cricqueville (droite) de janvier à septembre 2019. NS: individu non sexable au stade de repos sexuel; 1: stade 1 de prolifération goniale; 2: stade 2 de différenciation; 3: stade 3 de la maturation des gamètes.

Chez les individus triploïdes, les mâles et les femelles présentent un début de cycle assez proche, en revanche on observe à la fin du cycle des individus mâles majoritairement en stade 2 (90% à la mi-juillet) alors que les individus femelles ont globalement atteint le stade 3 de maturité sexuelle (90% à la mi-juillet). Ce constat est valable à la fois pour les individus triploïdes alpha et beta sur les deux sites. Mais, une plus forte proportion de femelles est mature que les mâles. (Figure 45). Cependant, ces résultats sont délicats à interpréter du fait du faible nombre d'individus triploïdes surtout femelles malgré l'échantillonnage conséquent.

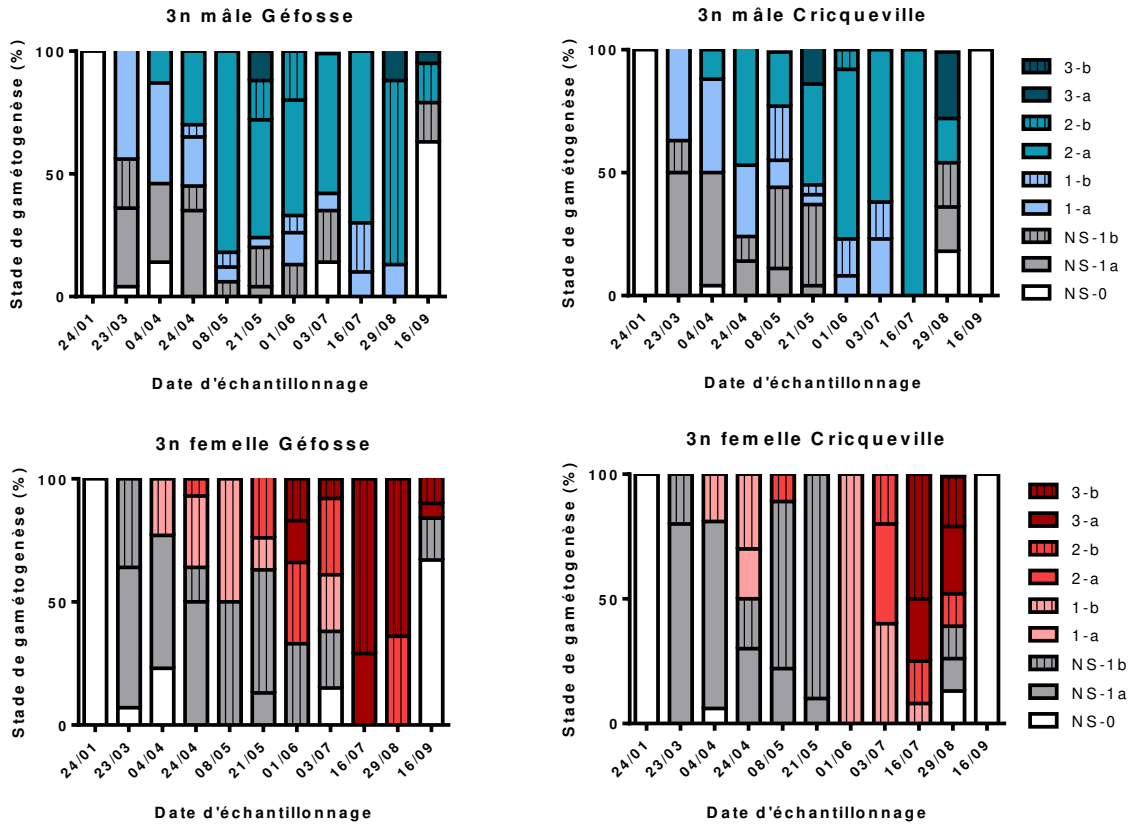


Figure 45 : Evolution de la gamétogenèse des huîtres triploïdes femelles et mâles situés sur les sites de Géfosse (gauche) et Cricqueville (droite) de janvier à septembre 2019. NS: individu non sexable au stade de repos sexuel; 1: stade 1 de prolifération goniale; 2: stade 2 de différenciation; 3: stade 3 de la maturation des gamètes; a : alpha; b : beta.

Lorsque l'on compare le cycle de gamétogenèse des individus diploïdes par rapport au individus triploïdes, là encore peu de différences sont observées en fonction des deux sites d'étude et du sexe. On observe tout de même un décalage de la reprise de la gamétogenèse en fonction de la ploïdie des individus, en mars 2019 où 75% des huîtres diploïdes sont en stade 0 alors que 98% des huîtres triploïdes sont en stade 1. Ce décalage ne persiste pas tout au long du cycle de gamétogenèse puisque dès le mois d'avril, on trouve des proportions similaires chez les huîtres diploïdes et triploïdes entre les différents stades de maturation gonadique (Figures 44 et 45).

c) Etude de l'effort de reproduction

Au cours de cette étude, nous nous sommes uniquement concentrés sur l'effort de reproduction (GTI) mâle puisque lors du premier échantillonnage (Cricqueville 2018), le nombre d'individus femelles triploïdes très réduit n'a pas permis de réaliser cette analyse. Par conséquent, nous comparerons dans cette partie les résultats obtenus sur l'effort de reproduction des individus diploïdes et triploïdes mâles à Cricqueville en Bessin et Géfosse lors de l'échantillonnage de 2019 et dans un second temps l'effort de reproduction des individus diploïdes et triploïdes mâles lors des échantillonnages de 2018 et 2019 à Cricqueville en Bessin.

La mesure de l'effort de reproduction sur les sites de Cricqueville en bessin et Géfosse en 2019 montre qu'il n'y a pas de réelle influence du site sur l'effort de reproduction des individus triploïdes au cours du cycle de gamétogenèse (Figure 46), du moins sur les stades 0 et 1. Chez les individus diploïdes, les différences sont peu marquées, sauf en stade 1 (prolifération des cellules germinales) où l'effort reproducteur des huîtres de Géfosse est inférieur à celui des huîtres de Cricqueville. Cependant, l'effort de reproduction apparaît influencé par la ploïdie sur les deux sites. Dès le stade 2, on observe une GTI proche entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha traduisant un effort de reproduction similaire alors que la GTI des huîtres triploïdes beta est très fortement diminuée. Par contre, un nombre insuffisant d'individus mâles beta n'a pas permis de quantifier l'effort de reproduction des huîtres triploïdes beta au stade 2 à Cricqueville et au cours du stade 3 sur les deux sites.

Les résultats de l'effort de reproduction sur le site de Cricqueville en 2018, ont précédemment été décrits (Chapitre1-Partie.VI.A). Cependant, la comparaison de l'effort de reproduction des deux lots d'individus diploïdes et triploïdes lors des échantillonnages de 2018 et 2019 sur le site de Cricqueville montre chez les individus triploïdes alpha et beta un effort de reproduction identique quel que soit le stade de gamétogenèse. On observe également une diminution de l'effort de reproduction des individus diploïdes entre 2018 et 2019 qui s'intensifie pendant le cycle gamétogénétique (du stade 1 au stade 3). Cela semble traduire l'année 2018 plus propice pour la gamétogenèse diploïde par rapport à l'année 2019. Toutefois, deux lots différents d'individus ont été utilisés pour ces études et un faible nombre d'animaux, il est nécessaire de prendre en compte cette différence dans l'interprétation des résultats.

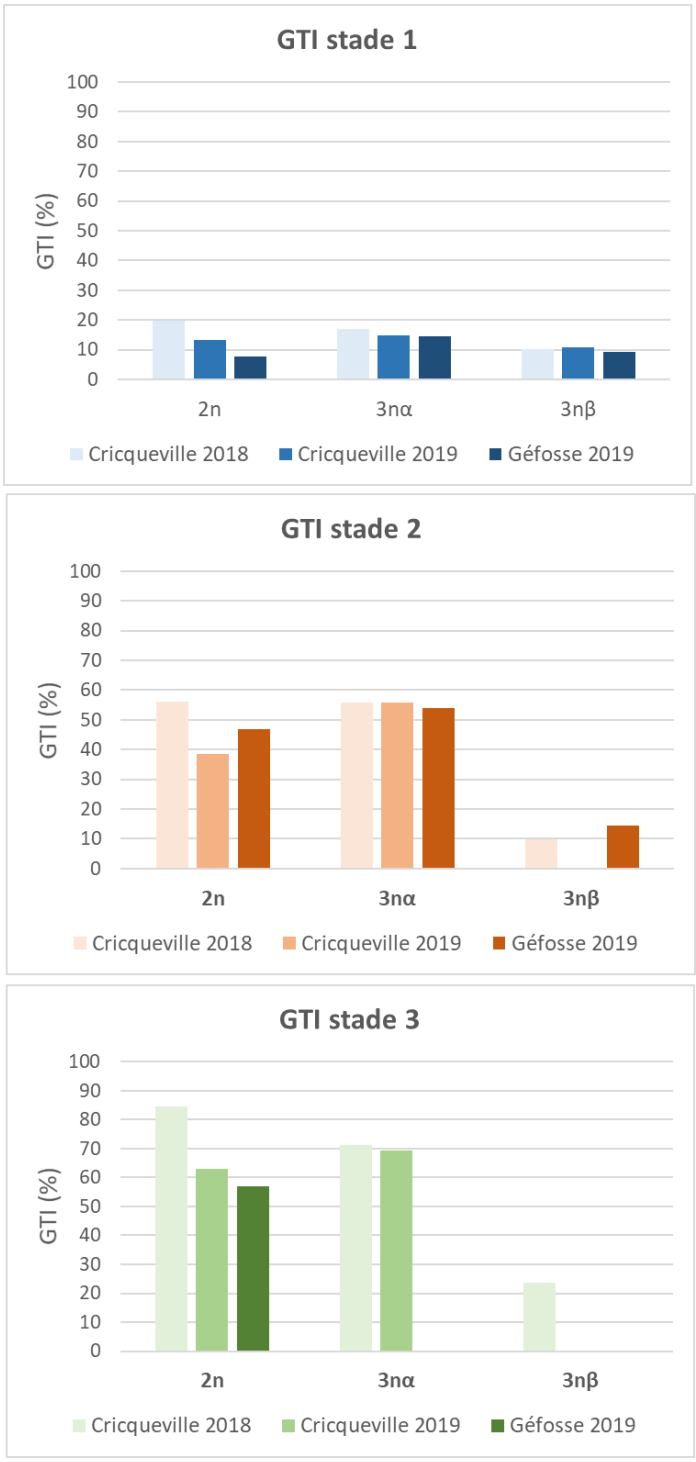


Figure 46 : Mesure de l'effort de reproduction à partir de coupes transversales d'huîtres mâles diploïdes et triploïdes (alpha et beta) sur les sites de Cricqueville en Bessin et Géfosse au cours du cycle de gamétogenèse (stade 1 : prolifération des cellules germinales, stade 2 : maturation des cellules germinales et stade 3 : stade de maturité sexuelle). L'occupation gonadique par les tubules a été estimée (GTI).

d) Influence des facteurs environnementaux

Afin d'évaluer l'influence des facteurs environnementaux sur la gamétogenèse et l'effort reproducteur des huîtres diploïdes et triploïdes, les données environnementales ont été extraites du modèle ECO-MARS3D (Ménesguen et al., 2019) sur le site de Cricqueville en Bessin au cours des années 2018 et 2019. Ce modèle permet d'évaluer les paramètres hydrodynamiques comme la température de l'eau, la salinité ainsi que la production primaire (concentration en chlorophylle a) (Figure 47). Entre les années 2018 et 2019, la salinité de l'eau à Cricqueville en Bessin est relativement stable, comprise entre 34 et 35 ± 0,1 PSU. La température de l'eau est identique sur le site entre janvier et septembre 2018 et 2019 sauf pour les mois de mars et avril. Une augmentation de la température de l'eau de 2,4°C en mars 2019 et 1,4°C en avril 2019 est observée par rapport aux mêmes mois en 2018. Enfin, la concentration en chlorophylle a est très proche entre les deux années. On trouve seulement une augmentation de la concentration en chlorophylle a en avril 2019 (4,09 $mg.L^{-1}$) par rapport à avril 2018 (2,58 $mg.L^{-1}$). Cette augmentation de la concentration en chlorophylle a suivi l'augmentation de la température de l'eau en mars et avril 2019 (Figure 47).

Cette variation printanière en température et en chlorophylle entre 2018 et 2019, suggère que la hausse en 2019 pourrait être mise en relation avec l'engagement gamétogénétique plus précoce en 2019 pour les huîtres diploïdes et triploïdes, avec une proportion plus importante d'animaux en stade 2 (voir Figures 40, 44 et 45).

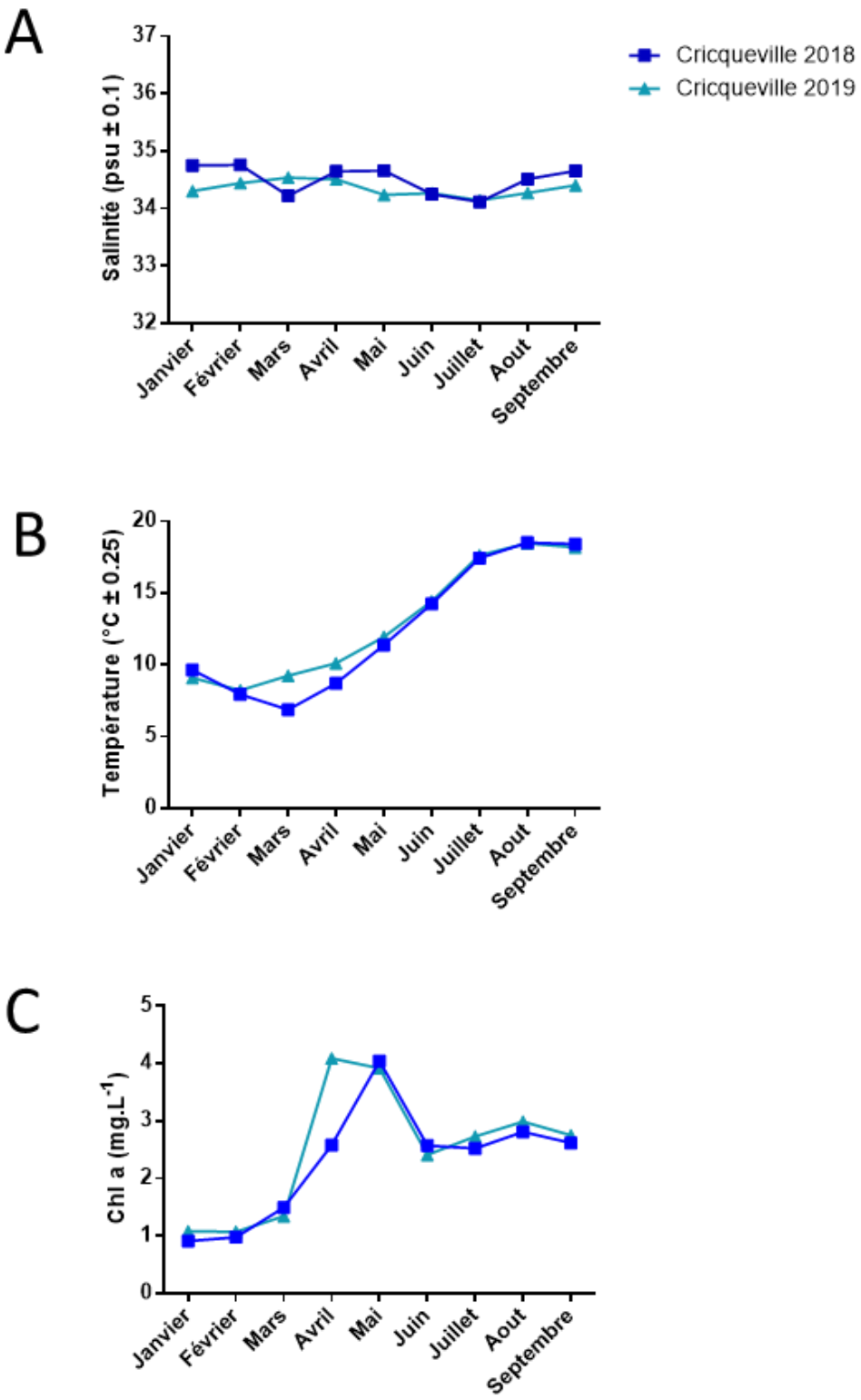


Figure 47 : Suivis mensuels des facteurs environnementaux : température journalière moyenne (°C) (A), salinité (‰) (B) et production primaire (mg.L^{-1}) (estimée par la concentration en chlorophylle a) (C) à Cricqueville en bessin de janvier à septembre 2018 et 2019 (données extraites du modèle ECO-MARS3D).

B. Etude de la croissance d'individus diploïdes et triploïdes en conditions environnementales contrastées en 2019

Growth of 2n and 3n juveniles of *Crassostrea gigas* under differing trophic conditions at two sites in Normandy

Maillard F[1,2], Lehuen A[1,2], Normand J[3], Villain Naud N[1,2], Roger C[1,2], Louis W[3], Martinez AS[1,2], Lelong C[1,2,3]

[1] Unité de Formation et de Recherches (UFR) des sciences, Université de Caen Normandie, 14032 Caen CEDEX, France.

[2] Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), FRE2030, Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche et Développement (IRD), Sorbonne Université (SU), Université de Caen Normandie (UCN), Université des Antilles (UA), 75231 Paris CEDEX, France.

[3] IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources en Normandie, Port en Bessin, France.

[4] Oestrogènes et Reproduction (OeReCa), EA2608, Université de Caen Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen CEDEX, France.

Abstract

The sessile benthic cupped oyster *Crassostrea gigas*, depends to growth and reproduce to the environmental cues. Oyster culture is a field aquaculture, largely subjected to the biotic and abiotic factors. To overcome it, the obtention of triploid oysters has been deployed to provide animals with a rapid growth and lacked reproduction. Few studies have really shown the impact of the changing environment on the growth of 3n oysters. Thus, 2n and 3n oysters have been bred on two distinct sites, Géfosse and Cricqueville in Normandy (France), Géfosse considered as a hypertrophic shellfish site. Animals were sampled one or two times per month and the wet weight, area and length of shell have been measured. To characterize the biotic and abiotic

factors, we extracted the data of the ECO-MARS3D model. Our work demonstrates a faster growth of 3n oysters than 2n whatever both sites. However, the growth has more in Gefosse for the 2n and 3n oysters and seems to be linked to the temperature and the phytoplanktonic primary production, instead of Cricqueville where the salinity appears more involved. Depending to the sites, the environmental cues which influence the growth are different. To be sure, the influence of these different parameters needs to be validated under controlled conditions or in more contrasted locations, while integrating the strong genetic heterogeneity of the oysters.

Key words: *Crassostrea gigas*, oysters, triploids, growth rate, environmental conditions.

Introduction/Background

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the most produced bivalve mollusc, with a worldwide production of 639 030 tons in 2017 (*FAO, 2019*). The culture and production of *C. gigas* in France depends, according to years, on wild-caught juveniles for 70-80 % and on hatchery produced juveniles for 20-30%. Triploidization is increasingly used for a wide range of farmed plants and aquaculture animals to improve their production, notably in bivalve molluscs as oysters (*for review see* Piferrer et al., 2009). Moreover 90% of the latter are triploids (Dégremont et al., 2010). Juvenile oysters, also called "spat" by hatcheries and shellfish farmers, correspond to developmental stages that have set and undergone metamorphosis, before reaching sexual maturity. According to the rearing conditions, they correspond to 1-2-year-old animals.

In this respect, triploid pacific oysters exhibit numerous advantages over diploid oysters, such as a faster growth (Allen et Downing, 1986; Normand et al., 2009) and a disturbed gametogenesis, which prevents part of them from being mature during the summer (Allen et Downing, 1990; Nell, 2002; Normand et al., 2008; Jouaux et al., 2010). Thereupon, Jouaux et al., 2010 divided triploid oysters into two main classes according to their gametogenesis pattern: (1) the α triploid oysters producing numerous mature gametes and (2) β triploid oysters displaying only few mature gametes, β1 triploids presenting no germinal cell lineage in contrast with β2.

The oyster, a sessile/sedentary animal, whose growth is influenced by the environment

Different ecological studies have demonstrated that environmental factors such as food, water salinity or temperature play an important role in the development, growth and survival of aquatic animals. Such environmental influence could be further exacerbated in sessile or

sedentary animals such as natural or cultivated oysters. Thus, work on these aspects were published for instance for *C. virginica* with respect to water salinity, temperature or hypoxia/pH (Ragone Calvo et Burreson, 2000; Pernet-Coudrier, 2008; Rybovich, 2014; Keppel et al., 2016; Grizzle et al., 2017), for *C. nippona* with a salinity effect (Wang et al., 2018) or for *C. ariakensis* with respect to salinity and tidal elevation (Ragone Calvo et Burreson, 2000; Bishop et Hooper, 2005).

Concerning adults of *C. gigas*, Brown et Hartwick, 1988 showed that environmental differences of food-related variables (particulate organic matter, carotenoid concentration, chlorophyll a and b concentrations), water salinity and temperature have a significant influence on shell height growth curves. Sarà and Mazzola, 1997 also mentioned, a relationship between the quality and quantity of available food (labile POM) and the growth (shell length and dry weight) of animals cultured on long lines linked to artificial reefs. An effect of food composition on growth [energy (J) and weight (g)] was also mentioned by Hyun et al., 2001. According to Costil et al., 2005, shell and soft tissue growth could also be influenced by river inputs (quantity and/or quality of trophic resources, temperature and to a lesser extent, dissolved oxygen, chlorophyll *a* and suspended matter). Without incriminating a potential causative factor, Pogoda et al., 2011 showed, in 2011, that offshore environmental conditions promote oyster's mean growth rates (shell length and dry mass) comparable to those measured of individuals from nearshore coastal areas. Later on, Villanueva Fonseca et al., 2017 noticed different growth rates (shell length and body weight) for oysters dispatched in 3 American lagoons; they hypothesized an influence of environmental factors such as water temperature, currents, tides, phytoplankton diversity and abundance, particulate organic matter, depth and cultivation method, among others. In 2018, the work of Dong et al., 2018 also supported the idea of an influence of the temperature on *C. gigas* shell growth. A Dynamic Energy Budget (DEB) model has also been adapted to *C gigas*, notably to describe the dynamics of its growth when reared under various environmental conditions (Pouvreau et al., 2006).

In juveniles, most of the scarce papers published so far about growth of *C. gigas* rather consider this character without testing it in different environmental conditions (for instance Losee, 1979; Boudry et al., 2003; Royer et al., 2007, 2008; Tamayo et al., 2014). However, some of them noticed differences of growth rates which could be explained by seasonal environmental variations (Degremont et al., 2005; Royer et al., 2007, 2008). Amongst the papers testing different environmental conditions, Langdon et Waldock, 1981 demonstrated that growth (dry weight) of 1- to 3-week-old juvenile was best on a mixture of *C. calcitrans* and *T. suecica,* followed by *C. calcitrans, T. suecica, P. lutheri and D. tertiolecta*. An influence of food

composition was also highlighted by Flores-Vergara et al., 2004, who showed that shell length of 3mm-juveniles was significantly longer when they were fed with *Isochrysis sp.-Pavlova lutheri* than *Dunaliella tertiolecta* at 23, 26 and 29°C for 8 weeks. The same goes for King et al., 2006 about juveniles with a shell length of 10-12 mm, put on the field on 2 different locations in Wales. For these authors, differences in the phytoplankton community and hydrodynamics (immersion/emersion) appeared to be the only parameters that might cause differences of growth rate (assessed by dry weight and condition index).

An efficient monitoring and some models of the oyster's environment and growth in Normandy

The Phytoplankton and Phycotoxin Monitoring Network (REPHY) and the Shoreline Observation Service (SOMLIT) have been collecting seawater data, both bi-monthly and the SOMLIT also on a daily basis, respectively since the 1980s and 1990s (*https://www.somlit.fr/*). In Normandy, this monitoring is made along the coasts of Cotentin (North, East and West), Bessin, Nacre, Bay of Seine and Caux. Some hydrodynamic models have also been proposed for the Bay des Veys (Grangeré et al., 2009, 2010), a region of the West coast of Cotentin well known for the rapid growth of oysters. Moreover, in order to generate data at a higher frequency (every hour), a validated 3D hydrodynamic Model for Applications at Regional Scale [MARS-3D, (Lazure et Dumas, 2008)] coupled with a biogeochemical model (ECOMARS-3D; fully described by Ménesguen et al., 2019) was also developed for the Manche-Gascogne area. Different national networks operated by Ifremer (REMORA, RESCO and ECOSCOPA) have also been collecting data about Pacific oysters (mortality, growth and quality) since the early 1990s. In Normandy, this monitoring is made on 19 stations including *Grandcamp, Géfosse, Utah Beach, La Tocquaise, Crasville, Saint Germain sur Ay, Blainville Nord, Lingreville, Chausey Le Lézard and Meuvaines*. Some scarce papers also concern oyster's growth (shell weight or length, wet/dry tissue weight, total weight) in Normandy. In this case, they rather concern animals raised in Géfosse, sometimes juveniles (Costil et al., 2005; Degremont et al., 2005; Royer et al., 2007, 2008) and rarely triploid ones (Goulletquer et Heral, 1996). A DEB model of *C. gigas* growth in Normandy is also currently under development (Gangnery, personal communication).

Concerning now triploid *C. gigas* oysters, their growth, like that of the diploids, partially depend on the environmental conditions, although and individual variability can exist (Goulletquer et Heral, 1996). The scarce papers currently available dealing with triploid growth rather focus on differences between 2n and 3n than parameters affecting growth of triploids (for review see (Wadsworth et al., 2019a). However, Villanueva Fonseca et al., 2017, for instance, also

mentioned that environment variables can influence growth rate to a much greater extent than oyster ploidy.

In the present work, growth of diploid and triploid hatchery produced-juveniles (T10) was studied on two different sites in Normandy, Cricqueville-en-Bessin and Géfosse. For this purpose, water salinity, temperature and food concentration (Chlorophyll a concentration) were assessed by extracting data of the year 2020 from the ECOMARS-3D model of the Manche-Gascogne area. Shell length and area as well as wet tissue weight were monthly/bi-monthly measured from January to September 2020. These biological parameters were compared between sites, ploidy and sampling times and we also investigated some of their relationships. Finally, based on all these comparisons, the effect of food on growth of juveniles in their 1st year of life and on triploid oysters is discussed.

Materials and Methods

Experimental design and animal sampling

Diploids and triploids juveniles were purchased from a commercial hatchery (Vendée Naissain, France). The initial mean weight was 0.147±0.091g for diploid and 0.475±0.226g for triploid. At the reception, 30 individuals were immediately randomly sampled for each ploidy and the rest breaded into mesh bags and disposed on off-bottom iron tables on two experimental sites, the concession of the University of Caen Normandy (Cricqueville en Bessin, Lat. 49.394 Long. -1.022, Normandy, France without commercial activities) and the concession of the IFREMER (Géfosse, Lat. 49.389 Long. -1.099, placed in commercial zone of oyster culture) (supplementary data 1). Animals of each site were randomly sampled 11 times from January to September 2019, every 15 days or monthly (dates of sampling were noticed in all figures).

Environmental parameters extraction

Data on water temperature, salinity and primary production for the bottom or the total water column of locations were extracted from the ECO-MARS3D model (Modeling and Analysis of Coastal Research; www.umr-lops.org/marc), with a grid of 4 kilometres and the two sites are located in two distinct grids of the model. This model permits to appreciate the diverse hydrodynamic parameters as the temperature and the salinity, and also a global nutrient level.

Morphometric measurements

At each sampling and each animal, the flat slide of the shell was photographed to determine the maximal length (anterio-posterior axis) and maximal area, using Image J software. After that, the wet meat of each animal was weighted. Then, a piece of gonad was sampled for the gametogenesis stage determination.

Histology and gametogenetic stages determination

Transverse section of gonadal piece was fixed in Davidson's solution (glycerol 10%, formaldehyde 20%, ethanol 30%, acetic acid 10% and 30% sterile seawater). After fixation, samples were dehydrated and embedded in paraffin wax. Three micrometer sections were stained in Prenant-Gabe trichrome solution (Gabe, 1968). Sex, gametogenetic stages were defined according to Berthelin et al., 2001 and Franco et al., 2008 and the blocked (named beta) and unblocked (alpha) sexual stages of 3n determined from Jouaux et al., 2010.

Statistical analysis

The weight, length and area were plotted on graphs with GraphPad Prism 4 with means ± standard deviations (SD). All statistical tests were made with GraphPad Instat. To compare the biological parameters between ploidy and sites, a statistical analysis using Tukey's multiple comparison post-hoc test was performed (p-value<0.05). The correlations between weight, length and area were evaluated using the Pearson's Correlation (assuming a Gaussian distribution for significance) and reported by the coefficient of determination (squared R or R^2), and the dispersion of values was evaluated by the determination of the equation of Mayer.

Results

Physical parameters and productivity characterization

For this study, two sites have been chosen, justifying by their geographic location (supplementary data 1) and their distinct biotic and abiotic characteristics. Geomorphological and hydrodynamic characteristics of the study area were well documented in the fascicule on “Dynamics and evolution of the French North coastline” (Maquaire et al., 2019). Located in the Bay of Veys, an estuarine bay, the site of Géfosse (east coast of the bay) is turbid aera with a sandy substrate and is influenced by four important coastal rivers with a high current velocity of $40 m^3.sec^{-1}$ (Passy et al., 2016; Ubertini et al., 2012; Gangnery et al., 2019). The Bay of Veys is an important area of shellfish production, mainly cupped oysters on the eastern coast of the

bay (Géfosse) and exclusively blue mussels on the west coast (Utah beach). The site of Cricqueville is located on a rocky plateau, which receive a low current velocity of the river Le Véret (below to $0.5m^3.sec^{-1}$) and with no aquaculture activities. If these sites were separated by 5 kilometres, they differ by numerous biotic and abiotic parameters. To follow the environmental (temperature, salinity) and biotic (production of chlorophyll a) parameters have been extracted from the data of ECO-MARS3D model during January to September 2019 corresponding to the duration of the experiment. The mesh of the model was 2.5km x 2.5km, permitting to distinguish the sites and at each mesh, the depth was subdivided on 30 levels. Only the first level corresponding to the bottom and the mean were collected. This model has been validated several times, especially in the Channel and also for the Bay of Veys. To ensure to track the environmental data, multiparametric probes have not been deployed on each site. Indeed. The sites are on an unmonitored area, preferring the use of MARS3D model.

For temperature, mean value or at the level 1 were exactly similar, regardless to the location and time. Then, weekly mean temperature of bottom was only studied during January to September, due to the positioning of the oysters near to the ground (Figure 1; daily temperature of bottom illustrated in supplementary data S2A). During the winter, the temperature decreases and is more broadly stable during the end of winter to the beginning of spring (around 9.1±0.58°C at Cricqueville and 8.51±0.9°C at Géfosse) and later during the summer (respectively, 18.2±0.36 and 18.81±0.5°C to Cricqueville and Géfosse). The elevation takes place essentially during the spring and the beginning of the summer. By comparing the sites, two inversed periods were distinguished, a first with higher temperature during the summer at Géfosse and conversely at Cricqueville during the winter. During the same time, the weekly mean salinity was followed (Figure 2; daily salinity in supplementary data S2B) and no obvious difference was observed between the mean salinity and at bottom (data not shown), highly homologous at Géfosse, slightly superior at the bottom for Cricqueville. It was yearly steady at Cricqueville, 34.34±0.18PSU (min. 33.96PSU; max. 34.77PSU). The salinity is less at Géfosse than Cricqueville (30.49±1.05PSU (min. 27.41PSU; max. 31.98PSU), with a difference between the sites of 3.85±1.01PSU. As mentioned and more specifically at Géfosse, this difference was connected to the inflow of freshwater from the rivers in the Bay of Veys (see supplementary data S2B). Similar profiles of temperature and salinity were commonly observed as during the year 2000 by Costil et al., 2005 at Géfosse. And then, the salinity of Géfosse oscillated with the tidal variation. The site of Cricqueville was less influenced by the inflow of freshwater, due to the low velocity of river.

The mean primary production extrapolated by the global measurement of chlorophyll a (Passy et al., 2016) (data extracted from ECO-MARS3D) and weekly reported shows an annual similar profile between the two sites (Figure 3, daily temperature in supplementary data S2C). The daily concentration near to the ground is essentially superior for Géfosse, with a mean positive variation of 0.65±0.48µg.L^{-1}. At Géfosse, the concentration at the surface is very high similar that the bottom, even overlapped (data not shown). For Cricqueville, both concentrations are also overlapped until the end of May, and after the production is little more at the surface (data not shown). The profiles of chlorophyll a are jerky with a frequency of two weeks, more marked at Géfosse. The superposition of the chlorophyll biomass with the frequencies of tides reveals a succession of peaks (see supplementary data S2C). They follow the same frequency with the tides, with few exceptions with an increase of the production of chlorophyll before the high tide (a delay of 1 or 2 days). A major period of production of chlorophyll a for the two sites, from April to May, shows a highly increase with a maximum production at the end of April. After, it decreases to reach an intermediate concentration between those of the winter and the summer/autumn. This peak seems to begin with the increase of temperature during the spring. Grangeré et al., 2010 exhibits a similar temporal variation of chlorophyll a in the Bay des Veys during the year 2002, with a major peak at the end of the spring, which continue during the summer. In Ubertini et al., 2012 the eastern zone of the Bay des Veys, where is located the site of Géfosse, is characterized by a high level of total chlorophyll a during the spring and the summer, especially a majority provided from microphytobenthos during the summer. In spring, the major concentration of chlorophyll a comes essentially from the pelagic compartment. Then, the variation of primary production between the two sites can allow that Géfosse is a hypertrophic site than Cricqueville, with the end year's report superior to 1.5. Generally, some of studies demonstrated that the turbid estuarine zone is highly productive ecosystems (Ducrotoy et al., 2000; Ubertini et al., 2012).

Animal growth evolution of at the two sites

To estimate the effect of sites and ploidy on the growth of oysters, morphometric parameters were measured at each date of sampling during January to September 2019. For diploid and triploid animal, maximal length and aera of the shell and the wet weight of shelled animal were relieved. The choice of the wet weight is justified by the necessity of tissue's sampling for future experiments and some studies show that the dry and wet weight are highly correlated (for example Costil et al., 2005 in the same location and similar period of sampling). Thereafter, only the wet weight is discussed to follow the growth. Indeed, both length and area parameters

are highly correlated on all counts (r^2=0.9235) (supplementary data 3) and the weight is strongly interlinked with them (r^2=0.6833 and 0.7821 respectively with length and area) (supplementary data 4 and 5). The weight has then plotted according to the dates of sampling, sites and ploidy (Figures 4 and 5). The length and area of shell show a similar profile of growth, but less pronounced. The weight shows a gradually increasing in both sites and ploidy from winter to the end of spring, followed by a quickly rising during July (more slowly in Cricqueville) and afterwards a slowdown at the end of summer and the early part of autumn. Whether the ploidy and the sites, the growth really starts begin from June (supplementary data 6). Then, a clearly difference of growth was observed according to sites and ploidy, respectively in favour to Géfosse and triploid.

Comparing the site, at Géfosse (Figure 4), the growth was significantly higher at the beginning of summer and subsequently amplified until September, whatever diploid and triploid. For Cricqueville, the increased growth is lower than at Géfosse and progressive, indeed flatten at the end of summer. Previously, the difference of growth between the sites is perceptible from April for diploid oysters, more lately in June for triploids. This slight growth seems to be concomitant with the increase of temperature and the high peak of chlorophyll in April (see figure 3). During this period, the temperature of Cricqueville and the food are less than Géfosse, which explain the difference of growth. Later, the significant high growth at the summer can be linked at the second increase of chlorophyll a (Figure 3). Also, the growth appears to be connected with the progressive increasing of the temperature until at the middle of summer and then the stagnation of weight follows the evolution of temperature. For salinity, it seems not influence the growth, justifying by the euryhalin characteristic of the cupped oysters.

Comparing the ploidy, the effect of sites influences also the growth (Figure 5). The diploid oysters are biggest at Géfosse since April, and more from July to September. Triploid animals display similar profile, in April and amplifying as from August. Triploid oysters show a greater growth towards the diploids at Géfosse, with two times superior. At Cricqueville, the growth is not pronounced between the two ploidies. From the end of August, we note a stagnation of the growth for the diploid animals at Géfosse. For triploid, for the same period, the growth carries out to increase, but with a slight slowdown. The arrest of growth for the diploids could be explained by the spawn of female and male since the August, instead of triploid, here the gonad begins to regressed from September (data not shown). At Cricqueville, the animals grown more slightly, with a progression for the diploid until September. From the end of August, the weight of triploid oysters drops significantly. As at Géfosse, the female and male gonad of triploid

regresses, but earlier from middle of July. The fact that the weight of diploid does not drop at the same period could be correlated by later spawn, from end of August (data not shown).

Discussion and conclusion

The purpose of this study was to compare the incident of abiotic and biotic environmental factors the growth of diploid and triploid cupped oysters on two sites. The choice of the two, although very close, is based on their environmental conditions (geomorphic, temperature, salinity, primary production of chlorophyll). For these parameters, two sites present some, but less, differences. Globally, Géfosse, located in the Bay des Veys, exhibits temperature more elevated. But more importantly, a daily concentration of chlorophyll always superior to Cricqueville. As observed by Costil et al., 2005, Géfosse could be considered as a hypetrophic area. Cricqueville shows a weekly salinity more superior than Géfosse (around a difference of the 4 PSU), explained by the variations of the flow of fresh waters from the rivers in the Bay des Veys. In comparison of diploid oysters, triploid animals exhibit a greater growth whatever the site. Effectively, some previous studies described a faster growth of triploid oysters (Allen et Downing, 1986; Nell, 2002; Normand et al., 2009). But the influence of the biotic and abiotic seems to be different between the two sites. At Géfosse, the high growth could be associated to the chlorophyll production and temperature, instead of Cricqueville where the salinity appears to be more involved. Indeed, numerous ecological works have been demonstrated that the environmental factors as the available food, salinity or temperature play a major role on the growth and the survival of the oysters (Garnier-Géré et al., 2002; Vialova, 2020; Villanueva Fonseca et al., 2017; Wadsworth et al., 2019a). Villanueva Fonseca et al., 2017 explain a difference of growth between triploid and diploid Pacific cupped oysters by the involvement of temperature, tides and the phytoplankton availability on three distinct Mexican sites. For the diploid American oyster *Crassostrea virginica*, similar observations of the environmental factors in experimental and field studies were well documented in the review of Rybovich, 2014. However, Wang et al., 2018 demonstrated in greatly influence of salinity and temperature on *Crassostrea nippona*, but with exposition of high variations of these two parameters. But, actually, few studies of the influence of the field biotic and abiotic factors on the triploid oysters. In this present work, in comparison with diploid oysters, the triploid oysters exhibit a difference of growth between the two sites, highly at Géfosse instead of Cricqueville. Then, it seems to demonstrated an involvement of the distinct sites, and more specially the trophic factor. This study highlights also the seasonal growth of the animals is influenced by the gametogenesis. Indeed, the evolution of the gonad occupation will be integrated on the growth factor, especially

during the spawning at the end of summer. Normand et al., 2009 observe that the gonad occupation in diploid but also in triploid oysters are not negligible, despite the lower reproductive effort of triploids. Same authors and also Wadsworth et al., 2019 compilating the results of 29 previous studies show, in addition of the influence of the environmental parameters, that the ploidy presents an advantage on the growth in favour the triploid animals and associated obtention methods (mainly the 4nx2n crosses instead of chemical induction).

To conclude, this work demonstrates the impact of the biotic (primary production of phytoplankton) and abiotic (temperature, salinity) factors on field distinct sites on the growth of the Pacific cupped oysters. Especially, the influence is in favour on triploid oysters than diploid. To be sure, the influence of these different parameters needs to be validated under controlled conditions or in more contrasted locations, while integrating the strong genetic heterogeneity of the oysters.

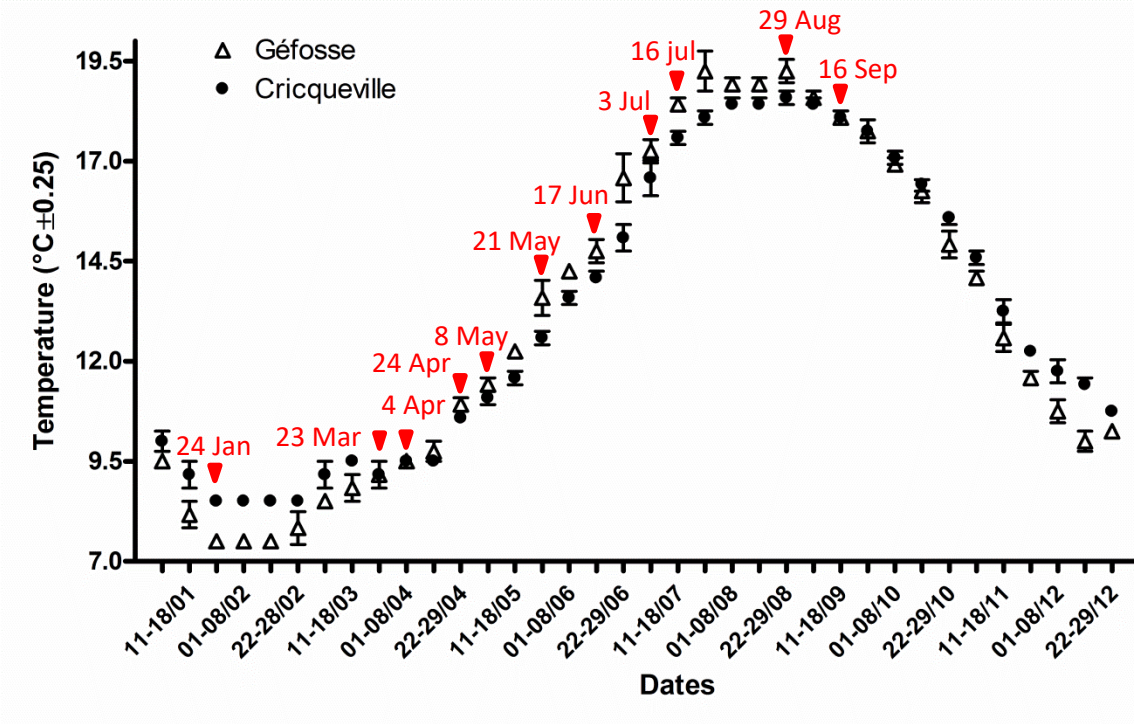


Figure 1: Annual evolution of weekly temperature (°C) (means±SEM of 6-7 days) on Géfosse (empty triangle) and Cricqueville (solid circle) from January to December 2019 (data extracted from the ECO-MARS3D model).

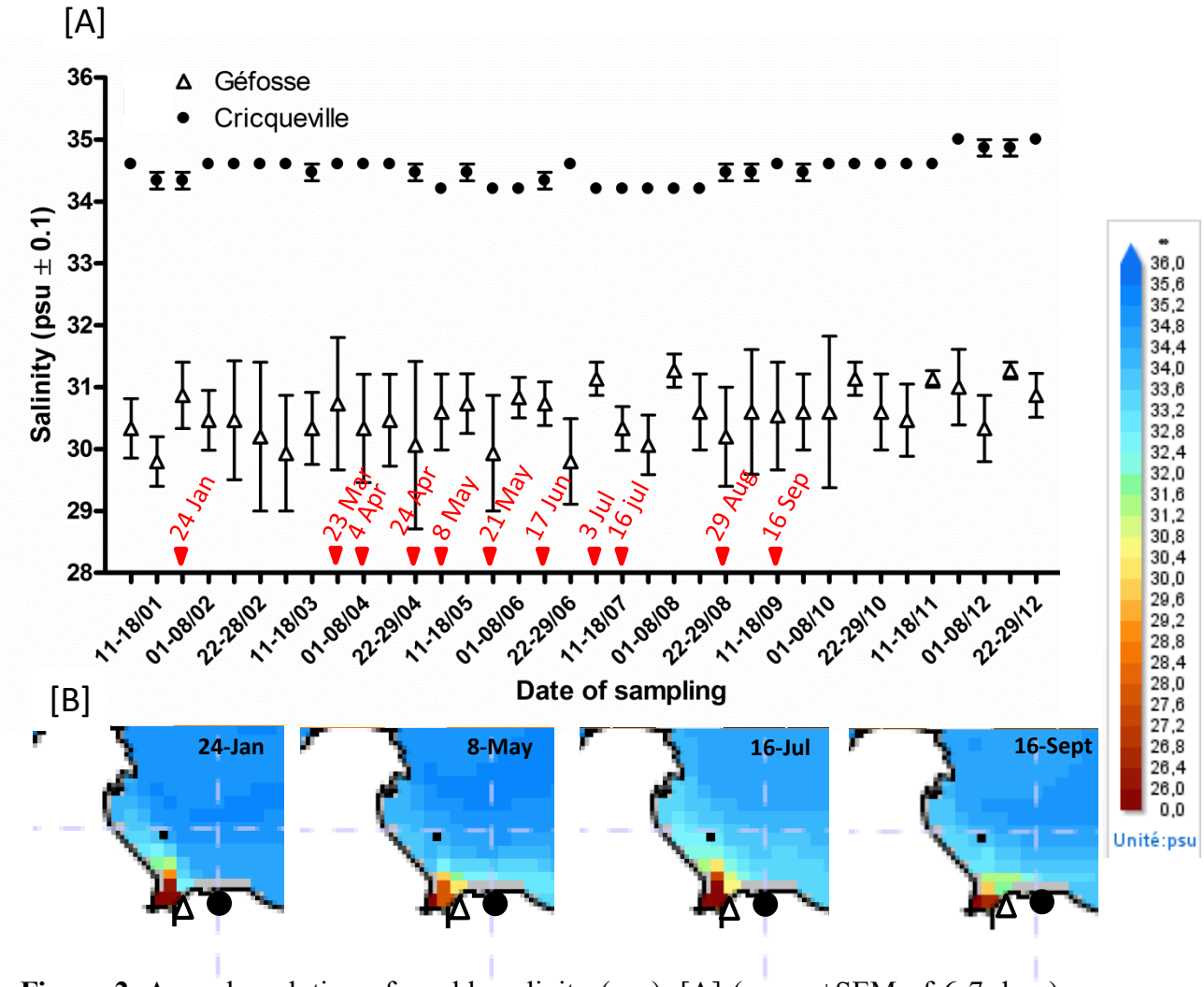


Figure 2: Annual evolution of weekly salinity (psu). [A] (means±SEM of 6-7 days) on Géfosse (empty triangle) and Cricqueville (solid circle) from January to December 2019. [B] Examples of gradient of temperature at four dates (data extracted from the ECO-MARS3D model).

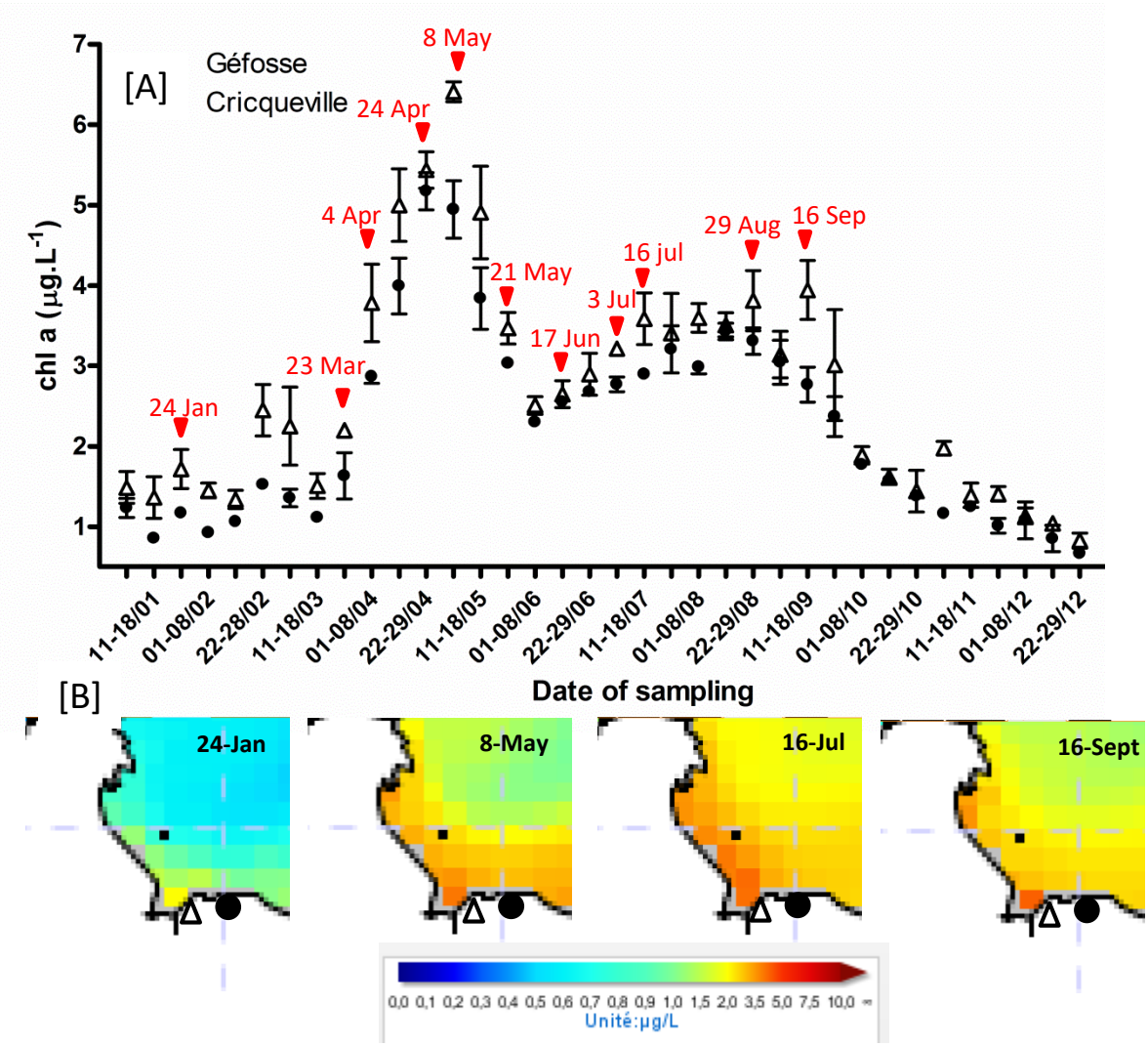


Figure 3: Annual evolution of weekly primary production (total measurement of chlorophyll a) (µg/L^{-1}). [A] (means±SEM of 6-7 days) on Géfosse (empty triangle) and Cricqueville (solid circle) from January to December 2019. [B] Examples of gradient of chlorophyll a at four dates (data extracted from the ECO-MARS3D model).

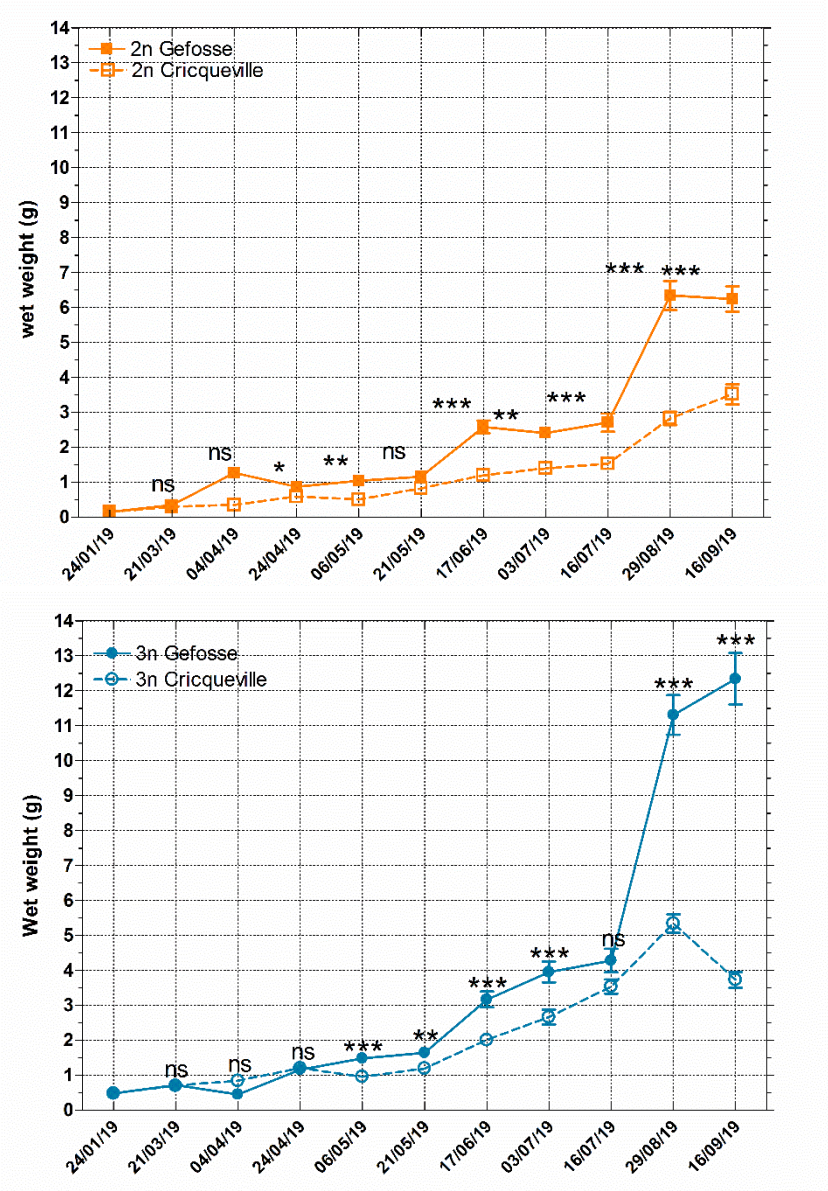


Figure 4: Evolution of wet weight (g) of diploid (up) (square) and triploid animals (down) (circle) (means±SEM) located on Géfosse (solid symbol) and Cricqueville (empty symbol) from january to september. (Tukey's test for a p-value<0.05 at each date of sampling). The asteriks indicate a significant difference (* at p<0.05; ** at p<0.01 and *** at p<0.001).

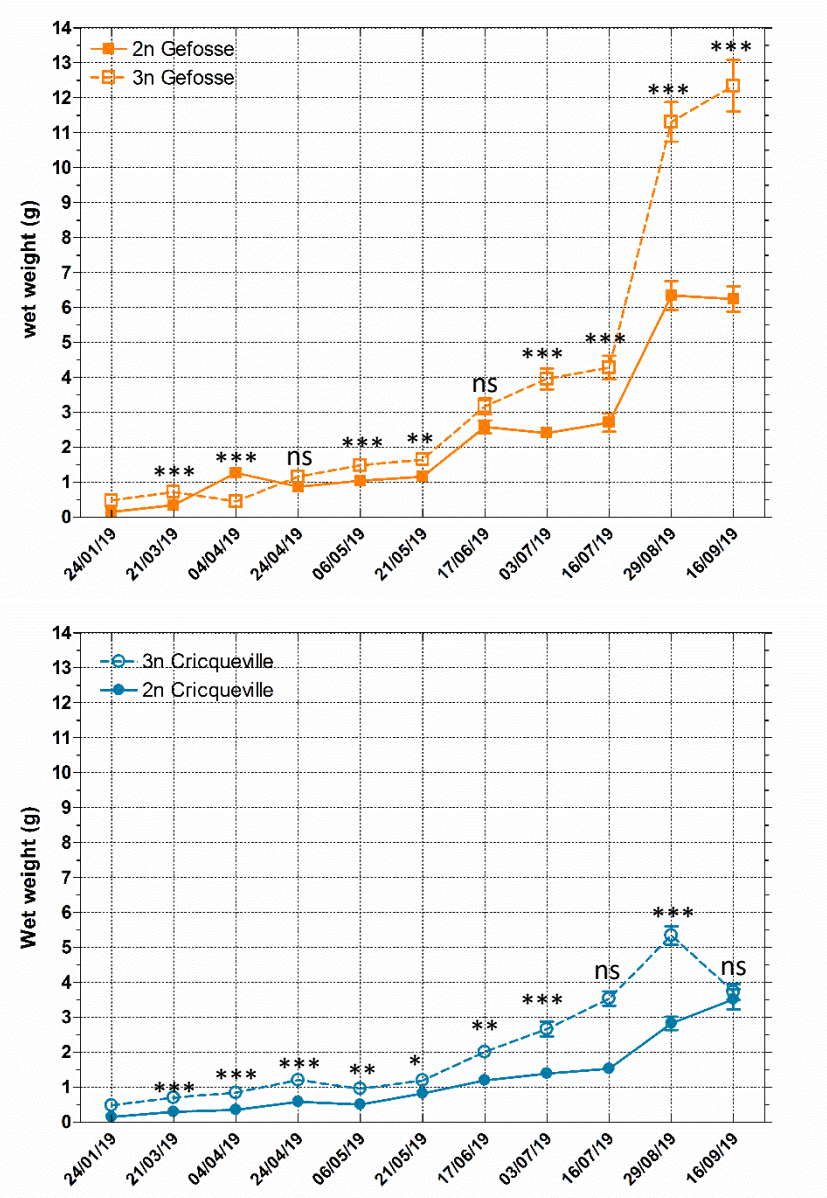
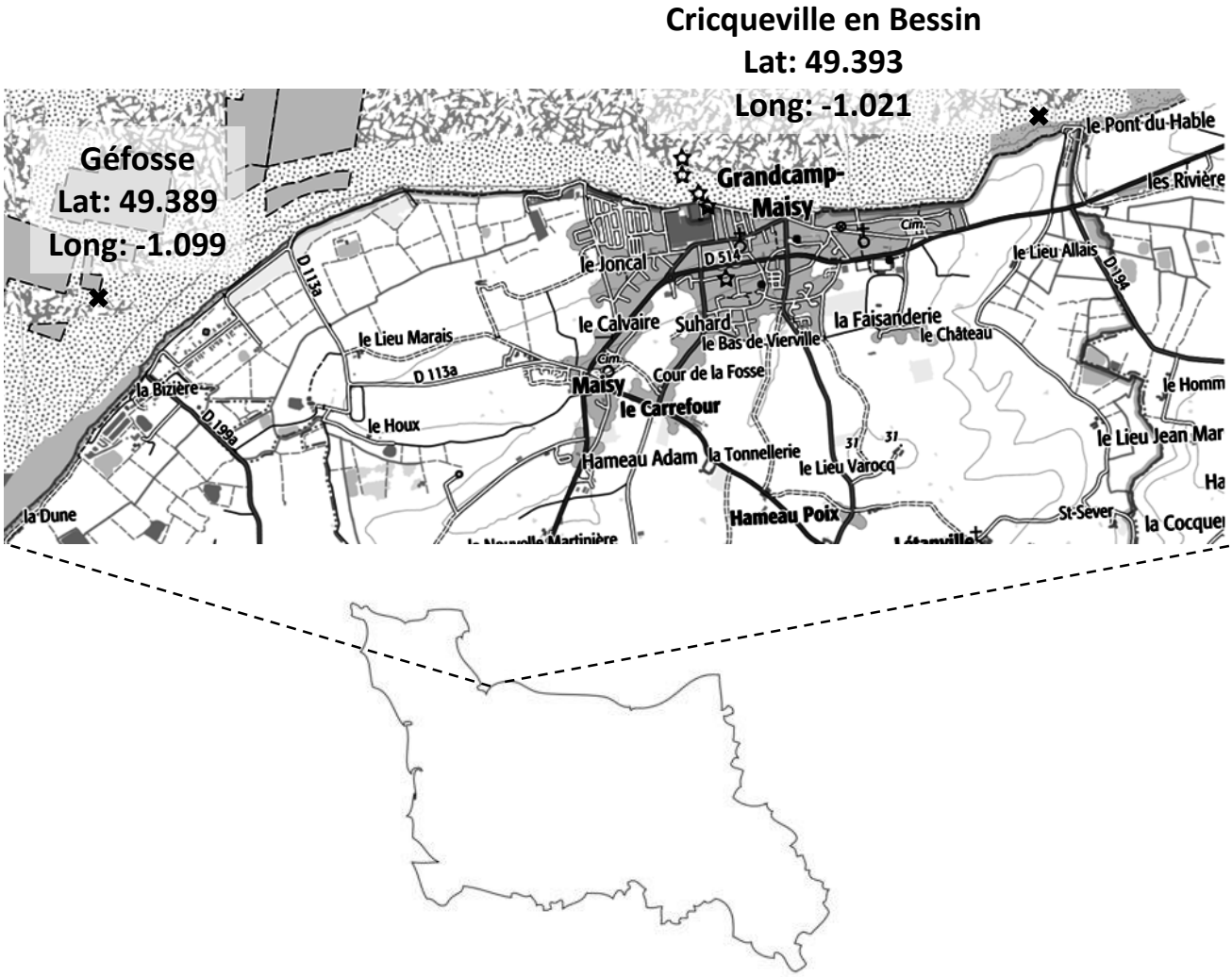
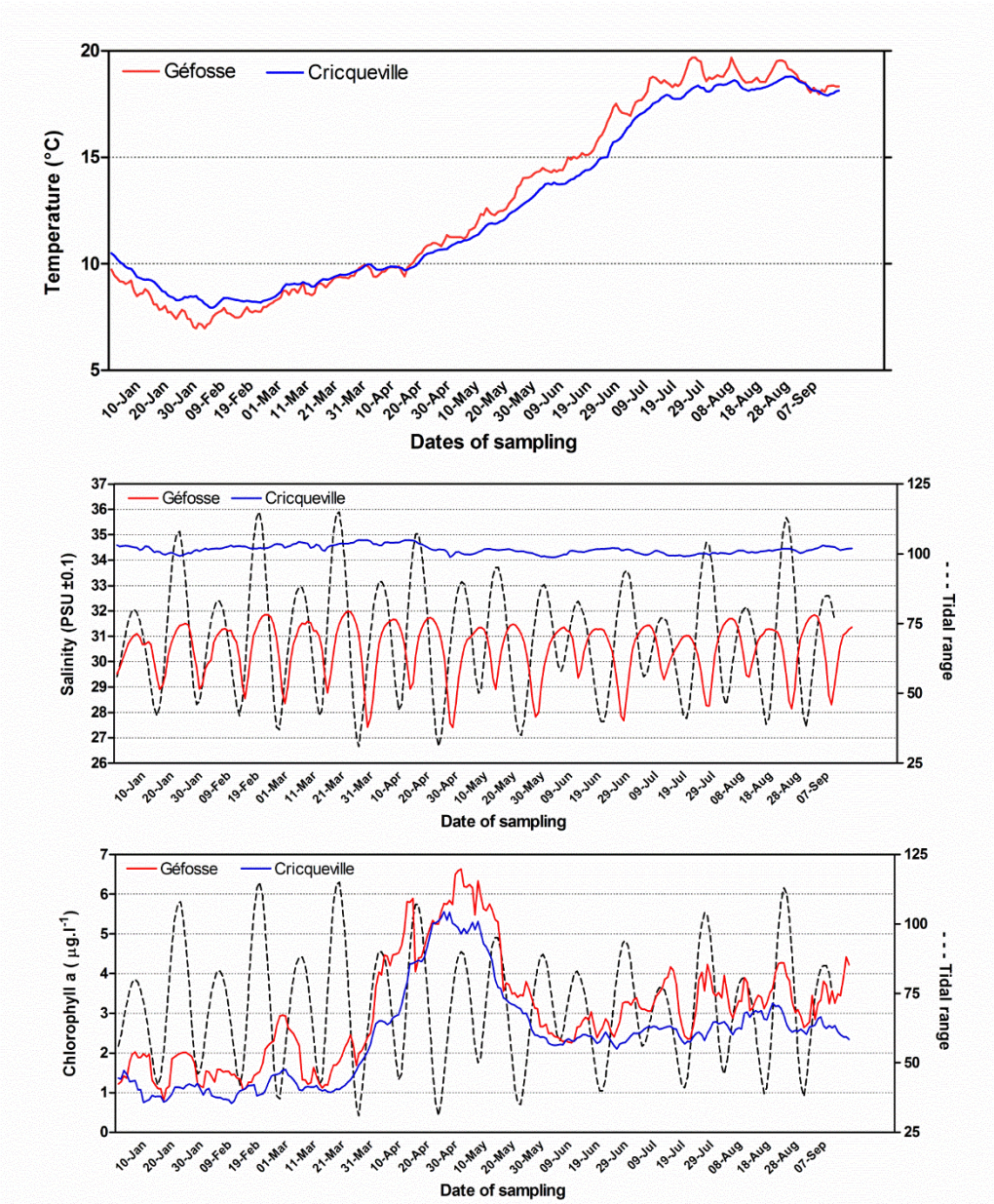


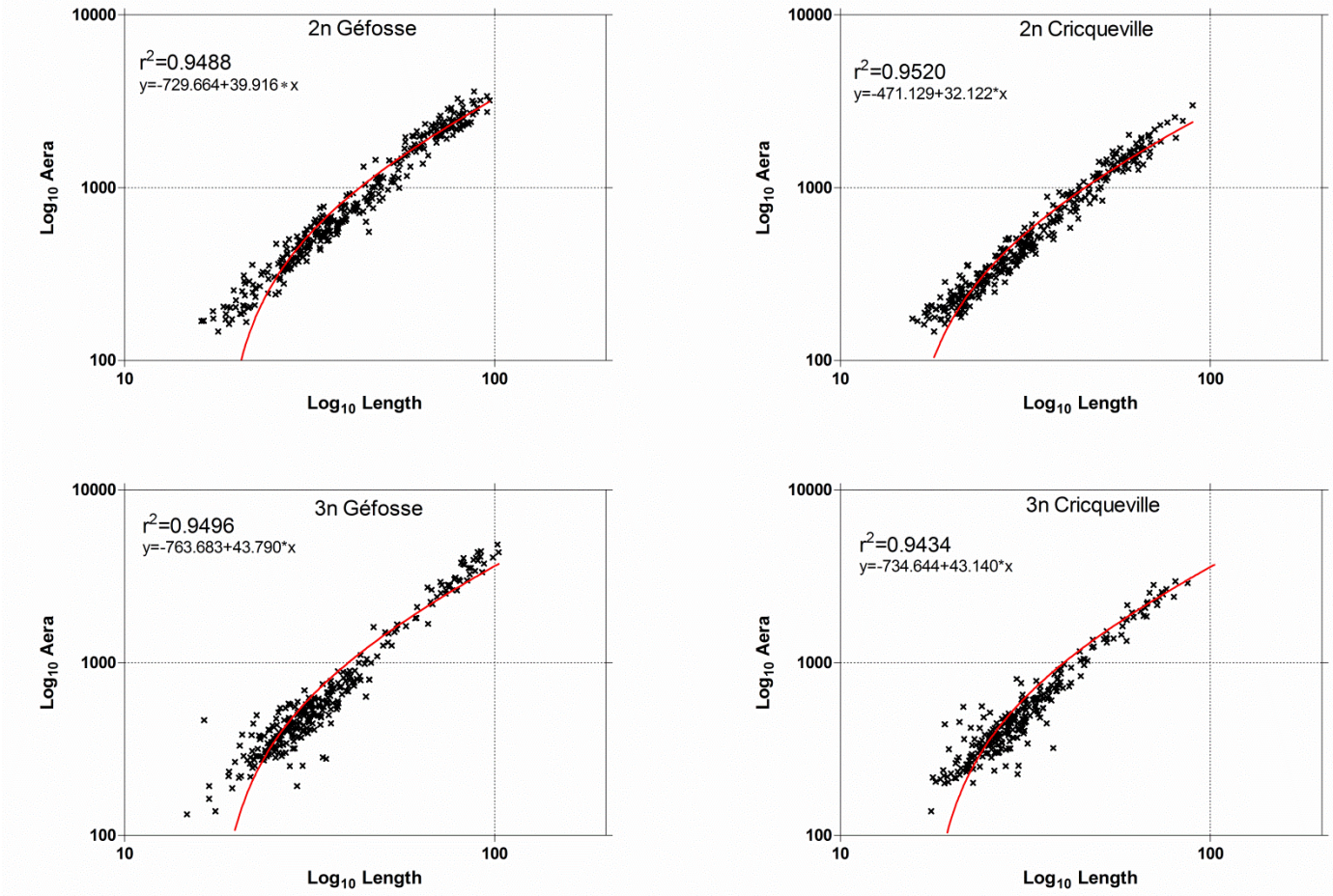
Figure 5: Evolution of wet weight (g) on Géfosse (up) (square) and Cricqueville (down) (circle) (means±SEM) for diploid (solid symbol) and triploid animals (empty symbol) from january to september. (Tukey's test for a p-value<0.05 at each date of sampling). The asteriks indicate a significant difference (* at p<0.05; ** at p<0.01 and *** at p<0.001).



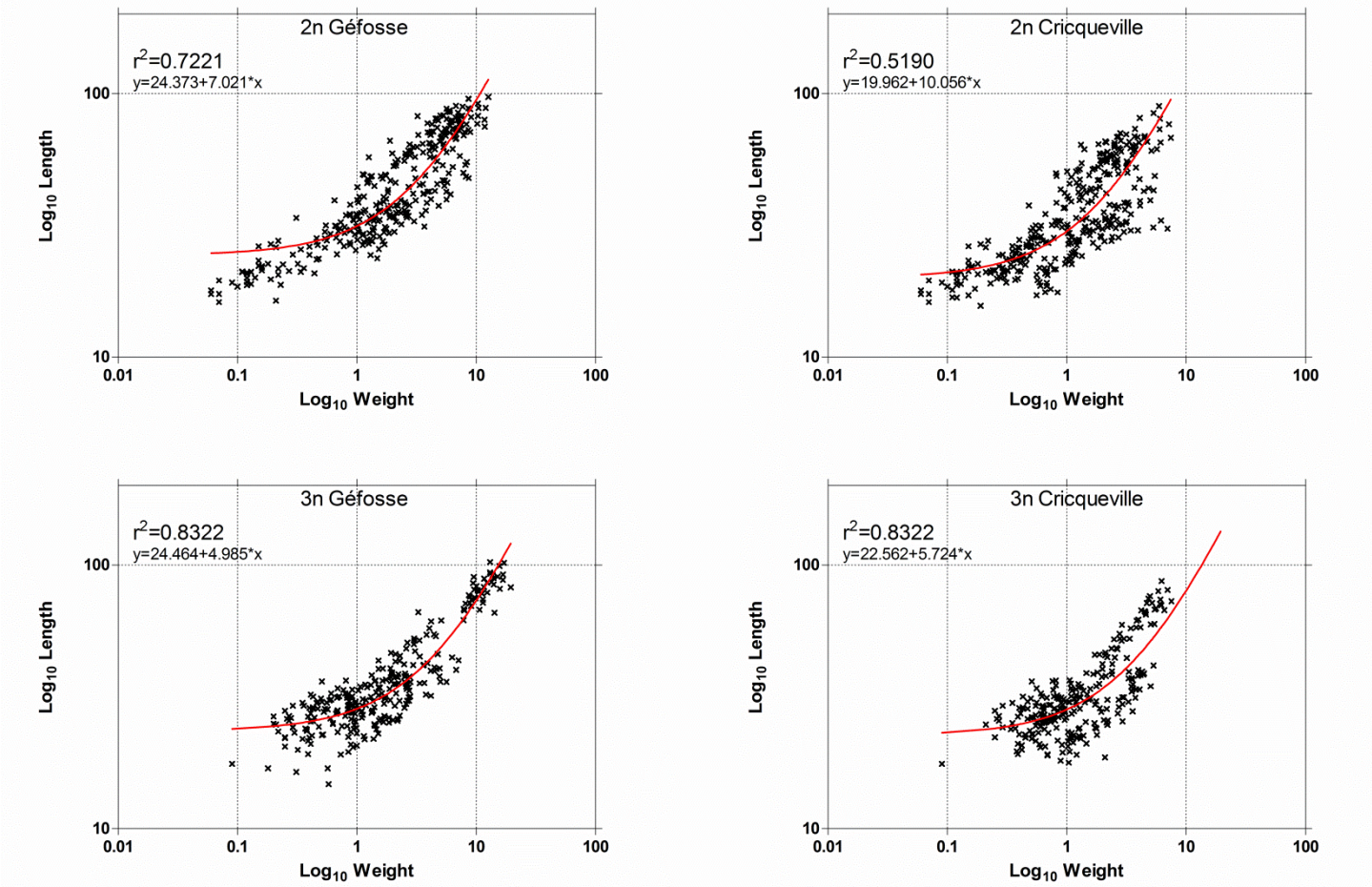
Supplementary data 1: Geographical localization of the two experimental sites in Normandy, Cricqueville en Bessin (experimental concession of the University of Caen Normandy) and Géfosse (experimental concession of the IFREMER, located in Bay of Veys)



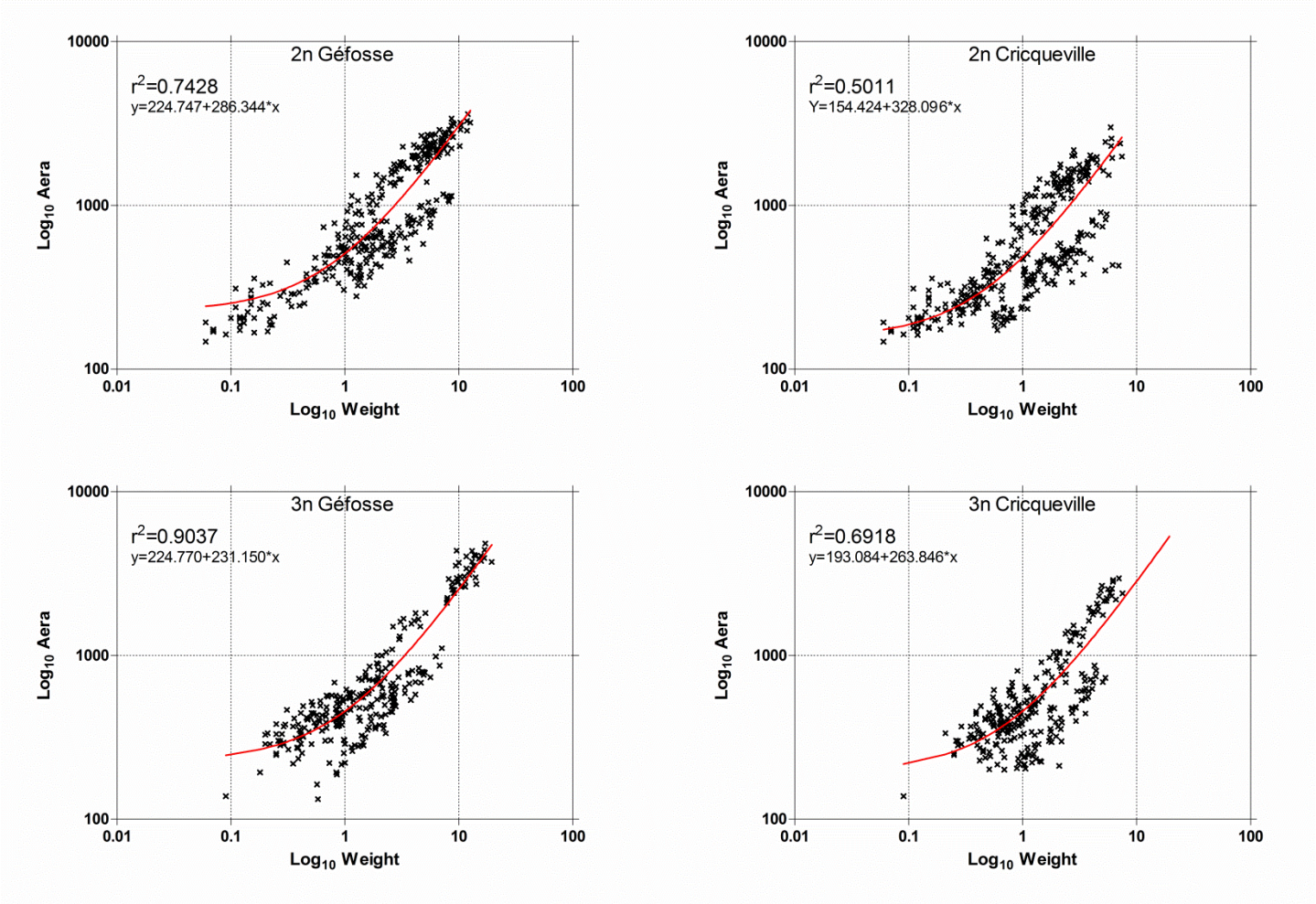
Supplementary data 2: Daily temperature (°C) (A), salinity (B) and primary production ($\mu g.L^{-1}$) (C) (estimated by chlorophyll a concentration) in function of the tidal range at bottom on Géfosse (red solid line) and Cricqueville (blue solid line) from January to September 2019 (data extracted from the ECO-MARS3D model).



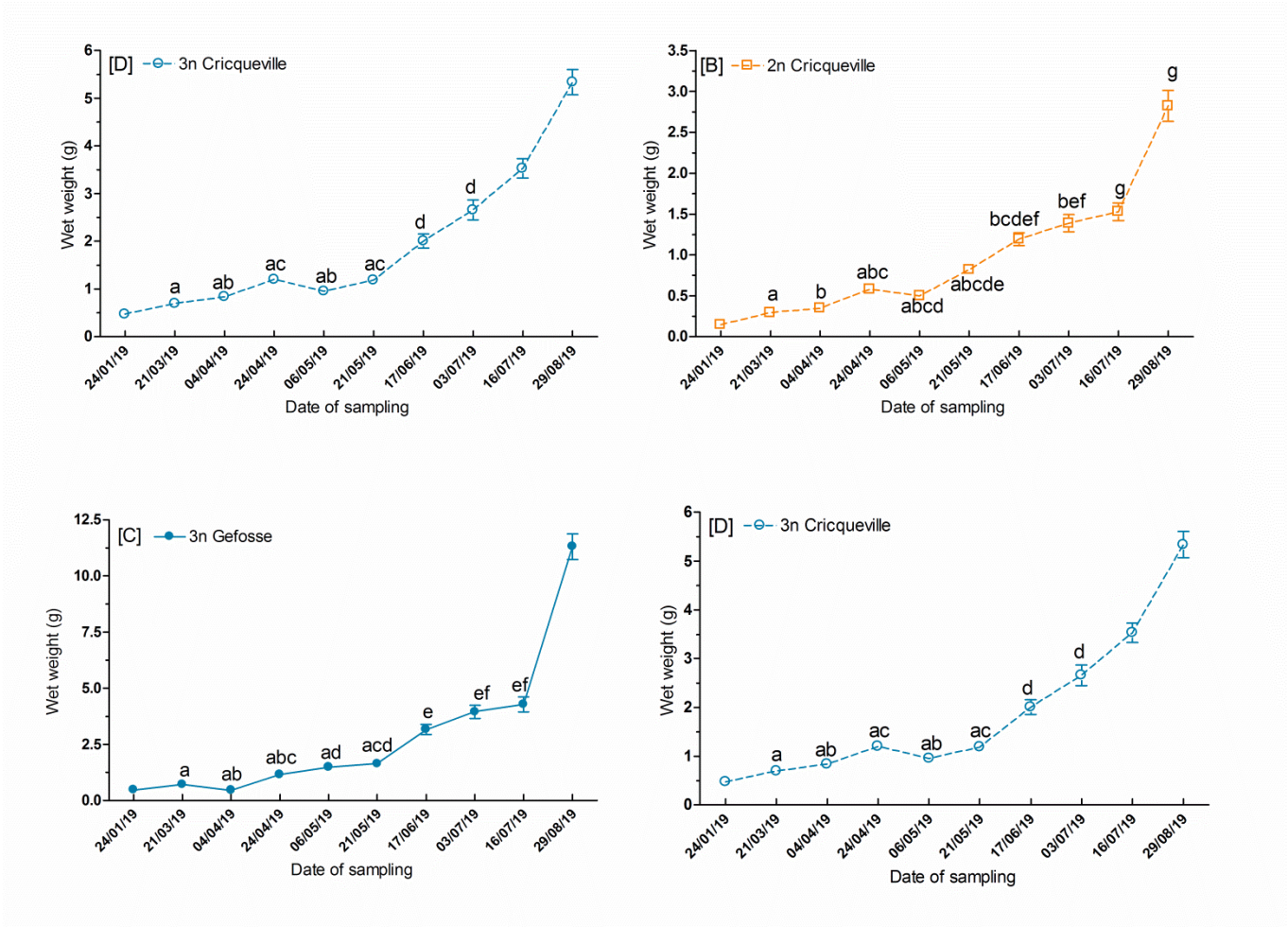
Supplementary data 3: Linear regression of Log10 transformed values between Aera vs Length for diploid (up) and triploid animals (down) on Géfosse (Left) and Cricqueville (Right). The coefficient of determination was calculated from the same set by a Pearson's test and was reported R^2. The solid red line corresponds to the adjustment of the points (equation of Mayer).



Supplementary data 4: Linear regression of Log10 transformed values between Length vs Weight for diploid (up) and triploid animals (down) on Géfosse (Left) and Cricqueville (Right). The coefficient of determination was calculated from the same set by a Pearson's test and was reported R^2. The solid red line corresponds to the adjustment of the points (equation of Mayer).



Supplementary data 5: Linear regression of Log10 transformed values between Aera vs Weight for diploid (up) and triploid animals (down) on Géfosse (Left) and Cricqueville (Right). The coefficient of determination was calculated from the same set by a Pearsons's test and was reported R^2. The solid red line corresponds to the adjustment of the points (equation of Mayer).



Supplementary data 6: Evolution of wet weight (g) of diploid (A and B) (square) and triploid animals (C and D) (circle) (means±SEM) located on Géfosse (A and C) (solid symbol) and Cricqueville (B and D) (empty symbol) from january to september. (Tukey's test for a p-value<0.05 at each date of sampling).

References

Allen, and Downing (1990). Hatchery manual for producing triploid oysters: S.K. Allen, S.L. Downing and K.K. Chew. Washington Sea Grant Program, 1989. Price US$8.00, 27 pp., ISBN 0-295-77031-7. Aquaculture *89*, 390.

Allen, S.K., and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *102*, 197–208.

Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., and Kellner, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). Invertebrate Reproduction & Development *40*, 79–86.

Bishop, M.J., and Hooper, P.J. (2005). Flow, stocking density and treatment against Polydora spp.: Influences on nursery growth and mortality of the oysters Crassostrea virginica and C. ariakensis. Aquaculture *246*, 251–261.

Boudry, P., Heurtebise, S., and Lapègue, S. (2003). Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed Crassostrea gigas and Crassostrea angulata specimens: a new oyster species in Hong Kong? Aquaculture *228*, 15–25.

Brown, J.R., and Hartwick, E.B. (1988). Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: I. Absolute and allometric growth. Aquaculture *70*, 231–251.

Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., and Mathieu, M. (2005). Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster Crassostrea gigas in Normandy (France). Helgoland Marine Research *59*, 286.

Degremont, L., Bedier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F., and Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). Aquaculture *249*, 213–229.

Dégremont, L., Bédier, E., and Boudry, P. (2010). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture *299*, 21–29.

Dong, Z., Chen, Y., Ge, H., Li, X., Wu, H., Wang, C., Hu, Z., Wu, Y., Fu, G., Lu, J., et al. (2018). Response of growth and development of the Pacific oyster (Crassostrea gigas) to thermal discharge from a nuclear power plant. BMC Ecol *18*, 31.

Ducrotoy, J.-P., Elliott, M., and de Jonge, V.N. (2000). The North Sea. Marine Pollution Bulletin *41*, 5–23.

Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A.N., and Arredondo-Vega, B.O. (2004). Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg) spat. Aquaculture Research *35*, 1131–1140.

Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaine, P., and Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Mollusca, Bivalvia). Tissue and Cell *40*, 251–260.

Gabe, M. (1968). Techniques histologiques : par M. Gabe, ... (Paris: Masson et Cie).

Gangnery, A., Normand, J., Duval, C., Cugier, P., Grangeré, K., Petton, B., Petton, S., Orvain, F., and Pernet, F. (2019). Connectivities with shellfish farms and channel rivers are associated with mortality risk in oysters. Aquaculture Environment Interactions *11*, 493–506.

Garnier-Géré, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., and Gérard, A. (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster Crassostrea gigas reared in contrasting natural environments. Molecular Ecology *11*, 1499–1514.

Goulletquer, P., and Heral, M. (1996). Etude des potentialités conchylicoles du Pertuis Breton. Proposition d'étude. Suite aux réunions de la commission de contrôle des filières du 6 juin 1995 et du 10 avril 1996.

Grangeré, K., Ménesguen, A., Lefebvre, S., Bacher, C., and Pouvreau, S. (2009). Modelling the influence of environmental factors on the physiological status of the Pacific oyster Crassostrea gigas in an estuarine embayment; The Baie des Veys (France). Journal of Sea Research *62*, 147–158.

Grangeré, K., Lefebvre, S., Bacher, C., Cugier, P., and Ménesguen, A. (2010). Modelling the spatial heterogeneity of ecological processes in an intertidal estuarine bay: dynamic interactions between bivalves and phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. *415*, 141–158.

Grizzle, R.E., Ward, K.M., Peter, C.R., Cantwell, M., Katz, D., and Sullivan, J. (2017). Growth, morphometrics, and nutrient content of farmed eastern oysters, Crassostrea virginica (Gmelin), in New Hampshire, USA. Aquac Res *48*, 1525–1537.

Hyun, K.-H., Pang, I.-C., Klinck, J.M., Choi, K.-S., Lee, J.-B., Powell, E.N., Hofmann, E.E., and Bochenek, E.A. (2001). The effect of food composition on Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg) growth in Korea: a modeling study. Aquaculture *199*, 41–62.

Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., and Kellner, K. (2010). Gametogenic stages in triploid oysters Crassostrea gigas: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *395*, 162–170.

Keppel, G., Gillespie, T.W., Ormerod, P., and Fricker, G.A. (2016). Habitat diversity predicts orchid diversity in the tropical south-west Pacific. Journal of Biogeography *43*, 2332–2342.

King, J.W., Malham, S.K., Skov, M.W., Cotter, E., Latchford, J.W., Culloty, S.C., and Beaumont, A.R. (2006). Growth of Crassostrea gigas spat and juveniles under differing environmental conditions at two sites in Wales. Aquat. Living Resour. *19*, 289–297.

Langdon, C.J., and Waldock, M.J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of Crassostrea gigas Spat. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom *61*, 431–448.

Lazure, P., and Dumas, F. (2008). An external–internal mode coupling for a 3D hydrodynamical model for applications at regional scale (MARS). Advances in Water Resources *31*, 233–250.

Losee, E. (1979). Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (Crassostrea virginica). Aquaculture *16*, 123–126.

Maquaire, O., Roche, A., Kergadallan, X., Cador, J.-M., Cantat, O., Delahaye, D., Laignel, B., Graff, K., Beauvais, F., and Donato, V. (2019). Facteurs hydrodynamiques (Édition Cerema).

Ménesguen, A., Dussauze, M., Dumas, F., Thouvenin, B., Garnier, V., Lecornu, F., and Répécaud, M. (2019). Ecological model of the Bay of Biscay and English Channel shelf for environmental status assessment part 1: Nutrients, phytoplankton and oxygen. Ocean Modelling *133*, 56–78.

Nell, J.A. (2002). Farming triploid oysters. Aquaculture *210*, 69–88.

Normand, J., Le Pennec, M., and Boudry, P. (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquaculture *282*, 124–129.

Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., and Boudry, P. (2009). Reproductive effort and growth in Crassostrea gigas: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquatic Biology *7*, 229–241.

Passy, P., Gendre, R.L., Garnier, J., Cugier, P., Callens, J., Paris, F., Billen, G., Riou, P., and Romero, E. (2016). Eutrophication modelling chain for improved management strategies to prevent algal blooms in the Bay of Seine. Marine Ecology Progress Series *543*, 107–125.

Pernet-Coudrier, B. (2008). Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. phdthesis. Université Paris-Est.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., and Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture *293*, 125–156.

Pogoda, B., Buck, B.H., and Hagen, W. (2011). Growth performance and condition of oysters (Crassostrea gigas and Ostrea edulis) farmed in an offshore environment (North Sea, Germany). Aquaculture *319*, 484–492.

Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., and Alunno-Bruscia, M. (2006). Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, Crassostrea gigas, reared under various environmental conditions. Journal of Sea Research 12.

Ragone Calvo, L., and Burreson, E. (2000). Status of the Major Oyster Diseases in Virginia 1999 A Summary of the Annual Monitoring Program. Reports.

Royer, J., Ropert, M., and Costil, K. (2007). Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the pacific oyster, Crassostrea gigas, in Normandy (France). Journal of Shellfish Research *26*, 973–984.

Royer, J., Seguineau, C., Park, K.-I., Pouvreau, S., Choi, K.-S., and Costil, K. (2008). Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, Crassostrea gigas, reared in Normandy. Aquaculture *277*, 313–320.

Rybovich, M.M. (2014). Growth and mortality of spat, seed, and market-sized oysters (Crassostrea virginica) in low salinities and high temperatures. 71.

Sarà, G., and Mazzola, A. (1997). Effects of trophic and environmental conditions on the growth of Crassostrea gigas in culture. Aquaculture *153*, 81–91.

Tamayo, D., Ibarrola, I., Urrutxurtu, I., and Navarro, E. (2014). Physiological basis of extreme growth rate differences in the spat of oyster (Crassostrea gigas). Mar Biol *161*, 1627–1637.

Ubertini, M., Lefebvre, S., Gangnery, A., Grangeré, K., Gendre, R.L., and Orvain, F. (2012). Spatial Variability of Benthic-Pelagic Coupling in an Estuary Ecosystem: Consequences for Microphytobenthos Resuspension Phenomenon. PLOS ONE *7*, e44155.

Vialova, O.Y. (2020). Comparative morphological analysis of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, farmed in the Black Sea. Turk J Vet Anim Sci *44*, 740–746.

Villanueva Fonseca, B., Villanueva Fonseca, B.P., Gongora Gomez, A.M., Munoz Sevilla, N.P., Dominguez Orozco, A.L., Hernandez Sepulveda, J.A., Garcia Ulloa, M., and Ponce Palafox, J.T. (2017). Growth and economic performance of diploid and triploid Pacific oysters Crassostrea gigas cultivated in three lagoons of the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research *45*, 466–480.

Wadsworth, P., Wilson, A.E., and Walton, W.C. (2019a). A meta-analysis of growth rate in diploid and triploid oysters. Aquaculture *499*, 9–16.

Wadsworth, P., Casas, S., La Peyre, J., and Walton, W. (2019b). Elevated mortalities of triploid eastern oysters cultured off-bottom in northern Gulf of Mexico. Aquaculture *505*, 363–373.

Wang, T., Zhang, J., and Yu, R. (2018). Effects of salinity, stocking density, and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster Crassostrea nippona larvae. Aquaculture International *26*.

IV. Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si les facteurs abiotique et biotique influencent la reproduction des huîtres triploïdes alpha et beta par rapport aux huîtres diploïdes au cours du premier cycle de gamétogénèse sur deux sites distincts, ainsi que leur croissance. L'étude de la gamétogenèse des individus triploïdes a révélé un sex-ratio majoritairement mâle à la fois pour l'échantillonnage réalisé à Cricqueville en 2018 et pour ceux de Cricqueville et Géfosse en 2019. Aucune influence du site et de la ploïdie sur le sex-ratio n'a pu être mise en évidence. Le peu d'études sur le sex-ratio en première année de reproduction chez les huîtres diploïdes sont très controversées, certaines proposant un caractère à tendance protandre suivi d'un changement de sexe en faveur des individus femelles en deuxième et troisième saisons de reproduction (Guo et al., 1998). Mais, les récents travaux de Broquard et al., 2020 semblent infirmer cette hypothèse. En ce qui concerne les huîtres triploïdes, peu d'études se sont intéressées aux variations du sex-ratio. Toutefois une étude a mis en évidence une variation significative du sex-ratio moyen en faveur des huîtres mâles chez les individus triploïdes sur deux sites contrastés d'élevage (tropical et tempéré). En revanche, le troisième site d'élevage (tropical) de cette même étude n'a montré aucune différence significative du sex-ratio entre les individus diploïdes et triploïdes (Ibarra et al., 2017). Au vu du peu de données disponibles, il est donc difficile de conclure sur l'influence des paramètres environnementaux sur le sex-ratio des huîtres triploïdes.

L'évolution du cycle de gamétogenèse des individus diploïdes mâles et femelles sur deux sites distincts a montré un démarrage plus précoce à Cricqueville en 2019. Mais certes, si les animaux de Géfosse ont débuté leur gamétogenèse plus tardivement, une proportion d'animaux matures était supérieure à celle de Cricqueville. Cette maturité plus importante des huîtres diploïdes sur Géfosse semble pouvoir s'expliquer par les températures plus élevées ainsi que les concentrations supérieures en chlorophylle journalière retrouvées à Géfosse pendant toute la durée du cycle. En effet, des études ont montré que la température et la disponibilité en nourriture jouent un rôle central sur la gamétogenèse. Ainsi les faibles températures et le manque de nourriture inhibent la gamétogenèse (Ruiz et al., 1992; Steele et Mulcahy, 1999). La température est considérée comme le facteur principal affectant le développement gonadique et un lien entre l'évolution de la gamétogenèse des individus diploïdes et la température du milieu ambiant a été décrit dans les études suivantes (Chávez-Villalba et al., 2002; Fabioux et al., 2005; Cardoso et al., 2007; Dutertre et al., 2009, 2010; Antonio et Camacho, 2018). Chez

les individus triploïdes, les mâles et les femelles présentent un début de cycle assez proche. En revanche on observe à la fin du cycle des individus mâles majoritairement en stade 2 alors que les individus femelles ont globalement atteint le stade 3 de maturité sexuelle. Ce constat est valable à la fois pour les individus triploïdes alpha et beta sur les deux sites. Il semble que les femelles atteignent leur maturité plus rapidement que les mâles et avec une proportion plus importante. Cependant, il est difficilement de conclure sur ce constat pour différents points. Chez les huîtres triploïdes femelles, un très fort taux d'individus beta est observé (environ 85%) alors que les mâles sont majoritairement des individus alpha (85%) sur les deux sites. Or la classification des stades de gamétogenèse chez les huîtres triploïdes (Jouaux et al., 2010) définit deux catégories d'animaux beta, les beta1 avec un blocage total de la gamétogenèse et les beta2 où sont observés des figures de blocage parmi des cellules germinales engagées dans leur gamétogenèse. Si un effort d'échantillonnage important couplé à une analyse histologique exhaustive a été réalisée sur deux sites, le faible nombre d'animaux triploïdes beta à chaque date de prélèvement n'a pas permis de faire cette distinction, pourtant importante.

L'analyse de l'effort de reproduction entre les individus diploïdes et triploïdes a montré, un effort similaire entre les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et un effort fortement diminué chez les huîtres triploïdes beta sur les deux sites en 2019. Des résultats similaires sur l'effort de reproduction des individus triploïdes alpha et beta au stade 3 (maturité sexuel) ont été décrit par Jouaux et al., 2010. Une étude a également montré que l'effort de reproduction des individus triploïdes été inférieur à l'effort de reproduction des diploïdes quel que soit la méthode d'obtention des individus triploïdes [chimique (CB) ou par croisement (4n x 2n)] (Normand et al., 2009). Au cours de notre étude, l'effort de reproduction des huîtres diploïdes est peu différent au cours du cycle de gamétogenèse entre les sites de Cricqueville et Géfosse, hormis au stade 1. Au stade de prolifération des cellules germinales (stade 1), une tendance plus forte de l'effort de reproduction est observée à Cricqueville par rapport à Géfosse. Les variations des paramètres environnementaux au cours du cycle de gamétogenèse pourraient expliquer ces différences. Dans l'article de ce chapitre, on relève des variations des facteurs environnementaux en 2019 comme une salinité moyenne supérieure à Cricqueville en 2019 et une concentration en chlorophylle a et des températures supérieures tout au long du cycle de gamétogenèse à Géfosse. Peu d'études ont été réalisées sur l'influence de la salinité, notamment sur le terrain et surtout sur des animaux diploïdes. Les travaux de Muranaka et Lannan, 1984 sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* et ceux de Gomes et al., 2014 sur l'huître mexicaine *C. gasar* démontrent une relation négative entre la salinité et la gamétogenèse, mais aussi une

corrélation positive entre la température et la reproduction. Sur les variations en chlorophylle a, un conditionnement alimentaire avec deux lots d'individus (nourrie et à jeun) chez les individus triploïdes alpha et beta, provoque une réduction considérable des prolifération des cellules germinales et une diminution de l'effort de reproduction chez les individus à jeun montrant l'importance de la disponibilité en nourriture pour le bon déroulement de la gamétogenèse (Jouaux et al., 2013). Il a été démontré que les huîtres triploïdes ont un avantage énergétique à des températures élevées, avec des taux de glucides et de protéines significativement supérieurs chez les individus triploïdes par rapport aux individus diploïdes. Cela peut être expliqué par leur effort de reproduction réduit par rapport aux individus diploïdes donnant ainsi un avantage énergétique à des températures stressantes (Shpigel et al., 1992). La température influence donc chez les individus triploïdes à la fois le cycle de gamétogenèse, l'effort de reproduction et la capacité de mise en réserve de l'énergie.

Enfin, dans l'article de ce chapitre, il a été montré que les individus triploïdes présentaient une plus forte croissance par rapport aux individus diploïdes et cela de façon plus importante sur le site de Géfosse qui présente des températures plus élevées ainsi qu'une concentration en chlorophylle supérieure tout au long du cycle de gamétogenèse. Cette forte croissance peut être expliquer à la fois par les conditions environnementales favorables en termes de température et de disponibilité en nourriture mais également par une réallocation énergétique de l'énergie non utilisée pour la reproduction vers la croissance (Garnier-Géré et al., 2002; Villanueva Fonseca et al., 2017; Wadsworth et al., 2019; Vialova, 2020). Deux études montre que la diminution de l'allocation à la reproduction s'accompagne d'une réallocation de l'énergie vers la croissance somatique et la survie entrainant une croissance plus rapide des individus triploïdes (Allen et Downing, 1986; Hawkins et al., 1994). Chez les huîtres triploïdes *Crassostrea gigas*, plusieurs études montrent également que leur croissance peut être influencee par les facteurs environnementaux (Villanueva Fonseca et al., 2017; Wadsworth et al., 2019). Cependant, le peu de travaux sur l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la reproduction est mené à l'échelle du terrain, et plus particulièrement sur les huîtres triploïdes. Une originalité modeste de ce travail a pourtant permis de montrer que la croissance et la reproduction chez les huîtres diploïdes et triploïdes peuvent être influencées par des variations minimes de l'environnement sur deux sites très proches géographiquement.

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier le déroulement de la spermatogenèse chez l'huître triploïde, *Crassostrea gigas* afin de comprendre les mécanismes impliqués dans son altération, se traduisant par deux stratégies distinctes de reproduction chez les individus triploïdes alpha (perturbation de la gamétogenèse) et beta (blocage de la gamétogenèse). Au cours de cette étude, plusieurs approches ont été menées, aux niveaux transcriptomique, protéomique et épigénétique. Une dernière partie de cette étude avait également pour objet de déterminer si les facteurs environnementaux pouvaient participer à l'altération de la gamétogenèse chez les huîtres triploïdes en conditions naturelles. Au cours de cette étude, la gamétogenèse, mais aussi la croissance ont été suivis tout au long d'un cycle de gamétogenèse sur deux sites distincts.

Chez l'huître creuse diploïde, la spermatogenèse aboutit à la formation de spermatozoïdes matures. Par contre, chez l'huître creuse triploïde, elle se traduit deux stratégies distinctes de reproduction.

Les huîtres triploïdes alpha parviennent à produire des spermatozoïdes matures et par conséquent passent donc les étapes de mitose et méiose de la spermatogenèse avec succès. Cependant la quantité de spermatozoïdes matures est très inférieure à celle des individus diploïdes. Alors, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La faible proportion de gamètes mâles est-elle liée dès le départ à une plus faible quantité de cellules germinales ? La ploïdie entraine-t-elle de l'apoptose au cours de la spermatogenèse conduisant à une réduction des cellules germinales ? ou alors la progression au cours de la mitose et de la méiose est perturbée ?

Les huîtres triploïdes beta ne parviennent pas ou très peu à s'engager dans leur spermatogenèse, probablement en ne passant les étapes de mitose et donc de la méiose. Chez les individus triploïdes beta un blocage précoce lors des phases de prolifération des cellules germinales a été décrit par Jouaux et al., 2010, surtout en prophase de mitose (stade 1) et ce blocage persiste bloquant la progression de la spermatogénèse. Par conséquent, on peut présumer que les cellules germinales précoces ne sont pas capables de s'engager en mitose par des dérégulations au cours de cette dernière ? Ou alors, comme pour les huîtres triploïdes alpha, le nombre de cellules germinales précoces est-il réduit vis-à-vis des huîtres diploïdes ?

Une étude transcriptomique sur les huîtres triploïdes alpha et beta a suggéré que le blocage pouvait impliquer des dérégulations à différents points de contrôle du cycle cellulaire (point de contrôle du fuseau mitotique et des dommages à l'ADN) (Dheilly et al., 2014). A partir de ce constat, ces travaux de doctorat avaient pour but de confirmer ou non l'implication de certains facteurs régulateurs du cycle cellulaire de la spermatogenèse des huîtres triploïdes alpha et beta, tant au niveau transcriptomique que protéomique. Mais au-delà des régulations *sensu stricto* des transcrits et des protéines, les dérégulations de certains mécanismes peuvent avoir lieu soit au niveau de modifications chromatiniennes, soit par des modifications post-traductionnelles. Par conséquent, cette étude a abordé également les régulations épigénétiques pouvant être engagées dans l'altération de la spermatogenèse triploïde.

I. Le tissu gonadique chez les huîtres triploïdes

Au début de ce travail, un échantillonnage conséquent d'animaux diploïdes et triploïdes disposés sur la concession expérimentale de l'Université de Caen Normandie pendant un cycle de gamétogenèse a été réalisé. Pour qualifier le sexe, le stade de gamétogenèse pour chaque animal, un suivi histologique a été menée, notamment pour déterminer les statuts reproducteurs alpha ou beta chez les huîtres triploïdes. Par la suite et pour quantifier l'effort de reproduction des animaux diploïdes et triploïdes, une analyse en histologie quantitative a été réalisée. Au cours de cette étude, nous avons également voulu vérifier que l'altération de la gamétogenèse était liée pour une part à une altération dans la mise en place du tractus gonadique. Pour cela, la proportion de tubules et leur aire dans l'aire gonadique a été estimée chez les huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta.

Nous avons pu constater chez les individus triploïdes une diminution significative de l'effort de reproduction, mais surtout un nombre de tubules plus faible à la fois chez les huîtres triploïdes alpha et beta vis-à-vis des animaux diploïdes, d'environ un facteur 2 dès le stade 0 de repos sexuel. Ce résultat semble expliquer pour partie la perturbation de la gamétogenèse chez les triploïdes. En poursuivant cette étude, on a pu également montrer que l'aire initiale des tubules (au stade 0) étaient similaires entre les huîtres diploïdes et triploïdes, mais par contre réduite d'environ la moitié chez les huîtres triploïdes beta au cours des proliférations goniales. Cela argumente le fait que les cellules germinales précoces sont bloquées dès le stade de proliférations, comme montré par Jouaux *et al.* (2010). Au cours de notre étude protéomique,

nous avons pu montrer également que les protéines VASA, PIWI, mais aussi les protéines à domaine TUDOR (régulateurs épigénétiques et du métabolisme de la transcription), Mago-Nashi… impliquée dans la formation de la lignée germinale sont significativement sous exprimées chez les individus beta par rapport aux individus diploïdes ou triploïdes alpha, confirmant que les perturbations de la gamétogénèse se font dès l'initiation de la gamétogenèse.

II. Régulations de la spermatogenèse des huîtres triploïdes beta

Les cellules germinales des huîtres triploïdes beta présentent des figures de blocage (condensation nucléaire) dès le stade de prolifération des cellules germinales et qui persistent tout au long du cycle de gamétogenèse. Ces figures de blocage sont majoritairement retrouvées entre la fin de prophase de mitose et le début de la prométaphase. Nos analyses transcriptomique et protéomique, on a pu mettre en évidence que les acteurs du point de contrôle du fuseau mitotique sont sous exprimés significativement au cours de la mitose, mais aussi de la méiose et exclusivement dans le tissu germinal chez les individus triploïdes beta. Ces résultats suggèrent alors que les cellules germinales ne passent pas ce point de contrôle et subissent un arrêt du cycle cellulaire précoce en mitose. De même, l'étude d'acteurs intervenant dans la réparation des dommages à l'ADN semblent montrer que l'infertilité des huîtres triploïdes peut être due également à une inhibition des recombinaisons homologues des chromosomes pendant la méiose. Au cours de l'analyse du protéome de la gonade des individus triploïdes beta par rapport aux individus diploïdes, on a constaté une diminution significative de l'expression des protéines constituant les nucléosomes (H2A, H2B, H3 et H4) ainsi que la protéine de liaison CAF1. Il a été montré qu'un appauvrissement des histones active le point de contrôle du fuseau mitotique et altère la ségrégation des chromatide sœurs, conduisant à une mauvaise ségrégation des chromosomes ou à la létalité des cellules possédant un SAC (Spindle Assembly Complex) défectueux. De plus, l'activation du SAC par déplétion des histones est associée à des altérations médiées par la condensation de la chromatine centromérique (Murillo-Pineda et al., 2014). Ces résultats montrent que chez les individus beta une déplétion des histones, accompagnée par une sous-expression des acteurs du SAC et d'autres protéines interagissant avec les microtubules (PRC1, CEP57) entrainerait potentiellement une activation du SAC et donc un arrêt du cycle cellulaire en mitose. De plus au cours de l'étude en immunohistochimie sur la protéine H3 phosphorylée au niveau de sa sérine 10, on constate également la

condensation de la chromatine centromérique qui pourrait expliquer la forte condensation nucléaire des noyaux des cellules germinales bloquées chez les individus beta (Figure 48).

III. Régulations de la spermatogenèse des huîtres triploïdes alpha

Chez les huîtres triploïdes alpha, on a pu montrer que le nombre de tubules est moins important dans le tractus gonadique pouvant en partie expliquer l'effort de reproduction plus faible. L'expression des acteurs des points de contrôle du fuseau mitotique et des dommages à l'ADN semblent également montrer une tendance à une sous-expression chez les huîtres triploïdes alpha, cependant cette diminution n'est pas significative. Par contre, il apparait que des mécanismes de régulations épigénétiques soient mis en place chez les huîtres triploïdes alpha. La méthylation totale de l'ADN chez les individus alpha est significativement plus importante en stade de différenciation des cellules germinales (méioses) par rapport au stade de prolifération des cellules germinales (mitoses). En revanche, le niveau de méthylation des individus diploïdes et triploïdes beta est stable au cours du cycle de gamétogenèse. Cela pourrait suggérer soit une compensation chromatinienne par rapport aux individus diploïdes ou alors à un « silencing » de certains gènes cibles. Cependant, chez les huîtres 3n alpha, plusieurs méthyltransférases ont été retrouvées significativement sous exprimées chez les individus alpha en protéomique comme PRDM9. Si on observe une méthylation plus importante chez les huîtres triploïdes alpha, cette expression est globale. On ne peut pas exclure que certaines méthyltransférases soient sous-exprimées et empêchent la méthylation de gènes spécifiques. Par exemple, PRDM9 est une méthyltransférase essentielle aux réparations des cassures double brins de l'ADN au cours de la méiose (Diagouraga et al., 2018), sa sous-expression pourrait expliquer les dérégulations qui sont observées chez les alpha au cours du stade méiotique. Toutefois, pour valider ces résultats préliminaires, il est nécessaire d'approfondir la compréhension des mécanismes de régulations épigénétiques chez les huîtres alpha. Il pourrait être envisagée une approche MeDIP-Seq (« Methylated DNA ImmunoPrecipitation - Sequencing ») pour obtenir une cartographie détaillée des régions méthylées du génome. De plus, les protéines impliquées dans la structuration de la chromatine telles que l'ensemble des protéines intervenant au niveau des nucléosomes (H2A, H2B, H3 et H4), l'histone chaperonne ASF1 et la protéine de liaison aux histones CAF-1 sont également significativement sous exprimées chez les huîtres triploïdes alpha. Ces deux dernières protéines sont impliquées dans le dépôt des histones nouvellement synthétisées pendant la réplication de l'ADN ainsi que dans

la promotion de la phase S et de la phase M en assurant la stabilité génomique. Il a été montré que des cellules présentant un KO conditionnel pour ASF1 présentent plusieurs pôles de fuseaux, des alignements chromosomiques aberrants lors de la mitose et un fort taux d'apoptose (Sanematsu et al., 2006). ASF1 pourrait potentiellement participer à la régulation de l'hétérochromatine centromérique, qui joue un rôle décisif dans la formation du kinétochore et de la ségrégation chromosomique pendant la mitose. Ainsi chez les individus triploïdes alpha, la sous expression des différentes histones ainsi que l'histone chaperonne ASF1 et la protéine de liaison aux histones CAF1 pourraient être responsables des faibles perturbations de la gamétogenèse observées chez cette catégorie d'huître triploïde. De plus, ces perturbations n'empêcheraient pas les cellules germinales de proliférer et de passer la mitose avec succès mais engendreraient toutefois de l'apoptose. Pour aller plus loin dans la compréhension des régulations associées à la modification de la structure de la chromatine une étude des modifications des histones peut être envisagée (Figure 48).

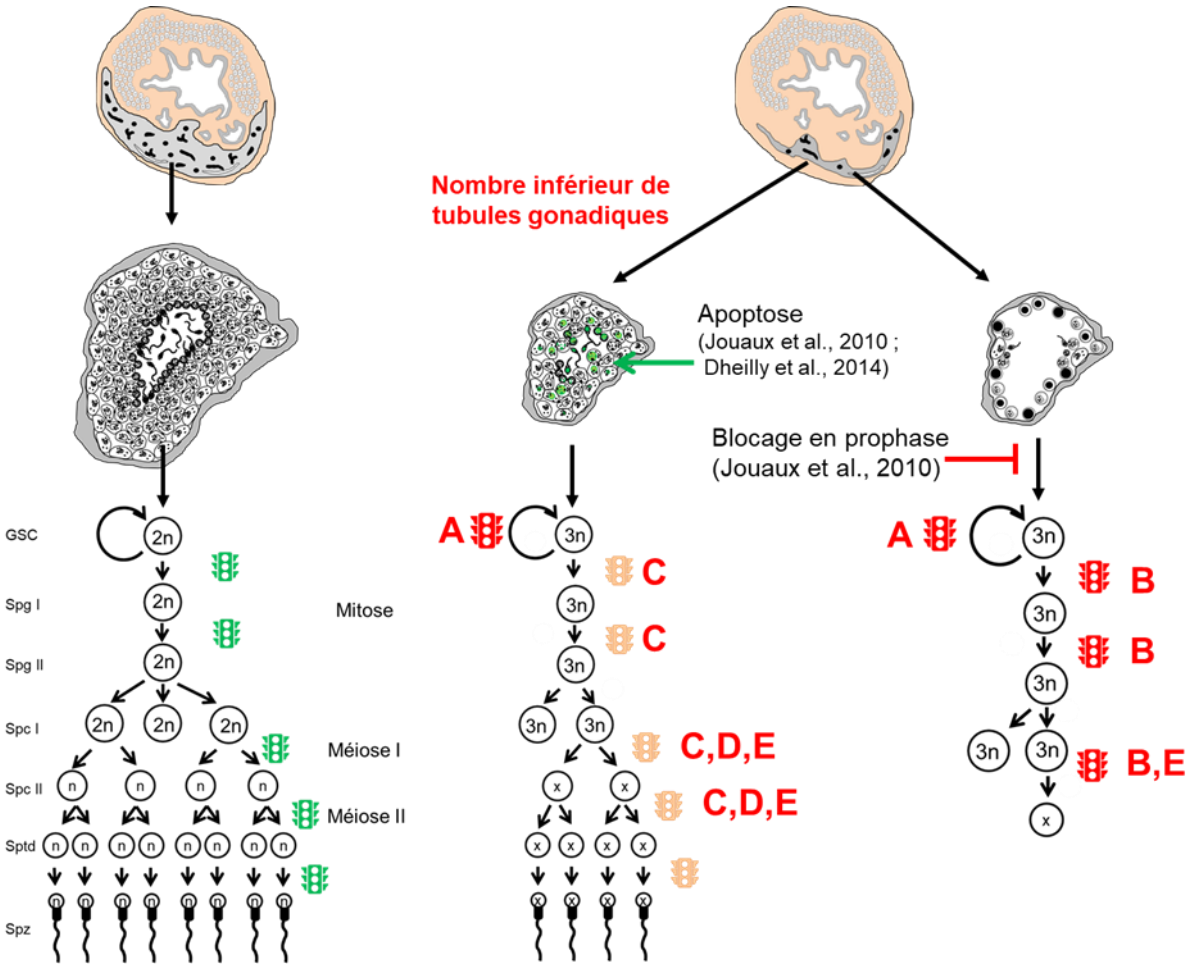


Figure 48 : Bilan des voies putatives impliquées dans l'altération de la spermatogenèse chez les huîtres triploïdes alpha et beta. A : Perturbation dans le maintien des cellules germinales précoces (sous expression de VASA, PIWI…), B : Blocage en mitose et en méiose (marqueurs du SAC : BUB3, MIS12, CDC20… et des interactions avec les microtubules (PRC1, CEP57…), associé à la condensation chromatinienne chez les triploïdes beta (marqueurs : H3S10P ; des modifications chromatiniennes (Histones H2A à H4, SMC, CAF1, ASF1…), C : Modifications chromatiniennes (Marqueurs SMC, HP1BP3, CSPP1…), D : Méthylation accrue de l'ADN et expression des méthyl-transférases (PRDM9…), E : Altérations des mécanismes de recombinaison et de réparation des dommages à l'ADN (RAD1, 51 et 51B)

IV. Régulation de la gamétogenèse et de la croissance des huîtres diploïdes et triploïdes alpha et beta par les facteurs environnementaux

Les huîtres triploïdes présentent des croissances plus importantes que les huîtres diploïdes, soit en condition expérimentale, soit sur le terrain. Chez l'huître diploïde, de nombreuses études se sont intéressées à l'influence des conditions environnementales telles que la température, la salinité, la disponibilité en nourriture sur la croissance et la reproduction

(Chávez-Villalba et al., 2002 ; Fabioux et al., 2005). Cependant aucunes études ne s'est intéressée aux performances de croissance des deux catégories d'huîtres triploïdes alpha et beta en conditions environnementales contrastées.

Nous avons donc mené une expérimentation de suivi de la reproduction et de la croissance d'huîtres diploïdes et triploïdes sur deux sites distincts, un site en zone conchylicole et un autre sans culture marine et se différenciant par des variations de la température, de la salinité et la production primaire. A l'issue d'un cycle gamétogénétique, les individus triploïdes présentent effectivement une plus forte croissance par rapport aux individus diploïdes et mais surtout sur le site de Géfosse où les températures et la disponibilité en nourriture sont supérieures tout au long du cycle de gamétogenèse. Par contre, cette expérimentation ne montre pas de réelle variation de la gamétogenèse entre les sites, chez les huîtres diploïdes et triploïdes. Cette forte croissance pourrait s'expliquer à la fois par des conditions environnementales favorables en termes de température et de disponibilité en nourriture mais également par une réallocation énergétique de l'énergie non utilisée pour la reproduction vers la croissance. En effet, les individus triploïdes beta présentent une croissance supérieure aux individus alpha et diploïdes. Ainsi, la diminution de l'allocation à la reproduction pourrait s'accompagner d'une réallocation de l'énergie vers la croissance somatique entrainant une croissance plus rapide des individus triploïdes beta. Toutefois, l'influence des paramètres environnementaux telle que la température et la disponibilité en nourriture sur la croissance des deux catégories d'huîtres triploïdes alpha et beta et la possible réallocation vers la croissance sont plus aisément confirmables en conditions contrôlées d'élevage.

Bilan et perspectives

Ainsi ce travail de thèse a permis d'apporter des données majeures pour comprendre les régulations de la reproduction des huîtres triploïdes alpha et beta. Les résultats obtenus ont permis d'enrichir les données peu nombreuses chez les huîtres triploïdes et leur reproduction. En fait, il apparait que les perturbations de la spermatogenèse chez l'huître triploïde semblent être régulées à plusieurs niveaux, soit dès la mise en place du tractus gonadique et sur les cellules germinales précoces, mais aussi par des régulations transcriptomiques, protéomiques et épigénétiques pendant la mitose et la méiose. Cependant, certaines hypothèses nécessitent d'être confirmées. L'implication des régulateurs du cycle cellulaire ou de la méiose doit être complétée par l'étude d'un nombre plus exhaustif d'acteurs, ou par exemple en invalidant ces gènes. Les régulations épigénétiques pourraient être également abordées par d'autres approches pour l'identification des régions de l'ADN modifiées ou alors des protéines modulées post-traductionnellement, ou encore les régulations par les ARN non codants. Si certaines approches peuvent être assez aisées à mettre en place, d'autres peuvent se heurter à la singularité du modèle. En effet, la structure même de la « gonade » chez l'huître, imbriquée dans d'autres tissus empêche une étude uniquement sur la lignée germinale. La difficulté d'isoler des cellules germinales ou de disposer des cultures primaires sont également un frein à une analyse plus fine. Un autre point qui pourrait être également élucidé est si les profils alpha ou beta sont définitivement acquis chez un individu. Enfin, cette étude devrait tenir compte des différentes méthodes d'obtention des individus triploïdes (chimiques et croisements 4n x2n) qui pourraient avoir un impact sur la proportion d'individus alpha et beta.

D'un point de vue appliqué, ces résultats pourraient permettre d'améliorer l'obtention d'animaux complétement stériles (profil beta).

Annexes

Annexe 1 : Classification fonctionnelle des protéines identifiées spécifiquement dans les gonades mâles d'huîtres diploïdes, triploïdes alpha ou beta par après l'analyse de l'ontologie des gènes au cours du cycle de gamétogenèse (stades : 0 (repos sexuel), 1 (prolifération des cellules germinales) et 2 (différenciation des cellules germinales)). Les critères de sélection pour qu'un terme soit représenté sont qu'au moins 3 gènes soient associés à ce terme et que ces gènes représentent au minimum 4% du nombre de gènes totaux associés à ce terme. Les groupes fonctionnels ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'un test de Fisher avec une p-value <0,05 suivi d'un test de correction d'erreur de Benjamini Hochberg. Les termes associés aux fonctions moléculaires sont représentés en bleu, aux processus biologiques en jaune et aux compartiments cellulaire en vert.

2n Stade 0							
GO ID	**GOTerm**	**Ontology Source**	**Term Pvalue**	**GOLevels**	**GOGroups**	**% Associated Genes**	**Nr. Genes**
GO:0004177	aminopeptidase activity	GO_MolecularFunction	0,03	[6]	Group0	10,00	3,00
GO:0016459	myosin complex	GO_CellularComponent	0,03	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group1	10,00	3,00
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	GO_MolecularFunction	0,04	[3]	Group2	5,41	6,00
GO:0003755	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	GO_MolecularFunction	0,03	[4]	Group3	11,54	3,00
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization	GO_BiologicalProcess	0,03	[8, 9]	Group3	11,54	3,00
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	GO_BiologicalProcess	0,01	[3]	Group4	10,17	6,00
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	GO_BiologicalProcess	0,03	[4]	Group4	10,00	3,00
GO:0019318	hexose metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[6]	Group4	8,11	6,00
GO:0006096	glycolysis	GO_BiologicalProcess	0,04	[4, 9]	Group4	12,00	3,00

3n stade 0							
GO ID	**GOTerm**	**Ontology Source**	**Term PValue**	**GOLevels**	**GOGroups**	**% Associated Genes**	**Nr. Genes**
GO:0055114	oxidation-reduction process	GO_BiologicalProcess	0,01	[3]	Group0	6,29	52,00
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[3]	Group1	6,30	49,00
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	GO_BiologicalProcess	0,04	[3]	Group2	11,86	7,00
GO:0016884	carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor	GO_MolecularFunction	0,03	[4]	Group3	25,00	4,00
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[3, 4, 6, 7]	Group4	9,14	16,00
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,02	[5, 6]	Group4	7,79	19,00
GO:0006022	aminoglycan metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,02	[4]	Group5	10,00	11,00
GO:0006030	chitin metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,05	[5, 6]	Group5	9,78	9,00
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,04	[3]	Group6	6,50	26,00
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	GO_MolecularFunction	0,01	[3]	Group6	10,14	15,00
GO:0051213	dioxygenase activity	GO_MolecularFunction	0,01	[3]	Group7	14,29	9,00
GO:0016702	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen	GO_MolecularFunction	0,04	[4]	Group7	13,64	6,00
GO:0016706	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	GO_MolecularFunction	0,01	[4]	Group7	21,43	6,00
GO:0004656	procollagen-proline 4-dioxygenase activity	GO_MolecularFunction	0,01	[7]	Group7	50,00	3,00

2n stade 1							
GO ID	GOTerm	Ontology Source	Term PValue	GOLevels	GOGroups	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0044424	intracellular part	GO_CellularComponent	0,00	[2, 3, 4]	Group00	4,16	83,00
GO:0005524	ATP binding	GO_MolecularFunction	0,01	[5, 6, 7, 8]	Group01	4,30	47,00
GO:0005643	nuclear pore	GO_CellularComponent	0,02	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]	Group02	15,38	4,00
GO:0006606	protein import into nucleus	GO_BiologicalProcess	0,00	[4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group03	50,00	3,00
GO:0003725	double-stranded RNA binding	GO_MolecularFunction	0,05	[5]	Group04	13,04	3,00
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	GO_MolecularFunction	0,04	[3]	Group05	6,34	9,00
GO:0008168	methyltransferase activity	GO_MolecularFunction	0,02	[4]	Group06	6,83	11,00
GO:0009219	pyrimidine deoxyribonucleotide metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[6, 7, 8, 9, 10]	Group07	50,00	3,00
GO:0003676	nucleic acid binding	GO_MolecularFunction	0,00	[3]	Group08	4,52	79,00
GO:0003723	RNA binding	GO_MolecularFunction	0,00	[4]	Group08	9,74	30,00
GO:0006281	DNA repair	GO_BiologicalProcess	0,04	[5, 6, 7]	Group09	6,56	8,00
GO:0006310	DNA recombination	GO_BiologicalProcess	0,05	[5, 6, 7]	Group09	10,26	4,00
GO:0004221	ubiquitin thiolesterase activity	GO_MolecularFunction	0,02	[5]	Group10	11,11	5,00
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[7, 8, 9]	Group10	10,29	7,00
GO:0016772	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	GO_MolecularFunction	0,00	[3]	Group11	5,05	40,00
GO:0016779	nucleotidyltransferase activity	GO_MolecularFunction	0,00	[4]	Group11	12,50	12,00
GO:0003899	DNA-directed RNA polymerase activity	GO_MolecularFunction	0,00	[6]	Group11	21,62	8,00
GO:0016788	hydrolase activity, acting on ester bonds	GO_MolecularFunction	0,02	[3]	Group12	4,71	26,00
GO:0004518	nuclease activity	GO_MolecularFunction	0,05	[4]	Group12	6,08	9,00
GO:0004527	exonuclease activity	GO_MolecularFunction	0,00	[5]	Group12	14,00	7,00
GO:0030529	ribonucleoprotein complex	GO_CellularComponent	0,00	[2, 3, 4, 5]	Group13	7,37	16,00
GO:0010467	gene expression	GO_BiologicalProcess	0,00	[4]	Group13	4,79	47,00
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	GO_CellularComponent	0,04	[3, 4, 5, 6]	Group13	4,70	23,00
GO:0005840	ribosome	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7]	Group13	7,91	11,00
GO:0006412	translation	GO_BiologicalProcess	0,04	[5, 6]	Group13	5,34	15,00
GO:0043547	positive regulation of GTPase activity	GO_BiologicalProcess	0,01	[6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]	Group14	11,54	6,00
GO:0030695	GTPase regulator activity	GO_MolecularFunction	0,02	[3]	Group14	7,35	10,00
GO:0005096	GTPase activator activity	GO_MolecularFunction	0,02	[3, 4]	Group14	9,84	6,00
GO:0009966	regulation of signal transduction	GO_BiologicalProcess	0,02	[3, 4, 5]	Group14	7,09	10,00
GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,04	[5, 6]	Group14	7,14	7,00
GO:0051056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	GO_BiologicalProcess	0,03	[4, 5, 6, 7]	Group14	7,41	8,00
GO:0010467	gene expression	GO_BiologicalProcess	0,00	[4]	Group15	4,79	47,00
GO:0017150	tRNA dihydrouridine synthase activity	GO_MolecularFunction	0,00	[4]	Group15	42,86	3,00
GO:0016070	RNA metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[4, 5, 6]	Group15	4,66	38,00
GO:0006396	RNA processing	GO_BiologicalProcess	0,00	[5, 6, 7]	Group15	10,34	15,00
GO:0009451	RNA modification	GO_BiologicalProcess	0,02	[5, 6, 7]	Group15	11,63	5,00
GO:0006397	mRNA processing	GO_BiologicalProcess	0,04	[6, 7, 8]	Group15	10,81	4,00
GO:0006399	tRNA metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[6, 7, 8]	Group15	11,11	10,00
GO:0008033	tRNA processing	GO_BiologicalProcess	0,00	[7, 8, 9]	Group15	16,22	6,00
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3]	Group16	4,38	71,00
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3]	Group16	4,35	71,00
GO:0046483	heterocycle metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3]	Group16	4,32	70,00
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3]	Group16	4,35	72,00
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3, 4]	Group16	4,28	99,00
GO:0010467	gene expression	GO_BiologicalProcess	0,00	[4]	Group16	4,79	47,00
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,00	[4, 5]	Group16	4,70	51,00
GO:0016070	RNA metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[4, 5, 6]	Group16	4,66	38,00
GO:0006412	translation	GO_BiologicalProcess	0,04	[5, 6]	Group16	5,34	15,00
GO:0006396	RNA processing	GO_BiologicalProcess	0,00	[5, 6, 7]	Group16	10,34	15,00

3n stade 1 alpha

GO ID	GOTerm	Ontology Source	Term PValue	GOLevels	GOGroups	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0071702	organic substance transport	GO_BiologicalProcess	0,05	[3, 4]	Group0	6,20	17,00
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	GO_BiologicalProcess	0,03	[3]	Group1	11,86	7,00
GO:0006096	glycolysis	GO_BiologicalProcess	0,05	[4, 9]	Group1	16,00	4,00

3n stade 1 beta

GO ID	GOTerm	Ontology Source	Term PValue	GOLevels	GOGroups	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0008017	microtubule binding	GO_MolecularFunction	0,01	[5]	Group0	5,66	3,00

2n stade 2							
GO ID	**GOTerm**	**Ontology Source**	**Term PValue**	**GOLevels**	**GOGroups**	**% Associated Genes**	**Nr. Genes**
GO:0008080	N-acetyltransferase activity	GO_MolecularFunction	0,05	[6]	Group00	8,82	3,00
GO:0051493	regulation of cytoskeleton organization	GO_BiologicalProcess	0,01	[4, 5]	Group01	17,65	3,00
GO:0008452	RNA ligase activity	GO_MolecularFunction	0,00	[4]	Group02	75,00	3,00
GO:0016568	chromatin modification	GO_BiologicalProcess	0,05	[6]	Group03	8,57	3,00
GO:0005543	phospholipid binding	GO_MolecularFunction	0,01	[3, 4]	Group04	6,45	10,00
GO:0005544	calcium-dependent phospholipid binding	GO_MolecularFunction	0,01	[4, 5]	Group04	25,00	3,00
GO:0006629	lipid metabolic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[3]	Group05	5,50	11,00
GO:0008610	lipid biosynthetic process	GO_BiologicalProcess	0,04	[4]	Group05	6,10	5,00
GO:0031967	organelle envelope	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7]	Group06	8,00	6,00
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	GO_CellularComponent	0,00	[4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]	Group06	14,71	5,00
GO:0044446	intracellular organelle part	GO_CellularComponent	0,00	[2, 3, 4, 5, 6]	Group07	5,04	31,00
GO:0044428	nuclear part	GO_CellularComponent	0,00	[3, 4, 5, 6, 7, 8]	Group07	8,13	13,00
GO:0046907	intracellular transport	GO_BiologicalProcess	0,05	[3, 4, 5]	Group08	4,67	7,00
GO:0016482	cytoplasmic transport	GO_BiologicalProcess	0,02	[4, 5, 6]	Group08	8,51	4,00
GO:0006915	apoptotic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[5]	Group09	6,86	7,00
GO:0008234	cysteine-type peptidase activity	GO_MolecularFunction	0,00	[5]	Group09	8,33	9,00
GO:0004197	cysteine-type endopeptidase activity	GO_MolecularFunction	0,01	[6]	Group09	10,34	6,00
GO:0006281	DNA repair	GO_BiologicalProcess	0,01	[5, 6, 7]	Group10	6,56	8,00
GO:0006298	mismatch repair	GO_BiologicalProcess	0,01	[6, 7, 8]	Group10	23,08	3,00
GO:0030983	mismatched DNA binding	GO_MolecularFunction	0,01	[7]	Group10	25,00	3,00
GO:0005681	spliceosomal complex	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group11	27,27	3,00
GO:0006396	RNA processing	GO_BiologicalProcess	0,00	[5, 6, 7]	Group11	8,28	12,00
GO:0006397	mRNA processing	GO_BiologicalProcess	0,00	[6, 7, 8]	Group11	13,51	5,00
GO:0008380	RNA splicing	GO_BiologicalProcess	0,01	[6, 7, 8]	Group11	16,00	4,00
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	GO_BiologicalProcess	0,01	[7, 8, 9, 10, 11]	Group11	21,43	3,00
GO:0007017	microtubule-based process	GO_BiologicalProcess	0,00	[3]	Group12	7,28	11,00
GO:0007018	microtubule-based movement	GO_BiologicalProcess	0,01	[4]	Group12	7,61	7,00
GO:0008017	microtubule binding	GO_MolecularFunction	0,04	[5]	Group12	7,55	4,00
GO:0005856	cytoskeleton	GO_CellularComponent	0,01	[4, 5, 6, 7]	Group12	4,71	12,00
GO:0005874	microtubule	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group12	8,57	6,00
GO:0005875	microtubule associated complex	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group12	7,53	7,00
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	GO_CellularComponent	0,01	[5, 6, 7, 8]	Group12	6,62	9,00
GO:0051258	protein polymerization	GO_BiologicalProcess	0,04	[6, 7]	Group12	10,00	3,00
GO:0003774	motor activity	GO_MolecularFunction	0,02	[7]	Group12	5,93	7,00
GO:0005871	kinesin complex	GO_CellularComponent	0,01	[4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]	Group12	11,11	5,00

3n stade 2 alpha

GO ID	GOTerm	Ontology Source	Term PValue	GOLevels	GOGroups	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0048523	negative regulation of cellular process	GO_BiologicalProcess	0,04	[2, 3, 4]	Group0	5,36	3,00
GO:0007049	cell cycle	GO_BiologicalProcess	0,01	[3]	Group1	5,83	6,00
GO:0051276	chromosome organization	GO_BiologicalProcess	0,01	[4]	Group2	6,52	6,00
GO:0071103	DNA conformation change	GO_BiologicalProcess	0,01	[5, 6, 7]	Group2	7,94	5,00
GO:0031975	envelope	GO_CellularComponent	0,01	[2, 3]	Group3	6,00	6,00
GO:0005643	nuclear pore	GO_CellularComponent	0,01	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]	Group3	11,54	3,00
GO:0004383	guanylate cyclase activity	GO_MolecularFunction	0,01	[3, 4]	Group4	9,09	3,00
GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[4, 5]	Group4	4,43	7,00
GO:1901293	nucleoside phosphate biosynthetic process	GO_BiologicalProcess	0,02	[5, 6, 7]	Group4	4,55	5,00
GO:0006182	cGMP biosynthetic process	GO_BiologicalProcess	0,01	[8, 9, 10, 11]	Group4	9,38	3,00
GO:0030695	GTPase regulator activity	GO_MolecularFunction	0,00	[3]	Group5	6,62	9,00
GO:0005096	GTPase activator activity	GO_MolecularFunction	0,01	[3, 4]	Group5	6,56	4,00
GO:0005083	small GTPase regulator activity	GO_MolecularFunction	0,01	[4]	Group5	4,95	5,00
GO:0005085	guanyl-nucleotide exchange factor activity	GO_MolecularFunction	0,01	[4]	Group5	7,69	5,00
GO:0009966	regulation of signal transduction	GO_BiologicalProcess	0,01	[3, 4, 5]	Group5	4,96	7,00
GO:0043087	regulation of GTPase activity	GO_BiologicalProcess	0,01	[5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]	Group5	6,45	4,00

3n stade 2 beta

GO ID	GOTerm	Ontology Source	Term PValue	GOLevels	GOGroups	% Associated Genes	Nr. Genes
GO:0003950	NAD+ ADP-ribosyltransferase activity	GO_MolecularFunction	0,02	[5]	Group0	6,52	3,00
GO:0005581	collagen	GO_CellularComponent	0,00	[2, 3, 4]	Group1	5,45	6,00
GO:0010466	negative regulation of peptidase activity	GO_BiologicalProcess	0,02	[6, 7]	Group2	6,25	3,00
GO:0016459	myosin complex	GO_CellularComponent	0,00	[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]	Group3	13,33	4,00
GO:0016641	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, oxygen as acceptor	GO_MolecularFunction	0,00	[4]	Group4	16,67	3,00
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	GO_MolecularFunction	0,00	[3]	Group5	4,93	7,00
GO:0003779	actin binding	GO_MolecularFunction	0,02	[4]	Group5	5,26	4,00
GO:0008017	microtubule binding	GO_MolecularFunction	0,03	[5]	Group5	5,66	3,00

Annexe 2 : Protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes mâles au stade 0 de repos sexuel. (MW : Molecular Weight (Da), Significance method : PEAKSQ (Protein Significance >10) et Groups Ratios = Protein fold change > 1,5).

Crassostrea gigas - Stade 0			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3n
K1QSB0	CGI_10006343	Fructose-1 6-bisphosphatase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006343 PE=3 SV=1	36787	21,23	1,96	0,04
K1PQI4	CGI_10004564	Enolase-phosphatase E1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004564 PE=3 SV=1	34671	13,39	1,62	0,38
K1R4Z3	CGI_10015004	Malate dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015004 PE=3 SV=1	29836	12,89	1,78	0,22
K1PDC6	CGI_10003170	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003170 PE=3 SV=1	23570	12,74	1,76	0,24
K1QIR8	CGI_10015492	78 kDa glucose-regulated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015492 PE=3 SV=1	73033	12,09	1,77	0,23
K1R2D6	CGI_10020447	Plastin-3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020447 PE=4 SV=1	79688	11,74	1,77	0,23
K1PG84	CGI_10000045 CGI_10019425	Glutaredoxin-C6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000045 PE=4 SV=1	11569	11,41	1,86	0,14
K1PLM3	CGI_10007699	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007699 PE=4 SV=1	33664	10,73	1,68	0,32
K1RHA5	CGI_10021159	Nucleoside diphosphate kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021159 PE=3 SV=1	17058	10,23	1,9	0,1
K1QWY3	CGI_10017538	Zonadhesin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017538 PE=4 SV=1	299949	10,09	1,7	0,3

Protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes mâles au stade 1 de prolifération des cellules germinales.

Crassostrea gigas - Stade 1			MW	Significance	Group ratios		
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nalpha	3nbeta
K1PJG0	CGI_10015188	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015188 PE=4 SV=1	25796	21,17	2,64	0,14	0,22
K1QWP6	CGI_10001544	Protein boule OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001544 PE=4 SV=1	12876	26,99	2,46	0,05	0,49
K1RDJ6	CGI_10022187	cAMP-responsive element modulator OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022187 PE=4 SV=1	30710	10,95	2,43	0,24	0,33
K1RU07	CGI_10022743	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022743 PE=4 SV=1	108564	37,8	2,38	0,31	0,31
K1PYA2	CGI_10017362	Host cell factor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017362 PE=4 SV=1	111377	15,51	2,37	0,39	0,23
K1RS60	CGI_10023224	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023224 PE=4 SV=1	23134	12,75	2,36	0,21	0,43
K1QI52	CGI_10004099	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004099 PE=4 SV=1	40274	15,31	2,32	0,26	0,42
K1Q923	CGI_10010075	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010075 PE=3 SV=1	81504	19,98	2,25	0,23	0,52
K1QED7	CGI_10016097	Replication protein A subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016097 PE=3 SV=1	69179	59,2	2,24	0,23	0,53
K1QPJ1	CGI_10021674	Actin cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021674 PE=3 SV=1	41657	36,08	2,2	0,11	0,69
K1R7V7	CGI_10012330	Tubulin beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012330 PE=3 SV=1	49936	25	2,13	0,25	0,61
K1RN77	CGI_10019269	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019269 PE=4 SV=1	72947	22,65	2,05	0,25	0,7
K1PTC2	CGI_10002799	c-Myc-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002799 PE=4 SV=1	12285	22,88	2,04	0,4	0,56
K1QVJ8	CGI_10008757	Piwi-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008757 PE=3 SV=1	99952	23,82	2,01	0,4	0,59
K1R3W9	CGI_10021337	Replication protein A 14 kDa subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021337 PE=4 SV=1	15553	20,35	2	0,29	0,71
K1Q9G3	CGI_10019894	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019894 PE=3 SV=1	39658	16,7	2	0,43	0,57
K1R2N0	CGI_10008056 CGI_10008061 CGI_10008067	Histone H4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008056 PE=3 SV=1	11367	13,18	1,99	0,51	0,5
K1PD30	CGI_10008446	Putative histone-binding protein Caf1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008446 PE=4 SV=1	44700	22,29	1,98	0,38	0,64
K1RUW0	CGI_10028125	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028125 PE=4 SV=1	282294	14,86	1,98	0,5	0,52
K1RX23	CGI_10027885	Kelch domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027885 PE=4 SV=1	39300	15,11	1,96	0,26	0,78
K1S270	CGI_10025677	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025677 PE=4 SV=1	25454	49,15	1,91	0,51	0,58
K1R4Y6	CGI_10014999	Carboxypeptidase D OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014999 PE=4 SV=1	202048	24,97	1,89	0,56	0,56
K1PRV7	CGI_10009537	Profilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009537 PE=3 SV=1	14245	14,2	1,88	0,58	0,54
K1R2G7	CGI_10026955	Ran-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026955 PE=4 SV=1	49660	16,63	1,85	0,4	0,75
K1RJH5	CGI_10021647	Polyadenylate-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021647 PE=3 SV=1	71660	15,47	1,84	0,45	0,71
K1R466	CGI_10004346	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004346 PE=3 SV=1	63906	19,29	1,83	0,39	0,79
K1QZF1	CGI_10024702	WD repeat-containing protein 92 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024702 PE=4 SV=1	39479	11,43	1,81	0,58	0,61
K1Q4Z4	CGI_10005314	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005314 PE=4 SV=1	54390	27,16	1,8	0,39	0,81
K1QBL6	CGI_10011771	Tudor domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011771 PE=4 SV=1	257824	24,53	1,8	0,28	0,92
K1Q9W5	CGI_10013567	T-complex protein 1 subunit eta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013567 PE=3 SV=1	46554	17,22	1,8	0,45	0,75
K1QUK1	CGI_10023237	Ubiquitin fusion degradation protein 1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023237 PE=4 SV=1	78036	14,54	1,8	0,36	0,84
K1R2T7	CGI_10009679	UPF0468 protein C16orf80-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009679 PE=4 SV=1	22661	13,47	1,8	0,73	0,47
K1PQE3	CGI_10011751	RNA-binding protein Raly OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011751 PE=4 SV=1	32552	13,3	1,79	0,39	0,82
K1QBW6	CGI_10023437	Tudor domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023437 PE=4 SV=1	278652	26,41	1,76	0,38	0,87
K1QQQ7	CGI_10020782	Mago nashi-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020782 PE=4 SV=1	17361	22,94	1,76	0,31	0,94
K1QZ08	CGI_10000789	Transcription elongation factor B polypeptide 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000789 PE=3 SV=1	20025	12,79	1,75	0,49	0,75
K1P6B3	CGI_10009642	Endoplasmic reticulum resident protein ERp44 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009642 PE=4 SV=1	44796	24,19	1,74	0,5	0,76
K1PJZ5	CGI_10006154	5'-nucleotidase domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006154 PE=4 SV=1	40499	17,28	1,74	0,44	0,82
K1PR47	CGI_10028301	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028301 PE=3 SV=1	63660	14,99	1,74	0,51	0,75
K1QRL6	CGI_10014726	Methenyltetrahydrofolate synthetase domain-containing protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014726 PE=4 SV=1	60482	20,04	1,73	0,28	1
K1PLW6	CGI_10007448	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007448 PE=4 SV=1	11919	20,84	1,72	0,34	0,94
K1QSX2	CGI_10014220	Dehydrogenase/reductase SDR family member 13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014220 PE=3 SV=1	50757	18,3	1,72	0,47	0,82
K1R6C2	CGI_10011875	Peroxisomal 3 2-trans-enoyl-CoA isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011875 PE=4 SV=1	41567	18,15	1,72	0,6	0,69
K1R0S3	CGI_10002375	T-complex protein 1 subunit theta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002375 PE=3 SV=1	83143	16,51	1,72	0,49	0,79
K1Q648	CGI_10013438	Dpy-30-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013438 PE=4 SV=1	10933	14,5	1,71	0,2	1,09
K1RMV1	CGI_10022145	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022145 PE=4 SV=1	38020	24,17	1,7	0,56	0,74
K1R8I8	CGI_10024545	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024545 PE=3 SV=1	52060	20,59	1,7	0,42	0,88
K1R2K6	CGI_10008057	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008057 PE=3 SV=1	13693	19,09	1,7	0,67	0,63

K1PUQ5	CGI_10008078 CGI_10008083	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008078 PE=3 SV=1	13709	19,09	1,7	0,67	0,63
K1R2L4	CGI_10008062 CGI_10008068 CGI_10008073	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008062 PE=3 SV=1	13737	19,09	1,7	0,67	0,63
K1R1F0	CGI_10005536	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005536 PE=4 SV=1	68725	38,36	1,68	0,47	0,85
K1RLC5	CGI_10015118	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015118 PE=3 SV=1	75011	28,39	1,68	0,36	0,97
K1PKF6	CGI_10002798	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002798 PE=4 SV=1	33898	13,94	1,67	0,64	0,7
K1RD83	CGI_10014474	Serine hydroxymethyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014474 PE=3 SV=1	52479	18,11	1,66	0,52	0,82
K1QFF7	CGI_10006329	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006329 PE=4 SV=1	49754	15,86	1,66	0,6	0,74
K1PF96	CGI_10006413	Spliceosome RNA helicase BAT1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006413 PE=4 SV=1	55406	26,26	1,65	0,59	0,76
K1QMT1	CGI_10009495	DnaJ-like protein subfamily B member 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009495 PE=4 SV=1	38825	20,61	1,65	0,9	0,44
K1QXK7	CGI_10015504	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015504 PE=4 SV=1	40996	13,98	1,65	0,43	0,92
K1R158	CGI_10014742	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014742 PE=4 SV=1	46119	22,19	1,64	0,63	0,73
K1R586	CGI_10015695	Vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015695 PE=4 SV=1	28083	21,66	1,64	0,46	0,9
K1QXJ9	CGI_10025058	Pantothenate kinase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025058 PE=4 SV=1	45577	14,36	1,64	0,33	1,02
K1P0G7	CGI_10002029	Putative hydrolase RBBP9 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002029 PE=4 SV=1	20202	16,3	1,63	0,48	0,9
K1QAU8	CGI_10026365	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026365 PE=3 SV=1	33456	14,25	1,63	0,41	0,96
K1RI55	CGI_10020146	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020146 PE=4 SV=1	31163	20,92	1,62	0,26	1,13
K1R2V1	CGI_10019491	Importin subunit beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019491 PE=4 SV=1	224243	16,71	1,62	0,62	0,75
K1QPJ9	CGI_10018645	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018645 PE=3 SV=1	51509	12,23	1,62	0,61	0,77
K1S3G2	CGI_10028136	HMGB1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028136 PE=2 SV=1	23342	10,28	1,61	0,59	0,8
K1QKW8	CGI_10003086	Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003086 PE=3 SV=1	49603	28,06	1,59	0,66	0,76
K1RDT2	CGI_10026256	WD repeat-containing protein 16 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026256 PE=4 SV=1	73787	22,18	1,59	0,17	1,24
K1QCT3	CGI_10006179	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006179 PE=3 SV=1	18570	21,65	1,59	0,49	0,92
K1P421	CGI_10012372	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012372 PE=3 SV=1	14159	18,41	1,59	0,79	0,62
K1RXS6	CGI_10025376	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025376 PE=3 SV=1	14244	18,41	1,59	0,79	0,62
K1PUM2	CGI_10008058 CGI_10008063 CGI_10008065	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008058 PE=3 SV=1	13485	18,41	1,59	0,79	0,62
K1QYH5	CGI_10024151	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024151 PE=3 SV=1	55146	24,95	1,58	0,66	0,76
K1PNI1	CGI_10016170	Bifunctional protein NCOAT OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016170 PE=4 SV=1	91874	21,53	1,57	0,32	1,11
K1PX47	CGI_10013187	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013187 PE=3 SV=1	36541	18,77	1,56	0,61	0,83
K1RBZ5	CGI_10010010	Ran GTPase-activating protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010010 PE=4 SV=1	56023	16,23	1,56	0,76	0,69
K1PH10	CGI_10014652	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014652 PE=4 SV=1	47629	12,87	1,56	0,42	1,02
K1Q337	CGI_10011554	Calcyclin-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011554 PE=4 SV=1	26036	13,56	1,55	0,56	0,89
K1PMQ4	CGI_10006792	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006792 PE=4 SV=1	120746	13,21	1,55	0,63	0,82
K1R4F7	CGI_10018089	Ras-related protein Rab-6B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018089 PE=4 SV=1	23606	12,17	1,55	0,57	0,88
K1PEY4	CGI_10002226	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002226 PE=3 SV=1	99126	15,95	1,54	0,65	0,81
K1RQJ6	CGI_10013595	Enhancer of mRNA-decapping protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013595 PE=4 SV=1	163796	15,94	1,54	0,47	0,99
K1PPC3	CGI_10008217 CGI_10016491	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008217 PE=4 SV=1	12516	16,26	1,53	0,53	0,94
K1RY67	CGI_10026963	Uncharacterized protein C11orf70-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026963 PE=4 SV=1	25256	12,21	1,53	0,56	0,91
K1Q3L8	CGI_10016498	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016498 PE=4 SV=1	108784	12,11	1,53	0,68	0,8
K1RAJ1	CGI_10018918	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018918 PE=3 SV=1	75318	20,39	1,52	0,36	1,12
K1R8S7	CGI_10027967	Phospholipase A-2-activating protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027967 PE=4 SV=1	85999	19,6	1,52	0,7	0,78
K1PS11	CGI_10003535	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003535 PE=3 SV=1	40730	17,22	1,52	0,7	0,78
K1QC27	CGI_10023479	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023479 PE=4 SV=1	46266	12,48	1,52	0,63	0,85
K1RJ48	CGI_10022027	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022027 PE=4 SV=1	42369	12,09	1,52	0,62	0,86
K1R3R4	CGI_10019252	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1 homolog OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019252 PE=3 SV=1	35245	11,83	1,51	0,65	0,84
K1RDK5	CGI_10021646	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021646 PE=4 SV=1	31400	17,19	1,5	0,51	0,99
K1QKR5	CGI_10019166	WW domain-binding protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019166 PE=4 SV=1	28307	12,91	1,5	0,82	0,68
K1R8L1	CGI_10021808	Exportin-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021808 PE=4 SV=1	109457	22,44	1,49	0,36	1,15
K1QXQ8	CGI_10003721	DNA helicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003721 PE=3 SV=1	125919	20,58	1,49	0,07	1,45
K1PNQ5	CGI_10017621	Heat shock protein HSP 90-alpha 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017621 PE=3 SV=1	83320	19,86	1,49	0,59	0,93
K1QMD8	CGI_10013497	Proteasome subunit alpha type OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013497 PE=3 SV=1	26308	17,1	1,49	0,6	0,91

K1QWX0	CGI_10020335 CGI_10024017	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020335 PE=4 SV=1	34708	12,27	1,49	0,54	0,98
K1QLT5	CGI_10015357	26S protease regulatory subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015357 PE=4 SV=1	97466	17,46	1,48	0,59	0,94
K1P5V7	CGI_10010150	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010150 PE=3 SV=1	119973	11,35	1,48	0,32	1,2
K1R6E9	CGI_10020655	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020655 PE=3 SV=1	44615	17,14	1,47	0,55	0,98
K1QK84	CGI_10005207	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005207 PE=4 SV=1	13201	11,83	1,47	0,48	1,06
K1RGY3	CGI_10019899	Nucleolar protein 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019899 PE=3 SV=1	131250	25,92	1,46	0,63	0,91
K1RHV4	CGI_10014833	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014833 PE=3 SV=1	8968	25,92	1,46	0,63	0,91
K1RZH9	CGI_10007041	Purple acid phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007041 PE=3 SV=1	17450	24,66	1,46	0,47	1,07
K1PMT6	CGI_10015594	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015594 PE=4 SV=1	84135	22,45	1,46	0,51	1,04
K1QSB2	CGI_10019584	26S protease regulatory subunit 6B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019584 PE=3 SV=1	47459	13,66	1,46	0,59	0,95
K1PPH6	CGI_10023343	Kelch domain-containing protein 8B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023343 PE=4 SV=1	37734	12,01	1,46	0,63	0,91
K1Q369	CGI_10028583	C-type mannose receptor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028583 PE=4 SV=1	49968	16,96	1,45	1,37	0,18
K1PNP4	CGI_10017600	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017600 PE=4 SV=1	36934	31,77	1,44	0,54	1,02
K1QZR6	CGI_10018216	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018216 PE=4 SV=1	10948	10,71	1,44	0,62	0,94
K1PC14	CGI_10004022	Proapoptotic caspase adapter protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004022 PE=4 SV=1	23518	19,53	1,43	0,5	1,06
K1QCY0	CGI_10008707	Serine hydroxymethyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008707 PE=3 SV=1	54594	22,22	1,42	0,54	1,04
K1Q3W2	CGI_10023367	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023367 PE=3 SV=1	48601	14,18	1,42	0,52	1,06
K1QQK1	CGI_10017011	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017011 PE=4 SV=1	52676	23,5	1,41	0,53	1,06
K1R5V4	CGI_10020105	GTP-binding nuclear protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020105 PE=3 SV=1	24118	19,08	1,41	0,55	1,04
K1QMG8	CGI_10013734	Putative pyridoxine biosynthesis SNZERR OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013734 PE=3 SV=1	32938	12,49	1,41	0,59	1
K1RGD5	CGI_10002296	F-box only protein 36 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002296 PE=4 SV=1	24017	11,46	1,41	0,56	1,03
K1PE00	CGI_10007570	Tubulin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007570 PE=3 SV=1	52854	10,64	1,41	0,49	1,1
K1Q318	CGI_10020942	Splicing factor 3 subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020942 PE=4 SV=1	85066	35,8	1,4	0,54	1,07
K1QAG0	CGI_10016312	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016312 PE=4 SV=1	139753	25,62	1,4	0,55	1,06
K1R3V8	CGI_10019314	COP9 signalosome complex subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019314 PE=4 SV=1	46498	18,79	1,4	0,29	1,3
K1PH31	CGI_10014628	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014628 PE=3 SV=1	41298	18,58	1,4	0,39	1,21
K1Q596	CGI_10006178	Phosphoserine phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006178 PE=4 SV=1	26054	13,34	1,4	0,28	1,32
K1RF70	CGI_10010891	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3' 5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010891 PE=4 SV=1	14945	15	1,39	0,48	1,13
K1QBG8	CGI_10014715	Proteasome subunit beta type-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014715 PE=4 SV=1	77597	31,67	1,36	0,59	1,05
K1QMJ8	CGI_10020494	Transcription initiation factor IIA subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020494 PE=4 SV=1	27535	23,71	1,36	0,5	1,14
K1QLK6	CGI_10009575	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009575 PE=4 SV=1	479761	15,97	1,36	0,47	1,17
K1Q1I2	CGI_10001808	26S protease regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001808 PE=3 SV=1	46498	27,2	1,35	0,55	1,1
K1Q9Z6	CGI_10009677	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009677 PE=4 SV=1	36886	20,15	1,35	0,33	1,31
K1R6F1	CGI_10025667	Proteasome subunit alpha type OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025667 PE=3 SV=1	28039	19,55	1,34	0,63	1,03
K1S0P1	CGI_10026504	Kinesin-related protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026504 PE=3 SV=1	111272	14,87	1,34	0,47	1,19
K1RCN6	CGI_10018878	Plancitoxin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018878 PE=4 SV=1	40207	11,14	1,34	0,58	1,08
K1Q5D3	CGI_10016244	GMP reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016244 PE=3 SV=1	39869	10,44	1,34	0,54	1,11
K1PUE0	CGI_10014929	Cystathionine beta-synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014929 PE=3 SV=1	71149	22,68	1,32	0,53	1,15
K1QVR0	CGI_10014835	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014835 PE=4 SV=1	30836	12,26	1,32	0,51	1,17
K1PR75	CGI_10010399	DnaJ-like protein subfamily A member 2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010399 PE=4 SV=1	18583	11,05	1,32	0,29	1,39
K1QNR3	CGI_10012572	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012572 PE=4 SV=1	111793	14,91	1,31	0,39	1,29
K1PDC6	CGI_10003170	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003170 PE=3 SV=1	23570	27,48	1,3	0,67	1,04
K1RKZ5	CGI_10005537	DNA damage-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005537 PE=4 SV=1	129438	16,26	1,3	0,45	1,25
K1QTK2	CGI_10021062	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021062 PE=4 SV=1	22237	30,82	1,28	0,52	1,2
K1QGE4	CGI_10021989	Proteasome endopeptidase complex (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021989 PE=3 SV=1	18368	11,75	1,28	0,52	1,2
K1QRM9	CGI_10011146	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011146 PE=4 SV=1	31493	26,6	1,26	0,45	1,29
K1QGQ4	CGI_10024548	Uridine 5'-monophosphate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024548 PE=3 SV=1	53505	18,14	1,26	0,19	1,55
K1PIP8	CGI_10008865	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008865 PE=3 SV=1	25460	15,89	1,26	0,66	1,08
K1RAZ8	CGI_10013074	Prenylcysteine oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013074 PE=4 SV=1	72946	10,64	1,26	0,54	1,2
K1PRK2	CGI_10009974	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009974 PE=4 SV=1	29246	11,94	1,24	0,64	1,11

K1RAE9	CGI_10016837	ADP-ribosylation factor-like protein 8A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016837 PE=3 SV=1	21374	16,96	1,23	1,37	0,4
K1PCR9	CGI_10008810	Proteasome endopeptidase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008810 PE=3 SV=1	27743	10,19	1,23	0,66	1,11
K1Q8C5	CGI_10020391	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX47 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020391 PE=3 SV=1	130751	19,02	1,22	0,41	1,37
K1Q7K0	CGI_10007785	Putative serine carboxypeptidase CPVL OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007785 PE=3 SV=1	58210	18,3	1,21	0,5	1,28
K1R008	CGI_10019443	Proteasome subunit alpha type OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019443 PE=3 SV=1	27996	21,43	1,2	0,6	1,2
K1S1S1	CGI_10020147	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020147 PE=4 SV=1	46056	17,23	1,2	0,26	1,54
K1QAY3	CGI_10017854	Dipeptidyl-peptidase 1 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017854 PE=3 SV=1	44672	17,14	1,2	0,53	1,27
K1PPM3	CGI_10010244	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010244 PE=4 SV=1	77173	11,99	1,2	0,53	1,27
K1QHT8	CGI_10023785	RNA-binding protein 8A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023785 PE=3 SV=1	62686	11,53	1,19	0,58	1,23
K1R7N8	CGI_10023329	Proteasome endopeptidase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023329 PE=3 SV=1	21249	19,74	1,18	0,55	1,27
K1QF01	CGI_10016741	40S ribosomal protein S4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016741 PE=3 SV=1	27515	15,81	1,18	0,56	1,25
K1QSA2	CGI_10025345	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025345 PE=3 SV=1	47570	12,15	1,18	0,62	1,2
K1QKL1	CGI_10018219	DNA-directed RNA polymerases I II and III subunit RPABC3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018219 PE=4 SV=1	12592	14,99	1,17	0,46	1,37
K1PG07	CGI_10005904	Lupus La-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005904 PE=4 SV=1	65606	13,17	1,17	0,61	1,22
K1RJ91	CGI_10023422	Ubiquitin-associated protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023422 PE=4 SV=1	149103	17,85	1,12	0,24	1,64
K1QUK4	CGI_10014273	Protein SET OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014273 PE=3 SV=1	37929	17,26	1,12	0,64	1,24
K1PWP4	CGI_10005385	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005385 PE=4 SV=1	56201	15,89	1,12	0,51	1,38
K1QE94	CGI_10019827	Alpha-galactosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019827 PE=3 SV=1	60569	11,51	1,12	0,62	1,26
K1QS22	CGI_10013384	UPF0160 protein MYG1 mitochondrial (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013384 PE=4 SV=1	39219	12,11	1,11	0,62	1,27
K1RCW5	CGI_10022856	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022856 PE=4 SV=1	171240	10,54	1,11	0,62	1,27
K1QLH0	CGI_10024227	Peroxiredoxin-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024227 PE=4 SV=1	27525	15,59	1,1	0,47	1,42
K1PY51	CGI_10024279	Threonyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024279 PE=4 SV=1	35389	36,78	1,09	0,62	1,29
K1P8B7	CGI_10007222	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007222 PE=3 SV=1	14700	11,57	1,09	0,6	1,31
K1QEK7	CGI_10007216	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007216 PE=3 SV=1	89265	30,12	1,07	0,33	1,6
K1PVF6	CGI_10011558	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011558 PE=3 SV=1	30059	11,53	1,06	0,63	1,32
K1RLX8	CGI_10020996	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020996 PE=4 SV=1	59866	13,25	1,05	0,26	1,69
K1Q2H5	CGI_10017255	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017255 PE=3 SV=1	65241	20,4	1,04	0,58	1,38
K1QQV1	CGI_10022001	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022001 PE=4 SV=1	41965	13	1,04	0,55	1,41
K1Q6X5	CGI_10026048	Protein disulfide-isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026048 PE=3 SV=1	55500	16,89	1,03	0,58	1,39
K1PKK2	CGI_10008601	Serine dehydratase-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008601 PE=4 SV=1	8330	10,94	1,03	0,51	1,46
K1PGU1	CGI_10000487	Eukaryotic translation initiation factor 4E OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000487 PE=3 SV=1	22010	10,28	1,03	0,47	1,49
K1Q8K2	CGI_10013833	Importin subunit alpha OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013833 PE=3 SV=1	55909	11,14	1,01	0,46	1,52
K1PNR3	CGI_10015202	Clathrin heavy chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015202 PE=3 SV=1	191892	13,26	1	0,62	1,38
K1Q4C3	CGI_10006585	Fumarylacetoacetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006585 PE=4 SV=1	46288	26,6	0,98	0,65	1,37
K1QC26	CGI_10025772	Plasma alpha-L-fucosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025772 PE=3 SV=1	52803	11,73	0,97	0,63	1,4
K1PYE5	CGI_10003737	Acyl-CoA synthetase family member 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003737 PE=4 SV=1	62162	12,4	0,96	0,52	1,52
K1PJC1	CGI_10003372	Adipophilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003372 PE=3 SV=1	54040	11,93	0,95	1,44	0,61
K1PB94	CGI_10011426	ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011426 PE=4 SV=1	84606	11,58	0,95	0,42	1,63
K1PFD5	CGI_10002040	Spermidine synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002040 PE=3 SV=1	33736	10,97	0,95	0,65	1,4
K1QZX2	CGI_10009528	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009528 PE=3 SV=1	66727	10,66	0,95	0,65	1,4
K1QCC9	CGI_10019057	Protein disulfide-isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019057 PE=3 SV=1	71521	18,69	0,94	0,55	1,51
K1PM60	CGI_10007126	Spermidine synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007126 PE=3 SV=1	33267	22,58	0,92	0,55	1,53
K1R7Q8	CGI_10013503	Transporter OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013503 PE=3 SV=1	81414	11,72	0,91	0,65	1,43
K1PW06	CGI_10003521	Filamin-C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003521 PE=4 SV=1	323737	12,47	0,9	1,47	0,63
K1PS57	CGI_10019586	Putative RNA-binding protein EIF1AD OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019586 PE=4 SV=1	18704	15,01	0,88	0,52	1,59
K1QA50	CGI_10014337	V-type proton ATPase subunit H OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014337 PE=3 SV=1	55442	12,74	0,88	0,59	1,53
K1RGB7	CGI_10010072	Epidermal retinal dehydrogenase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010072 PE=3 SV=1	33742	13,76	0,87	0,28	1,85
K1P2B8	CGI_10017702	GDP-mannose 4 6 dehydratase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017702 PE=3 SV=1	42810	13,69	0,86	0,48	1,65
K1PIB7	CGI_10011753	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011753 PE=4 SV=1	82692	10,92	0,85	0,42	1,72
K1QGB4	CGI_10005808	40S ribosomal protein S17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005808 PE=3 SV=1	16233	10,13	0,83	0,46	1,71

K1QGB4	CGI_10005808	40S ribosomal protein S17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005808 PE=3 SV=1	16233	10,13	0,83	0,46	1,71
K1QB76	CGI_10028811	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028811 PE=4 SV=1	110405	10,02	0,79	0,62	1,59
K1QFJ4	CGI_10006249	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006249 PE=4 SV=1	101096	22,74	0,77	0,61	1,62
K1PK85	CGI_10008933	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008933 PE=4 SV=1	138764	14,7	0,77	0,43	1,79
K1R282	CGI_10026893	Adenylate kinase isoenzyme 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026893 PE=3 SV=1	99843	11,51	0,72	0,48	1,81
K1QRW5	CGI_10017862	Arginase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017862 PE=3 SV=1	38199	12,22	0,7	0,64	1,66
K1PWR0	CGI_10018072	Protein SET OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018072 PE=3 SV=1	28104	11,55	0,7	0,6	1,7
K1RGF4	CGI_10014208	Alanine aminotransferase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014208 PE=4 SV=1	51342	21,02	0,66	1,13	1,22
K1S4Y8	CGI_10016359	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016359 PE=4 SV=1	65713	16,42	0,66	0,47	1,87
K1PQI4	CGI_10004564	Enolase-phosphatase E1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004564 PE=3 SV=1	34671	14,74	0,66	0,8	1,55
K1RH58	CGI_10003110	Alpha-actinin sarcomeric OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003110 PE=4 SV=1	102195	17,76	0,65	1,05	1,3
K1S058	CGI_10018619	Transcription factor RFX3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018619 PE=4 SV=1	112075	14,11	0,65	0,85	1,51
K1Q7M3	CGI_10010897	Proline iminopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010897 PE=3 SV=1	37544	13,72	0,65	0,88	1,47
K1Q4Q4	CGI_10009219	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009219 PE=3 SV=1	34367	12,74	0,65	0,26	2,1
K1Q1I3	CGI_10011934	Ornithine aminotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011934 PE=3 SV=1	47450	10,89	0,65	0,93	1,41
K1R1I0	CGI_10022305	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022305 PE=4 SV=1	16110	17,32	0,64	0,5	1,86
K1QT28	CGI_10016928	Ectoine hydroxylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016928 PE=4 SV=1	81843	10,77	0,64	0,9	1,46
K1QTP1	CGI_10021123	Dipeptidyl peptidase family member 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021123 PE=4 SV=1	73632	11,56	0,63	1,03	1,33
K1PE57	CGI_10002689	Severin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002689 PE=4 SV=1	37210	10,43	0,63	0,96	1,41
K1RLZ7	CGI_10021018	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021018 PE=4 SV=1	37160	21,81	0,62	0,72	1,66
K1RNB6	CGI_10015523	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015523 PE=3 SV=1	55217	19,45	0,62	0,79	1,59
K1QFS4	CGI_10013850	Actin-related protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013850 PE=3 SV=1	44557	11,71	0,62	1,29	1,09
K1R1K6	CGI_10017582	Heat shock protein beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017582 PE=3 SV=1	27702	11,95	0,61	1,63	0,76
K1RNJ2	CGI_10027529	Hydroxyacylglutathione hydrolase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027529 PE=3 SV=1	31659	17,09	0,6	0,66	1,74
K1QCB0	CGI_10009651	40S ribosomal protein S5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009651 PE=4 SV=1	14190	10,65	0,6	1,02	1,38
K1Q9C8	CGI_10014941	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014941 PE=4 SV=1	31043	17,58	0,57	0,71	1,72
K1Q463	CGI_10007355	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007355 PE=3 SV=1	28957	17,44	0,57	0,77	1,66
K1RGD1	CGI_10003285	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003285 PE=3 SV=1	63676	15,57	0,57	0,92	1,5
K1QVE8	CGI_10026539	Phosphoacetylglucosamine mutase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026539 PE=3 SV=1	59910	13,89	0,57	0,95	1,49
K1R627	CGI_10015045	Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015045 PE=3 SV=1	40820	13,16	0,57	0,87	1,57
K1QR72	CGI_10017163	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017163 PE=3 SV=1	84168	14,74	0,56	0,74	1,7
K1QK25	CGI_10002917	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002917 PE=4 SV=1	136033	10,49	0,56	0,71	1,73
K1PZU6	CGI_10024363	Plasma glutamate carboxypeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024363 PE=4 SV=1	48081	14,31	0,55	0,9	1,55
K1RK73	CGI_10028199	Calcyphosin-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028199 PE=4 SV=1	30571	11,97	0,55	0,53	1,92
K1QI97	CGI_10022483	Adenylyl cyclase-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022483 PE=3 SV=1	67293	11,86	0,55	1,01	1,44
K1QP10	CGI_10013699	Alpha-parvin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013699 PE=4 SV=1	20618	10,56	0,55	0,63	1,82
K1S2N7	inx CGI_10022112	Innexin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=inx PE=3 SV=1	232594	12,65	0,54	0,31	2,15
K1RLT0	CGI_10020559	D-erythrulose reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020559 PE=4 SV=1	25953	16,22	0,53	0,91	1,56
K1QT91	CGI_10012729	LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012729 PE=4 SV=1	155065	15,38	0,53	1,08	1,39
K1RBF6	CGI_10018053	Uncharacterized protein yfeX OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018053 PE=4 SV=1	39593	10,74	0,53	1,01	1,46
K1P137	CGI_10000611	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000611 PE=3 SV=1	16686	10,74	0,53	0,77	1,7
K1R9C2	CGI_10015243	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015243 PE=4 SV=1	38706	10,6	0,53	0,72	1,75
K1R9A7	CGI_10023521	Glycogenin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023521 PE=2 SV=1	59834	10,19	0,53	1,05	1,42
K1QCX0	CGI_10008695	V-type proton ATPase subunit F OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008695 PE=4 SV=1	104612	10,09	0,53	0,89	1,58
K1QKU3	CGI_10023805	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023805 PE=4 SV=1	24604	10,01	0,53	1,1	1,37
K1PTA7	CGI_10007277	3-ketoacyl-CoA thiolase B peroxisomal OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007277 PE=4 SV=1	11370	16,53	0,52	0,86	1,61
K1PG84	CGI_10000045 CGI_10019425	Glutaredoxin-C6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000045 PE=4 SV=1	11569	14,73	0,52	0,65	1,83
K1PXJ8	CGI_10004549	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004549 PE=4 SV=1	59245	10,25	0,52	0,89	1,59
K1Q6Z7	CGI_10024383	DDB1-and CUL4-associated factor 15 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024383 PE=4 SV=1	83974	12	0,51	1,41	1,08
K1PJY2	CGI_10009354	Inositol polyphosphate 1-phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009354 PE=4 SV=1	82346	10,22	0,51	0,93	1,56
K1R0F1	CGI_10010064	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010064 PE=4 SV=1	34578	10,03	0,51	0,87	1,62

K1QAR9	CGI_10011808	Fermitin family-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011808 PE=4 SV=1	70304	12,16	0,5	1,18	1,32
K1PY48	CGI_10024274	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024274 PE=3 SV=1	23874	14,67	0,49	1,21	1,3
K1PQZ3	CGI_10010784	Armadillo repeat-containing protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010784 PE=4 SV=1	119666	14,11	0,49	0,45	2,06
K1S5N3	CGI_10023886	Phosphotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023886 PE=3 SV=1	51599	11,8	0,49	0,82	1,68
K1QFC1	CGI_10006472	Sodium-and chloride-dependent GABA transporter ine OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006472 PE=4 SV=1	84710	16,81	0,48	1,16	1,35
K1Q5P9	CGI_10027463	Neuroendocrine convertase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027463 PE=3 SV=1	73018	14,96	0,48	0,64	1,87
K1Q3F4	CGI_10027722	Inorganic pyrophosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027722 PE=4 SV=1	48340	13,88	0,48	0,99	1,54
K1RB89	CGI_10019208	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019208 PE=3 SV=1	53446	11,61	0,48	1,01	1,51
K1QGJ2	CGI_10001818	Uridine phosphorylase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001818 PE=4 SV=1	34683	11,25	0,48	0,73	1,78
K1PGD2	CGI_10017704	Putative aminopeptidase NPEPL1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017704 PE=4 SV=1	55944	20,15	0,47	0,86	1,68
K1PWS2	CGI_10018083	Alpha-aspartyl dipeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018083 PE=4 SV=1	37446	14,78	0,47	1,07	1,46
K1QFI9	CGI_10020328	Phosphotriesterase-related protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020328 PE=3 SV=1	38543	14,32	0,47	0,82	1,71
K1R9R1	CGI_10009709	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009709 PE=3 SV=1	31524	12,29	0,47	0,69	1,84
K1RK66	CGI_10009905	Peptidoglycan recognition protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009905 PE=4 SV=1	53961	10,84	0,47	1,34	1,19
K1R109	CGI_10025422	Malate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025422 PE=4 SV=1	36780	25,23	0,46	0,83	1,71
K1PBH1	CGI_10004435	Sarcoplasmic calcium-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004435 PE=4 SV=1	20680	18,61	0,46	0,9	1,64
K1QU66	CGI_10014801	Aminoacylase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014801 PE=4 SV=1	48833	16,46	0,46	1,09	1,45
K1QBH3	CGI_10010724	Alpha-methylacyl-CoA racemase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010724 PE=4 SV=1	41579	13,96	0,46	0,94	1,6
K1PPH3	CGI_10005397	Temptin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005397 PE=4 SV=1	19168	13,55	0,46	1,22	1,32
K1QK30	CGI_10007641	S-adenosylmethionine synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007641 PE=3 SV=1	44415	13,01	0,46	0,97	1,57
K1P6I1	CGI_10009277	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009277 PE=3 SV=1	35018	10,75	0,45	1,3	1,25
K1Q2K8	CGI_10005470	Glutathione peroxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005470 PE=4 SV=1	26545	10,3	0,45	0,88	1,67
K1QPM9	CGI_10011204	Fatty acid-binding protein brain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011204 PE=4 SV=1	15312	20,26	0,44	0,93	1,63
K1RNB2	CGI_10024319	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024319 PE=3 SV=1	34714	17,19	0,44	0,88	1,67
K1Q954	CGI_10002827	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002827 PE=3 SV=1	34887	17,19	0,44	0,88	1,67
K1PVV6	CGI_10000669	Putative aminopeptidase W07G4.4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000669 PE=4 SV=1	55710	33	0,43	0,81	1,76
K1Q307	CGI_10012398	Dihydrodipicolinate synthase-like mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012398 PE=4 SV=1	13628	18,82	0,43	1,07	1,5
K1QPL8	CGI_10019696	RNA-binding motif single-stranded-interacting protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019696 PE=4 SV=1	35984	11,18	0,43	1,26	1,31
K1PHQ8	CGI_10004635	Metalloendopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004635 PE=4 SV=1	137435	17,32	0,42	1,02	1,56
K1QBB5	CGI_10023385	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023385 PE=4 SV=1	38458	12,82	0,42	0,95	1,63
K1QSY6	CGI_10009070	Tetratricopeptide repeat protein 38 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009070 PE=4 SV=1	19622	12,77	0,42	0,72	1,86
K1Q1A3	CGI_10002037	UPF0124 protein C13orf31 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002037 PE=4 SV=1	38856	17,62	0,41	0,76	1,83
K1P188	CGI_10000577	Histone-lysine N-methyltransferase PRDM9 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000577 PE=4 SV=1	60239	13,09	0,41	0,81	1,78
K1QPQ6	CGI_10028532	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028532 PE=4 SV=1	61810	32,56	0,4	1,68	0,92
K1PGS0	CGI_10005256	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005256 PE=4 SV=1	22297	18,32	0,4	0,75	1,85
K1QLU2	CGI_10017638	Serine protease inhibitor dipetalogastin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017638 PE=4 SV=1	36678	13,68	0,4	1,6	0,99
K1PLX6	CGI_10007415	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007415 PE=4 SV=1	38399	13,14	0,4	1,25	1,35
K1QXS3	CGI_10025808	4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025808 PE=3 SV=1	50068	12,96	0,4	0,94	1,66
K1R4H7	CGI_10014090	Purine nucleoside phosphorylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014090 PE=4 SV=1	73352	12,29	0,39	0,78	1,84
K1QUQ2	CGI_10023850	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023850 PE=3 SV=1	15865	24,57	0,38	0,99	1,63
K1PYB0	CGI_10027462	Cofilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027462 PE=3 SV=1	18617	17,07	0,38	1,1	1,52
K1RE34	CGI_10010762	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010762 PE=4 SV=1	82541	16,7	0,38	0,63	1,99
K1RNG6	CGI_10027501	Serine--pyruvate aminotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027501 PE=3 SV=1	42852	13,75	0,38	0,86	1,76
K1QJL8	CGI_10021044	Alpha-mannosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021044 PE=3 SV=1	120627	10,76	0,36	0,49	2,15
K1Q4W6	CGI_10025850	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025850 PE=4 SV=1	84522	16,26	0,35	0,94	1,71
K1R2N6	CGI_10021010	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021010 PE=4 SV=1	25641	15,22	0,35	0,93	1,72
K1PFJ8	CGI_10001875	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001875 PE=4 SV=1	22682	16,18	0,33	0,95	1,73
K1S6S4	CGI_10022332	Metalloendopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022332 PE=4 SV=1	37330	10,93	0,33	1,04	1,62
K1PR19	CGI_10004188	Sulfotransferase 1C4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004188 PE=4 SV=1	34329	16,66	0,31	0,75	1,94
K1Q8V9	CGI_10012293	Agmatinase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012293 PE=3 SV=1	36607	15,92	0,31	0,83	1,87

K1RZ99	CGI_10012231	Filamin-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012231 PE=4 SV=1	90767	15,22	0,31	1,54	1,14
K1P2H1	CGI_10016767	Fatty acid-binding protein adipocyte OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016767 PE=4 SV=1	14307	12,84	0,31	0,91	1,78
K1QKM4	CGI_10007621	Xylose isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007621 PE=3 SV=1	99065	10,03	0,31	0,93	1,75
K1QRR1	CGI_10011301	Calmodulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011301 PE=4 SV=1	17849	14,39	0,3	1,2	1,49
K1R0U2	CGI_10028928	Peptidase M20 domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028928 PE=4 SV=1	50630	10,18	0,3	0,44	2,26
K1RYF7	CGI_10011376	Heat shock protein beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011376 PE=3 SV=1	19687	19,72	0,29	0,28	2,43
K1QRG3	CGI_10026323	Guanine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026323 PE=4 SV=1	50046	28,61	0,28	1,02	1,7
K1PI52	CGI_10017903	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017903 PE=3 SV=1	41381	28,71	0,27	0,95	1,78
K1QN94	CGI_10007012	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007012 PE=4 SV=1	28437	27,86	0,27	1,09	1,63
K1QFK6	CGI_10020344	Troponin C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020344 PE=4 SV=1	25651	18,9	0,27	1,48	1,24
K1PNZ5	CGI_10003355	Catalase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003355 PE=3 SV=1	58005	17,05	0,27	0,88	1,85
K1PLF9	CGI_10021481	Arginine kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021481 PE=3 SV=1	39624	16,1	0,27	0,8	1,93
K1RDX5	CGI_10022249	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022249 PE=3 SV=1	26920	15,49	0,27	1,23	1,5
K1R8W7	CGI_10021946	Fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021946 PE=4 SV=1	35860	11,26	0,27	0,93	1,8
K1PSR5	CGI_10008477	Fatty acid-binding protein heart OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008477 PE=4 SV=1	14930	22,4	0,26	1,1	1,64
K1QFV5	CGI_10013163	Tropomyosin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013163 PE=4 SV=1	33730	15,05	0,26	1,03	1,71
K1Q585	CGI_10016721	Cathepsin L OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016721 PE=3 SV=1	36987	10,16	0,26	1,02	1,72
K1S0J9	CGI_10021277	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021277 PE=4 SV=1	30761	21,64	0,25	1,89	0,86
K1PXC3	CGI_10025810	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025810 PE=4 SV=1	35248	11,49	0,25	1,98	0,77
K1Q1P4	CGI_10001563	Leukocyte elastase inhibitor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001563 PE=3 SV=1	61063	16,28	0,24	1,42	1,34
K1QY41	CGI_10026345	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026345 PE=4 SV=1	13393	14,21	0,24	1,22	1,54
K1R4S7	CGI_10021264	Ras-related protein Rab-10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021264 PE=4 SV=1	24208	11,78	0,24	1,2	1,56
K1PMY9	CGI_10006482	Calmodulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006482 PE=4 SV=1	80200	10,66	0,24	1,05	1,71
K1PH24	CGI_10020905	Uncharacterized protein C11D3.13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020905 PE=4 SV=1	39860	12,97	0,23	1,11	1,67
K1RFD8	CGI_10010026	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010026 PE=4 SV=1	16047	12,57	0,23	1,51	1,26
K1PV71	CGI_10006552	Calumenin-B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006552 PE=4 SV=1	36657	16,56	0,22	0,84	1,94
K1Q3P8	CGI_10028727	Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX4 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028727 PE=3 SV=1	49983	14,85	0,22	0,69	2,09
K1Q0U6	CGI_10024026	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024026 PE=4 SV=1	27042	12,49	0,22	0,94	1,84
K1R1A1	CGI_10013781	Xanthine dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013781 PE=4 SV=1	175159	14,26	0,21	0,78	2,02
K1QET9	CGI_10027363	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027363 PE=4 SV=1	45650	17,99	0,2	1,13	1,67
K1Q8P5	CGI_10021822	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021822 PE=4 SV=1	35277	24,29	0,19	1,53	1,28
K1QQ59	CGI_10024994	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024994 PE=4 SV=1	71178	10,17	0,19	1,51	1,3
K1QXM1	CGI_10012583	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012583 PE=4 SV=1	10668	10,95	0,18	1,66	1,15
K1QPB7	CGI_10020432	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020432 PE=4 SV=1	27147	12,33	0,15	0,72	2,13
K1RA17	CGI_10023658	Tetraspanin-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023658 PE=3 SV=1	67253	28,97	0,14	2,24	0,62
K1QTN3	CGI_10017498	Glycosyltransferase 25 family member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017498 PE=4 SV=1	69860	10,08	0,13	0,37	2,5
K1QNV6	CGI_10013164	Tropomyosin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013164 PE=3 SV=1	39009	22,92	0,11	1,03	1,86
K1PNR5	CGI_10015207	Aldo-keto reductase family 1 member B10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015207 PE=4 SV=1	25846	11,81	0,07	0,37	2,56
K1Q3E1	CGI_10024986	Hyaluronan mediated motility receptor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024986 PE=4 SV=1	164810	17,61	0,05	1,08	1,87

Crassostrea gigas - Stade 1			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nalpha
K1QWP6	CGI_10001544	Protein boule OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001544 PE=4 SV=1	12876	55,34	1,95	0,05
K1Q411	CGI_10013042	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013042 PE=4 SV=1	22181	20,58	1,94	0,06
K1Q923	CGI_10010075	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010075 PE=3 SV=1	81504	39,08	1,93	0,07
K1R473	CGI_10018930	Tubulin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018930 PE=3 SV=1	50843	35,57	1,91	0,09
K1PJG0	CGI_10015188	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015188 PE=4 SV=1	25796	25,84	1,9	0,1
K1QPJ1	CGI_10021674	Actin cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021674 PE=3 SV=1	41657	35,94	1,89	0,11
K1QE71	CGI_10012072	DNA helicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012072 PE=3 SV=1	102070	26,9	1,87	0,13
K1RS60	CGI_10023224	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023224 PE=4 SV=1	23134	31,11	1,86	0,14
K1QXH7	CGI_10002989	DNA replication licensing factor mcm4-B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002989 PE=4 SV=1	18105	17,79	1,82	0,18
K1R0M4	CGI_10007787	Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007787 PE=4 SV=1	10251	16,33	1,82	0,18
K1RDT2	CGI_10026256	WD repeat-containing protein 16 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026256 PE=4 SV=1	73787	20,31	1,81	0,19
K1RU07	CGI_10022743	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022743 PE=4 SV=1	108564	26,76	1,79	0,21
K1R7V7	CGI_10012330	Tubulin beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012330 PE=3 SV=1	49936	26,43	1,79	0,21
K1Q648	CGI_10013438	Dpy-30-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013438 PE=4 SV=1	10933	18,77	1,79	0,21
K1RN77	CGI_10019269	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019269 PE=4 SV=1	72947	25,12	1,78	0,22
K1QVS2	CGI_10009327	Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009327 PE=3 SV=1	44701	28,01	1,76	0,24
K1PWD9	CGI_10010679	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010679 PE=4 SV=1	13100	24,48	1,76	0,24
K1PYA2	CGI_10017362	Host cell factor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017362 PE=4 SV=1	111377	22,13	1,76	0,24
K1QJA7	CGI_10026359	Histone chaperone asf1-B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026359 PE=4 SV=1	22660	32,56	1,75	0,25
K1R3W9	CGI_10021337	Replication protein A 14 kDa subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021337 PE=4 SV=1	15553	31,26	1,75	0,25
K1R7G0	CGI_10028470	Chromobox-like protein 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028470 PE=4 SV=1	22438	23,86	1,75	0,25
K1PLW6	CGI_10007448	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007448 PE=4 SV=1	11919	16,23	1,75	0,25
K1QED7	CGI_10016097	Replication protein A subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016097 PE=3 SV=1	69179	36,18	1,74	0,26
K1PD30	CGI_10008446	Putative histone-binding protein Caf1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008446 PE=4 SV=1	44700	32,7	1,74	0,26
K1RD72	CGI_10025060	Protein phosphatase 1G OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025060 PE=3 SV=1	69994	25,64	1,73	0,27
K1QGQ4	CGI_10024548	Uridine 5'-monophosphate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024548 PE=3 SV=1	53505	17,09	1,72	0,28
K1RJG6	CGI_10021635	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021635 PE=4 SV=1	58914	12,94	1,72	0,28
K1QD40	CGI_10022530	Importin-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022530 PE=4 SV=1	135759	10,25	1,72	0,28
K1RI55	CGI_10020146	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020146 PE=4 SV=1	31163	28,06	1,71	0,29
K1QRL6	CGI_10014726	Methenyltetrahydrofolate synthetase domain-containing protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014726 PE=4 SV=1	60482	25,42	1,71	0,29
K1QHY6	CGI_10021678	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021678 PE=4 SV=1	67015	21,14	1,71	0,29
K1S6R2	CGI_10022309	N-acetyltransferase 11 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022309 PE=4 SV=1	27937	15,46	1,71	0,29
K1QG41	CGI_10012328	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012328 PE=4 SV=1	94698	12,71	1,71	0,29
K1RX23	CGI_10027885	Kelch domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027885 PE=4 SV=1	39300	25,89	1,69	0,31
K1QBW6	CGI_10023437	Tudor domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023437 PE=4 SV=1	278652	18,24	1,69	0,31
K1QHY8	CGI_10004246	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004246 PE=4 SV=1	55309	11,59	1,68	0,32
K1QVJ8	CGI_10008757	Piwi-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008757 PE=3 SV=1	99952	26,44	1,67	0,33
K1QUK1	CGI_10023237	Ubiquitin fusion degradation protein 1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023237 PE=4 SV=1	78036	20,12	1,67	0,33
K1PNI1	CGI_10016170	Bifunctional protein NCOAT OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016170 PE=4 SV=1	91874	26,16	1,66	0,34
K1QXJ9	CGI_10025058	Pantothenate kinase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025058 PE=4 SV=1	45577	18,91	1,66	0,34
K1PF10	CGI_10006721	PAN2-PAN3 deadenylation complex catalytic subunit PAN2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=PAN2 PE=3 SV=1	154101	15,09	1,66	0,34
K1R466	CGI_10004346	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004346 PE=3 SV=1	63906	25,02	1,65	0,35
K1QVI0	CGI_10026892	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026892 PE=3 SV=1	66859	12,99	1,65	0,35
K1Q4Z4	CGI_10005314	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005314 PE=4 SV=1	54390	32,35	1,64	0,36
K1R587	CGI_10020803	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020803 PE=4 SV=1	47720	28,41	1,64	0,36
K1RAJ1	CGI_10018918	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018918 PE=3 SV=1	75318	24,79	1,64	0,36
K1P5V7	CGI_10010150	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010150 PE=3 SV=1	119973	18,09	1,64	0,36
K1Q5G9	CGI_10018487	SUMO-activating enzyme subunit 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018487 PE=4 SV=1	68427	26,99	1,63	0,37

K1QBL6	CGI_10011771	Tudor domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011771 PE=4 SV=1	257824	21,19	1,63	0,37
K1P8G1	CGI_10007212	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007212 PE=4 SV=1	58627	17,34	1,63	0,37
K1PHA7	CGI_10013873	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013873 PE=4 SV=1	41150	13,21	1,63	0,37
K1QNR3	CGI_10012572	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012572 PE=4 SV=1	111793	21,85	1,62	0,38
K1PQE3	CGI_10011751	RNA-binding protein Raly OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011751 PE=4 SV=1	32552	17,25	1,62	0,38
K1QX84	CGI_10008421	Ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008421 PE=4 SV=1	36970	16,61	1,62	0,38
K1Q9G3	CGI_10019894	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019894 PE=3 SV=1	39658	18,27	1,61	0,39
K1PH25	CGI_10014623	Methionyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014623 PE=4 SV=1	35541	13,99	1,61	0,39
K1RQJ6	CGI_10013595	Enhancer of mRNA-decapping protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013595 PE=4 SV=1	163796	29,78	1,6	0,4
K1PJZ5	CGI_10006154	5'-nucleotidase domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006154 PE=4 SV=1	40499	21,25	1,6	0,4
K1RJH5	CGI_10021647	Polyadenylate-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021647 PE=3 SV=1	71660	20,86	1,6	0,4
K1RUW0	CGI_10028125	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028125 PE=4 SV=1	282294	20,07	1,6	0,4
K1PJP9	CGI_10012066	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012066 PE=3 SV=1	74241	17,14	1,6	0,4
K1QKA9	CGI_10014604	Piwi-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014604 PE=3 SV=1	127701	23,68	1,59	0,41
K1QLK6	CGI_10009575	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009575 PE=4 SV=1	479761	22,76	1,59	0,41
K1QYH6	CGI_10028221	COP9 signalosome complex subunit 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028221 PE=4 SV=1	48224	20,46	1,59	0,41
K1QXK7	CGI_10015504	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015504 PE=4 SV=1	40996	16,01	1,59	0,41
K1RL88	CGI_10020498	Dynein light chain 1 axonemal (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020498 PE=4 SV=1	21088	13,62	1,59	0,41
K1RY67	CGI_10026963	Uncharacterized protein C11orf70-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026963 PE=4 SV=1	25256	36,86	1,58	0,42
K1PX47	CGI_10013187	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013187 PE=3 SV=1	36541	19,76	1,58	0,42
K1QLQ6	CGI_10022531	Thioredoxin domain-containing protein C2F3.12c OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022531 PE=4 SV=1	23282	18,83	1,58	0,42
K1S1S1	CGI_10020147	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020147 PE=4 SV=1	46056	14,76	1,58	0,42
K1PH10	CGI_10014652	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014652 PE=4 SV=1	47629	14,69	1,58	0,42
K1PGU3	CGI_10015286	Beta-1 3-glucosyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015286 PE=4 SV=1	57004	12,68	1,58	0,42
K1PE00	CGI_10007570	Tubulin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007570 PE=3 SV=1	52854	22,54	1,57	0,43
K1R2N0	CGI_10008056 CGI_10008061	Histone H4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008056 PE=3 SV=1	11367	14,77	1,57	0,43
K1PTC2	CGI_10002799	c-Myc-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002799 PE=4 SV=1	12285	14,49	1,57	0,43
K1R7D7	CGI_10013963	Poly(A)-specific ribonuclease PARN OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013963 PE=4 SV=1	55085	11,63	1,57	0,43
K1R1F0	CGI_10005536	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005536 PE=4 SV=1	68725	42,24	1,56	0,44
K1P6B3	CGI_10009642	Endoplasmic reticulum resident protein ERp44 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009642 PE=4 SV=1	44796	25,28	1,56	0,44
K1PH31	CGI_10014628	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014628 PE=3 SV=1	41298	24,04	1,56	0,44
K1R8I8	CGI_10024545	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024545 PE=3 SV=1	52060	23,62	1,56	0,44
K1R0S3	CGI_10002375	T-complex protein 1 subunit theta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002375 PE=3 SV=1	83143	20,26	1,56	0,44
K1R586	CGI_10015695	Vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015695 PE=4 SV=1	28083	18,5	1,56	0,44
K1QZ08	CGI_10000789	Transcription elongation factor B polypeptide 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000789 PE=3 SV=1	20025	16,45	1,56	0,44
K1PJP2	CGI_10012061	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012061 PE=4 SV=1	83036	34,03	1,55	0,45
K1PBM7	CGI_10004293	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004293 PE=3 SV=1	38531	32,02	1,55	0,45
K1QT21	CGI_10014473	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014473 PE=3 SV=1	73871	23,95	1,55	0,45
K1R4Y6	CGI_10014999	Carboxypeptidase D OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014999 PE=4 SV=1	202048	31,72	1,54	0,46
K1QEK7	CGI_10007216	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007216 PE=3 SV=1	89265	26,31	1,54	0,46
K1PR47	CGI_10028301	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028301 PE=3 SV=1	63660	18,63	1,54	0,46
K1S3G2	CGI_10028136	HMGB1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028136 PE=2 SV=1	23342	16,41	1,54	0,46
K1QNG3	CGI_10000633	Small ubiquitin-related modifier OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000633 PE=3 SV=1	10453	15,64	1,54	0,46
K1R7T0	CGI_10025128	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025128 PE=4 SV=1	92375	13,17	1,54	0,46
K1QZR6	CGI_10018216	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018216 PE=4 SV=1	10948	30,43	1,53	0,47
K1QCT3	CGI_10006179	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006179 PE=3 SV=1	18570	26,95	1,53	0,47
K1QSX2	CGI_10014220	Dehydrogenase/reductase SDR family member 13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014220 PE=3 SV=1	50757	25,92	1,53	0,47
K1RD83	CGI_10014474	Serine hydroxymethyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014474 PE=3 SV=1	52479	22,51	1,53	0,47
K1QKK5	CGI_10010435	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010435 PE=3 SV=1	80380	14,47	1,53	0,47
K1QV25	CGI_10020575	Transcription elongation factor B polypeptide 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020575 PE=4 SV=1	12724	14,23	1,53	0,47

K1RLC5	CGI_10015118	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015118 PE=3 SV=1	75011	31,23	1,52	0,48
K1QN54	CGI_10024527	Brain protein 16 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024527 PE=4 SV=1	49317	26,36	1,52	0,48
K1QBA4	CGI_10023361	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023361 PE=3 SV=1	105951	23,59	1,52	0,48
K1RDK5	CGI_10021646	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021646 PE=4 SV=1	31400	22,49	1,52	0,48
K1QRE1	CGI_10023273	COP9 signalosome complex subunit 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023273 PE=4 SV=1	35089	17,99	1,52	0,48
K1QY85	CGI_10024811	Transport protein Sec31A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024811 PE=4 SV=1	132090	15,75	1,52	0,48
K1QKN1	CGI_10017693	Small nuclear ribonucleoprotein F OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017693 PE=3 SV=1	9261	15,14	1,52	0,48
K1R2G7	CGI_10026955	Ran-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026955 PE=4 SV=1	49660	13,45	1,52	0,48
K1QYI9	CGI_10004914	Arginyl-tRNA synthetase cytoplasmic (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004914 PE=3 SV=1	49378	12,64	1,52	0,48
K1PNP4	CGI_10017600	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017600 PE=4 SV=1	36934	26,11	1,51	0,49
K1QZF1	CGI_10024702	WD repeat-containing protein 92 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024702 PE=4 SV=1	39479	25,5	1,51	0,49
K1Q8C5	CGI_10020391	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX47 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020391 PE=3 SV=1	130751	24,85	1,51	0,49
K1R0E1	CGI_10013271	Protein wos2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013271 PE=4 SV=1	20487	20,6	1,51	0,49
K1QK84	CGI_10005207	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005207 PE=4 SV=1	13201	18,25	1,51	0,49
K1Q9W5	CGI_10013567	T-complex protein 1 subunit eta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013567 PE=3 SV=1	46554	17,24	1,51	0,49
K1QGE4	CGI_10021989	Proteasome endopeptidase complex (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021989 PE=3 SV=1	18368	16,71	1,51	0,49
K1QGC9	CGI_10021968	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021968 PE=4 SV=1	73342	16,29	1,51	0,49
K1RMV1	CGI_10022145	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022145 PE=4 SV=1	38020	28,56	1,5	0,5
K1QMJ8	CGI_10020494	Transcription initiation factor IIA subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020494 PE=4 SV=1	27535	24,66	1,5	0,5
K1R8L1	CGI_10021808	Exportin-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021808 PE=4 SV=1	109457	24,15	1,5	0,5
K1PPC3	CGI_10008217 CGI_10016491	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008217 PE=4 SV=1	12516	23,99	1,5	0,5
K1S2I2	CGI_10021410	Kinesin-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021410 PE=3 SV=1	104853	19,17	1,5	0,5
K1R8Y9	CGI_10016518	Translin-associated protein X OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016518 PE=4 SV=1	30188	18,8	1,5	0,5
K1PS69	CGI_10003446	Importin-9 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003446 PE=4 SV=1	219730	10,31	1,5	0,5
K1R5V4	CGI_10020105	GTP-binding nuclear protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020105 PE=3 SV=1	24118	40,85	1,49	0,51
K1QIP0	CGI_10016474	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016474 PE=4 SV=1	55804	18,47	1,49	0,51
K1PRV7	CGI_10009537	Profilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009537 PE=3 SV=1	14245	18,31	1,49	0,51
K1Q9K6	CGI_10008055	Histone H3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008055 PE=3 SV=1	28883	13,13	1,49	0,51
K1QNW9	CGI_10017186	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017186 PE=3 SV=1	187795	11,19	1,49	0,51
K1QZR2	CGI_10011163	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011163 PE=4 SV=1	48404	10,35	1,49	0,51
K1Q0Q0	CGI_10002367	Rab-like protein 2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002367 PE=4 SV=1	25545	10,19	1,49	0,51
K1QKW8	CGI_10003086	Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003086 PE=3 SV=1	49603	36,51	1,48	0,52
K1QWX0	CGI_10020335 CGI_10024017	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020335 PE=4 SV=1	34708	29,88	1,48	0,52
K1PC14	CGI_10004022	Proapoptotic caspase adapter protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004022 PE=4 SV=1	23518	26,07	1,48	0,52
K1Q9Z6	CGI_10009677	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009677 PE=4 SV=1	36886	25,49	1,48	0,52
K1R6C2	CGI_10011875	Peroxisomal 3 2-trans-enoyl-CoA isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011875 PE=4 SV=1	41567	22,49	1,48	0,52
K1S0P1	CGI_10026504	Kinesin-related protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026504 PE=3 SV=1	111272	20,39	1,48	0,52
K1QGH7	CGI_10004035	NACHT and WD repeat domain-containing protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004035 PE=4 SV=1	178458	19,55	1,48	0,52
K1Q5D3	CGI_10016244	GMP reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016244 PE=3 SV=1	39869	17,64	1,48	0,52
K1PPQ7	CGI_10005186	tRNA (guanine(46)-N(7))-methyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005186 PE=3 SV=1	20864	16,99	1,48	0,52
K1QMB9	CGI_10023612	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023612 PE=3 SV=1	127741	11,87	1,48	0,52
K1Q164	CGI_10020378	Stress-activated protein kinase JNK OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020378 PE=4 SV=1	37884	10,79	1,48	0,52
K1PF96	CGI_10006413	Spliceosome RNA helicase BAT1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006413 PE=4 SV=1	55406	29,06	1,47	0,53
K1QRM9	CGI_10011146	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011146 PE=4 SV=1	31493	27,83	1,47	0,53
K1QQK1	CGI_10017011	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017011 PE=4 SV=1	52676	27,69	1,47	0,53
K1Q3W2	CGI_10023367	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023367 PE=3 SV=1	48601	19,55	1,47	0,53
K1R8W3	CGI_10028032	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028032 PE=3 SV=1	18598	19,33	1,47	0,53
K1QFF7	CGI_10006329	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006329 PE=4 SV=1	49754	18,81	1,47	0,53
K1R3M6	CGI_10027757	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-22 kDa OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027757 PE=3 SV=1	22451	16,59	1,47	0,53
K1QBE4	CGI_10009380	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009380 PE=3 SV=1	34819	14,35	1,47	0,53

K1Q4U7	CGI_10025827	AP-3 complex subunit delta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025827 PE=4 SV=1	220733	14,27	1,47	0,53
K1QV55	CGI_10013705	Ubiquitin thioesterase OTUB1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013705 PE=4 SV=1	30122	11,83	1,47	0,53
K1QVR0	CGI_10014835	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014835 PE=4 SV=1	30836	38,11	1,46	0,54
K1R8S7	CGI_10027967	Phospholipase A-2-activating protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027967 PE=4 SV=1	85999	23,97	1,46	0,54
K1Q337	CGI_10011554	Calcyclin-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011554 PE=4 SV=1	26036	21,68	1,46	0,54
K1RGB7	CGI_10010072	Epidermal retinal dehydrogenase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010072 PE=3 SV=1	33742	19,89	1,46	0,54
K1PYR4	CGI_10012063	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012063 PE=4 SV=1	32434	15,52	1,46	0,54
K1Q318	CGI_10020942	Splicing factor 3 subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020942 PE=4 SV=1	85066	47,34	1,45	0,55
K1QSB2	CGI_10019584	26S protease regulatory subunit 6B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019584 PE=3 SV=1	47459	29,18	1,45	0,55
K1QLT5	CGI_10015357	26S protease regulatory subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015357 PE=4 SV=1	97466	26,32	1,45	0,55
K1QCY0	CGI_10008707	Serine hydroxymethyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008707 PE=3 SV=1	54594	23,95	1,45	0,55
K1QMD8	CGI_10013497	Proteasome subunit alpha type OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013497 PE=3 SV=1	26308	23,48	1,45	0,55
K1R6E9	CGI_10020655	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020655 PE=3 SV=1	44615	21,68	1,45	0,55
K1R4F7	CGI_10018089	Ras-related protein Rab-6B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018089 PE=4 SV=1	23606	16,61	1,45	0,55
K1PIB7	CGI_10011753	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011753 PE=4 SV=1	82692	16,48	1,45	0,55
K1QAG0	CGI_10016312	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016312 PE=4 SV=1	139753	31,1	1,44	0,56
K1PNQ5	CGI_10017621	Heat shock protein HSP 90-alpha 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017621 PE=3 SV=1	83320	24,47	1,44	0,56
K1R2V1	CGI_10019491	Importin subunit beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019491 PE=4 SV=1	224243	19,28	1,44	0,56
K1RKZ5	CGI_10005537	DNA damage-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005537 PE=4 SV=1	129438	18,81	1,44	0,56
K1Q888	CGI_10020969	Translin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020969 PE=4 SV=1	26565	16,35	1,44	0,56
K1QUC7	CGI_10018571	Kinesin-related protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018571 PE=3 SV=1	115384	13,22	1,44	0,56
K1PJX2	CGI_10003072	60S ribosomal protein L37a OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003072 PE=3 SV=1	11409	11,66	1,44	0,56
K1PG03	CGI_10000174	60S ribosomal protein L37a OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000174 PE=4 SV=1	7161	11,66	1,44	0,56
K1PV49	CGI_10019470	RuvB-like helicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019470 PE=3 SV=1	52574	11,56	1,44	0,56
K1PLA7	CGI_10001554	Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001554 PE=3 SV=1	38635	11,2	1,44	0,56
K1QBN4	CGI_10018455	NSFL1 cofactor p47 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018455 PE=4 SV=1	28655	10,81	1,44	0,56
K1Q3H9	CGI_10027748	Argininosuccinate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027748 PE=4 SV=1	30408	10,76	1,44	0,56
K1PUE0	CGI_10014929	Cystathionine beta-synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014929 PE=3 SV=1	71149	29,41	1,43	0,57
K1R2K6	CGI_10008057	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008057 PE=3 SV=1	13693	21,64	1,43	0,57
K1PUQ5	CGI_10008078 CGI_10008083	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008078 PE=3 SV=1	13709	21,64	1,43	0,57
K1R2L4	CGI_10008062 CGI_10008068	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008062 PE=3 SV=1	13737	21,64	1,43	0,57
K1PZX5	CGI_10014377	WD repeat-containing protein 54 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014377 PE=4 SV=1	35870	20,6	1,43	0,57
K1QPJ9	CGI_10018645	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018645 PE=3 SV=1	51509	19,52	1,43	0,57
K1QKL1	CGI_10018219	DNA-directed RNA polymerases I II and III subunit RPABC3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018219 PE=4 SV=1	12592	17,6	1,43	0,57
K1PMQ4	CGI_10006792	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006792 PE=4 SV=1	120746	17,2	1,43	0,57
K1QW41	CGI_10017773	Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017773 PE=4 SV=1	177627	16,39	1,43	0,57
K1Q4Q4	CGI_10009219	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009219 PE=3 SV=1	34367	16,25	1,43	0,57
K1QVZ5	CGI_10008523	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008523 PE=4 SV=1	31788	15,96	1,43	0,57
K1QTK2	CGI_10021062	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021062 PE=4 SV=1	22237	34,38	1,42	0,58
K1RZH9	CGI_10007041	Purple acid phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007041 PE=3 SV=1	17450	21,59	1,42	0,58
K1PBJ2	CGI_10004477	Endophilin-A2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004477 PE=4 SV=1	40272	21,38	1,42	0,58
K1RHJ9	CGI_10016471	Suppressor of G2 allele of SKP1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016471 PE=4 SV=1	41712	15,32	1,42	0,58
K1Q947	CGI_10000075	Dynein light chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000075 PE=3 SV=1	10319	13,93	1,42	0,58
K1QGR8	CGI_10005254	Asparaginyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005254 PE=4 SV=1	64376	13,77	1,42	0,58
K1PH89	CGI_10008850	Calumenin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008850 PE=4 SV=1	47659	11,33	1,42	0,58
K1QBG8	CGI_10014715	Proteasome subunit beta type-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014715 PE=4 SV=1	77597	36,23	1,41	0,59
K1QYH5	CGI_10024151	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024151 PE=3 SV=1	55146	25,88	1,41	0,59
K1Q7K0	CGI_10007785	Putative serine carboxypeptidase CPVL OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007785 PE=3 SV=1	58210	21,01	1,41	0,59
K1RCM9	CGI_10017528	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017528 PE=4 SV=1	52173	19,31	1,41	0,59
K1PEY4	CGI_10002226	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002226 PE=3 SV=1	99126	19,1	1,41	0,59

K1PD57	CGI_10003331	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003331 PE=4 SV=1	113884	18,14	1,41	0,59
K1PK85	CGI_10008933	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008933 PE=4 SV=1	138764	16,58	1,41	0,59
K1QC27	CGI_10023479	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023479 PE=4 SV=1	46266	15,19	1,41	0,59
K1QTH1	CGI_10026089	Protein archease OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026089 PE=4 SV=1	12951	14,8	1,41	0,59
K1QHM0	CGI_10011562	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011562 PE=4 SV=1	204378	12,64	1,41	0,59
K1QVX4	CGI_10018859	Glycogen synthase kinase-3 beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018859 PE=3 SV=1	45938	12,12	1,41	0,59
K1QFR9	CGI_10013845	Spectrin beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013845 PE=3 SV=1	280203	10,97	1,41	0,59
K1Q1I2	CGI_10001808	26S protease regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001808 PE=3 SV=1	46498	34,52	1,4	0,6
K1RGY3	CGI_10019899	Nucleolar protein 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019899 PE=3 SV=1	131250	29,16	1,4	0,6
K1RHV4	CGI_10014833	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014833 PE=3 SV=1	8968	29,16	1,4	0,6
K1R3R4	CGI_10019252	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1 homolog OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019252 PE=3 SV=1	35245	19,56	1,4	0,6
K1QL24	CGI_10025488	Beta-mannosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025488 PE=4 SV=1	64220	15,47	1,4	0,6
K1RJ91	CGI_10023422	Ubiquitin-associated protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023422 PE=4 SV=1	149103	13,48	1,4	0,6
K1PT38	CGI_10010810	Carnitine O-palmitoyltransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010810 PE=4 SV=1	145374	12,71	1,4	0,6
K1QEJ3	CGI_10009320	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009320 PE=4 SV=1	37611	12,43	1,4	0,6
K1QCQ5	CGI_10016417	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016417 PE=3 SV=1	49133	12,34	1,4	0,6
K1QY58	CGI_10025943	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025943 PE=3 SV=1	36161	11,86	1,4	0,6
K1QLH0	CGI_10024227	Peroxiredoxin-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024227 PE=4 SV=1	27525	11,44	1,4	0,6
K1PNS2	CGI_10008851	33 kDa inner dynein arm light chain axonemal OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008851 PE=4 SV=1	27066	10,5	1,4	0,6
K1RJ48	CGI_10022027	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022027 PE=4 SV=1	42369	10,31	1,4	0,6
K1PVQ8	CGI_10006122	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006122 PE=3 SV=1	24677	10,03	1,4	0,6
K1QQL6	CGI_10017030	Leucyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017030 PE=3 SV=1	136616	22,49	1,39	0,61
K1RCN6	CGI_10018878	Plancitoxin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018878 PE=4 SV=1	40207	17,01	1,39	0,61
K1RCK0	CGI_10025668	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025668 PE=4 SV=1	51198	16,57	1,39	0,61
K1Q3L8	CGI_10016498	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016498 PE=4 SV=1	108784	15,39	1,39	0,61
K1QC81	CGI_10009931	Dynein intermediate chain 2 ciliary OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009931 PE=4 SV=1	87424	13,53	1,39	0,61
K1QXR6	CGI_10023269	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023269 PE=4 SV=1	39035	13,29	1,39	0,61
K1QRG9	CGI_10023309	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023309 PE=4 SV=1	55525	12,9	1,39	0,61
K1QK18	CGI_10015463	Cytochrome b5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015463 PE=3 SV=1	15524	12,15	1,39	0,61
K1Q681	CGI_10014051	Clustered mitochondria protein homolog OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014051 PE=3 SV=1	152821	30,06	1,38	0,62
K1QH68	CGI_10024846	Syntenin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024846 PE=4 SV=1	31006	22,3	1,38	0,62
K1R158	CGI_10014742	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014742 PE=4 SV=1	46119	20,16	1,38	0,62
K1QB72	CGI_10028806	Protein DPCD OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028806 PE=3 SV=1	72642	16,14	1,38	0,62
K1Q260	CGI_10016539	Nucleolar protein 58 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016539 PE=4 SV=1	57652	15,42	1,38	0,62
K1QHN9	CGI_10003477	Golgi phosphoprotein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003477 PE=4 SV=1	32819	14,61	1,38	0,62
K1Q6P4	CGI_10019868	Tetratricopeptide repeat protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019868 PE=4 SV=1	45493	12,62	1,38	0,62
K1RE71	CGI_10028197	UPF0632 protein A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028197 PE=4 SV=1	79846	10,8	1,38	0,62
K1QV76	CGI_10021248	Neutral ceramidase B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021248 PE=4 SV=1	81807	21,97	1,37	0,63
K1PPM3	CGI_10010244	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010244 PE=4 SV=1	77173	19,07	1,37	0,63
K1PWP4	CGI_10005385	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005385 PE=4 SV=1	56201	17,47	1,37	0,63
K1PS11	CGI_10003535	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003535 PE=3 SV=1	40730	16,35	1,37	0,63
K1RUY4	CGI_10017093	ADP-ribosylation factor-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017093 PE=3 SV=1	20925	12,53	1,37	0,63
K1PNB1	CGI_10017720	Tetratricopeptide repeat protein 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017720 PE=4 SV=1	47614	11,6	1,37	0,63
K1QHF0	CGI_10004762	40S ribosomal protein S27 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004762 PE=3 SV=1	11372	10,49	1,37	0,63
K1QAY3	CGI_10017854	Dipeptidyl-peptidase 1 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017854 PE=3 SV=1	44672	26,96	1,36	0,64
K1R6F1	CGI_10025667	Proteasome subunit alpha type OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025667 PE=3 SV=1	28039	26,06	1,36	0,64
K1QIR8	CGI_10015492	78 kDa glucose-regulated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015492 PE=3 SV=1	73033	23,77	1,36	0,64
K1PNI6	CGI_10020922	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020922 PE=4 SV=1	53886	22,9	1,36	0,64
K1R5B4	CGI_10028647	Proteasome activator complex subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028647 PE=4 SV=1	207127	20,32	1,36	0,64
K1PPH6	CGI_10023343	Kelch domain-containing protein 8B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023343 PE=4 SV=1	37734	15,79	1,36	0,64

K1PPK9	CGI_10012753	LanC-like protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012753 PE=4 SV=1	46987	15,36	1,36	0,64
K1PVW9	CGI_10000541	AMP deaminase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000541 PE=4 SV=1	23304	15,25	1,36	0,64
K1RIA5	CGI_10021530	Ubiquitin-protein ligase E3A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021530 PE=4 SV=1	69728	13,9	1,36	0,64
K1Q4I9	CGI_10013115	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013115 PE=3 SV=1	51613	12,64	1,36	0,64
K1P8A1	CGI_10007265	Poly [ADP-ribose] polymerase 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007265 PE=4 SV=1	225780	11,93	1,36	0,64
K1QH52	CGI_10024825	Uncharacterized protein y4xO OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024825 PE=4 SV=1	44472	11,84	1,36	0,64
K1PDC6	CGI_10003170	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003170 PE=3 SV=1	23570	40,62	1,35	0,65
K1PIP8	CGI_10008865	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008865 PE=3 SV=1	25460	21,56	1,35	0,65
K1QRY6	CGI_10018521	Golgi reassembly-stacking protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018521 PE=4 SV=1	46372	16,77	1,35	0,65
K1RCL9	CGI_10025690	Leucine-rich repeat-containing protein 23 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025690 PE=4 SV=1	39446	15,32	1,35	0,65
K1RGD5	CGI_10002296	F-box only protein 36 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002296 PE=4 SV=1	24017	13,65	1,35	0,65
K1RKC1	CGI_10021712	Far upstream element-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021712 PE=4 SV=1	79220	12,73	1,35	0,65
K1RNX0	CGI_10022452	Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022452 PE=3 SV=1	10570	11,35	1,35	0,65
K1Q5U2	CGI_10014602	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014602 PE=4 SV=1	75499	10,79	1,35	0,65
K1R712	CGI_10018984	Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018984 PE=4 SV=1	160011	10,43	1,35	0,65
K1Q9M0	CGI_10015300	tRNA (Cytosine-5-)-methyltransferase NSUN2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015300 PE=3 SV=1	84612	21,21	1,34	0,66
K1QHT8	CGI_10023785	RNA-binding protein 8A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023785 PE=3 SV=1	62686	16,61	1,34	0,66
K1Q9B9	CGI_10004598	Carnitine O-palmitoyltransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004598 PE=4 SV=1	52531	16,4	1,34	0,66
K1P421	CGI_10012372	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012372 PE=3 SV=1	14159	15,9	1,34	0,66
K1RXS6	CGI_10025376	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025376 PE=3 SV=1	14244	15,9	1,34	0,66
K1PUM2	CGI_10008058 CGI_10008063	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008058 PE=3 SV=1	13485	15,9	1,34	0,66
K1QMD3	CGI_10023335	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023335 PE=3 SV=1	38396	12,9	1,34	0,66
K1R0H0	CGI_10015426	Glutamine synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015426 PE=3 SV=1	40956	11,59	1,34	0,66
K1RT39	CGI_10023522	Glutaredoxin-3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023522 PE=4 SV=1	77568	10,57	1,34	0,66
K1PQP2	CGI_10004474	Nucleolin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004474 PE=4 SV=1	47995	10,03	1,34	0,66
K1R1F4	CGI_10021580	Serine/threonine-protein phosphatase 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021580 PE=4 SV=1	55008	14,32	1,33	0,67
K1R7J6	CGI_10028508	Putative sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028508 PE=4 SV=1	35452	12,5	1,33	0,67
K1RBF6	CGI_10018053	Uncharacterized protein yfeX OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018053 PE=4 SV=1	39593	15,75	0,66	1,34
K1R0R9	CGI_10027898	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD+] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027898 PE=3 SV=1	27911	15,45	0,66	1,34
K1QT91	CGI_10012729	LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012729 PE=4 SV=1	155065	13,67	0,66	1,34
K1R6D4	CGI_10019456	Glutathione S-transferase A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019456 PE=3 SV=1	26511	11,19	0,66	1,34
K1PBC0	CGI_10010873	Non-neuronal cytoplasmic intermediate filament protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010873 PE=3 SV=1	69288	10,13	0,66	1,34
K1QFS4	CGI_10013850	Actin-related protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013850 PE=3 SV=1	44557	16,06	0,65	1,35
K1QPM9	CGI_10011204	Fatty acid-binding protein brain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011204 PE=4 SV=1	15312	14,8	0,65	1,35
K1PHI7	CGI_10012900	CutA-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012900 PE=4 SV=1	136287	14,41	0,65	1,35
K1P878	CGI_10007259	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007259 PE=4 SV=1	57464	13,81	0,65	1,35
K1QQR1	CGI_10024475	Major vault protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024475 PE=4 SV=1	96311	12,44	0,65	1,35
K1QLL1	CGI_10020479	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020479 PE=3 SV=1	75345	10,16	0,65	1,35
K1QML1	CGI_10017503	Cysteine and glycine-rich protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017503 PE=4 SV=1	13582	10,13	0,65	1,35
K1P7P6	CGI_10007861	Glutamate decarboxylase-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007861 PE=3 SV=1	41814	14,85	0,64	1,36
K1RB89	CGI_10019208	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019208 PE=3 SV=1	53446	12,64	0,64	1,36
K1QXX9	CGI_10012574	Cytochrome c OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012574 PE=3 SV=1	12314	11,16	0,64	1,36
K1PHM4	CGI_10012550	Glutathione S-transferase kappa 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012550 PE=4 SV=1	37973	12,15	0,62	1,38
K1P188	CGI_10000577	Histone-lysine N-methyltransferase PRDM9 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000577 PE=4 SV=1	60239	16,81	0,61	1,39
K1PNL0	CGI_10019640	Microtubule-associated protein futsch OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019640 PE=4 SV=1	143746	15,37	0,61	1,39
K1PWS2	CGI_10018083	Alpha-aspartyl dipeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018083 PE=4 SV=1	37446	17,61	0,6	1,4
K1QBB5	CGI_10023385	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023385 PE=4 SV=1	38458	12,89	0,6	1,4
K1PC55	CGI_10003961	Beta-galactosidase-1-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003961 PE=3 SV=1	44291	11,3	0,6	1,4
K1Q5P7	CGI_10027458	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027458 PE=3 SV=1	23741	10,67	0,6	1,4
K1QW61	CGI_10014212	WD repeat-containing protein 19 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014212 PE=4 SV=1	41592	10,14	0,6	1,4

K1QRG3	CGI_10026323	Guanine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026323 PE=4 SV=1	50046	16,71	0,59	1,41
K1RE34	CGI_10010762	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010762 PE=4 SV=1	82541	11,36	0,59	1,41
K1QFC1	CGI_10006472	Sodium-and chloride-dependent GABA transporter ine OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006472 PE=4 SV=1	84710	20,69	0,58	1,42
K1QU66	CGI_10014801	Aminoacylase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014801 PE=4 SV=1	48833	18,87	0,58	1,42
K1QAR9	CGI_10011808	Fermitin family-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011808 PE=4 SV=1	70304	12,64	0,58	1,42
K1R0F9	CGI_10003461	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003461 PE=4 SV=1	51828	10,7	0,58	1,42
K1Q307	CGI_10012398	Dihydrodipicolinate synthase-like mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012398 PE=4 SV=1	13628	17,06	0,57	1,43
K1PSD0	CGI_10008571	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008571 PE=4 SV=1	39255	15,43	0,57	1,43
K1P9L2	CGI_10006015	Transgelin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006015 PE=3 SV=1	19361	11	0,57	1,43
K1QUQ2	CGI_10023850	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023850 PE=3 SV=1	15865	20,8	0,55	1,45
K1R2N6	CGI_10021010	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021010 PE=4 SV=1	25641	15,56	0,55	1,45
K1Q5Y3	CGI_10009816	Annexin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009816 PE=3 SV=1	35495	11,39	0,55	1,45
K1Q8V9	CGI_10012293	Agmatinase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012293 PE=3 SV=1	36607	16,99	0,54	1,46
K1Q2A1	CGI_10000994	Amidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000994 PE=4 SV=1	59114	11,42	0,54	1,46
K1Q7U9	CGI_10007279	3-ketoacyl-CoA thiolase A peroxisomal OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007279 PE=4 SV=1	26390	12,08	0,53	1,47
K1RL06	CGI_10023610	Kyphoscoliosis peptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023610 PE=4 SV=1	24025	10,18	0,53	1,47
K1PFJ8	CGI_10001875	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001875 PE=4 SV=1	22682	16,34	0,52	1,48
K1Q4W6	CGI_10025850	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025850 PE=4 SV=1	84522	15,01	0,52	1,48
K1QBY4	CGI_10025179	RNA-binding protein 24-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025179 PE=4 SV=1	23740	11,92	0,52	1,48
K1PYB0	CGI_10027462	Cofilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027462 PE=3 SV=1	18617	17,16	0,51	1,49
K1P6I1	CGI_10009277	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009277 PE=3 SV=1	35018	14,53	0,51	1,49
K1QTN3	CGI_10017498	Glycosyltransferase 25 family member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017498 PE=4 SV=1	69860	10,88	0,51	1,49
K1P2H1	CGI_10016767	Fatty acid-binding protein adipocyte OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016767 PE=4 SV=1	14307	15,16	0,48	1,52
K1PNZ5	CGI_10003355	Catalase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003355 PE=3 SV=1	58005	22,83	0,47	1,53
K1PLF9	CGI_10021481	Arginine kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021481 PE=3 SV=1	39624	17,81	0,47	1,53
K1QJL8	CGI_10021044	Alpha-mannosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021044 PE=3 SV=1	120627	11,89	0,47	1,53
K1PLX6	CGI_10007415	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007415 PE=4 SV=1	38399	17,86	0,46	1,54
K1RA17	CGI_10023658	Tetraspanin-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023658 PE=3 SV=1	67253	18,49	0,45	1,55
K1PI52	CGI_10017903	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017903 PE=3 SV=1	41381	31,24	0,44	1,56
K1QKM4	CGI_10007621	Xylose isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007621 PE=3 SV=1	99065	11,12	0,44	1,56
K1QPB7	CGI_10020432	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020432 PE=4 SV=1	27147	17,26	0,42	1,58
K1QRR1	CGI_10011301	Calmodulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011301 PE=4 SV=1	17849	16,87	0,42	1,58
K1Q8Q8	CGI_10000273	Tetraspanin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000273 PE=3 SV=1	23785	16,31	0,42	1,58
K1QBC6	CGI_10010785	Tetraspanin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010785 PE=3 SV=1	26175	16,31	0,42	1,58
K1RZ99	CGI_10012231	Filamin-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012231 PE=4 SV=1	90767	12,73	0,42	1,58
K1RDX5	CGI_10022249	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022249 PE=3 SV=1	26920	15,48	0,41	1,59
K1QXY1	CGI_10016846	Glycerol kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016846 PE=4 SV=1	23293	11,25	0,41	1,59
K1R1A1	CGI_10013781	Xanthine dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013781 PE=4 SV=1	175159	10,63	0,41	1,59
K1QLU2	CGI_10017638	Serine protease inhibitor dipetalogastin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017638 PE=4 SV=1	36678	16,05	0,4	1,6
K1QIM9	CGI_10005428	Complement C1q-like protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005428 PE=4 SV=1	21227	10,32	0,4	1,6
K1PSR5	CGI_10008477	Fatty acid-binding protein heart OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008477 PE=4 SV=1	14930	35,88	0,39	1,61
K1QFV5	CGI_10013163	Tropomyosin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013163 PE=4 SV=1	33730	12,86	0,39	1,61
K1QBP2	CGI_10005508	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005508 PE=4 SV=1	13255	12,77	0,39	1,61
K1Q0U6	CGI_10024026	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024026 PE=4 SV=1	27042	16,44	0,38	1,62
K1R832	CGI_10025379	Protein unc-87 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025379 PE=4 SV=1	56984	10,5	0,38	1,62
K1PH24	CGI_10020905	Uncharacterized protein C11D3.13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020905 PE=4 SV=1	39860	14,52	0,36	1,64
K1PX59	CGI_10012585	Monocarboxylate transporter 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012585 PE=4 SV=1	43211	15,52	0,35	1,65
K1PNR5	CGI_10015207	Aldo-keto reductase family 1 member B10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015207 PE=4 SV=1	25846	11,21	0,35	1,65
K1QET9	CGI_10027363	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027363 PE=4 SV=1	45650	10,38	0,34	1,66
K1QFK6	CGI_10020344	Troponin C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020344 PE=4 SV=1	25651	22,11	0,31	1,69

K1Q1P4	CGI_10001563	Leukocyte elastase inhibitor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001563 PE=3 SV=1	61063	19,39	0,29	1,71
K1QJ85	CGI_10013077	Glutathione S-transferase A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013077 PE=3 SV=1	23058	25,14	0,28	1,72
K1S0J9	CGI_10021277	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021277 PE=4 SV=1	30761	20,94	0,23	1,77
K1Q8P5	CGI_10021822	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021822 PE=4 SV=1	35277	28,18	0,22	1,78
K1Q525	CGI_10014243	Mechanosensory protein 2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014243 PE=4 SV=1	39210	14,96	0,12	1,88
K1QJ96	CGI_10003422	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003422 PE=4 SV=1	23691	18,19	0,09	1,91
K1Q3E1	CGI_10024986	Hyaluronan mediated motility receptor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024986 PE=4 SV=1	164810	13,8	0,08	1,92

Crassostrea gigas - Stade 1			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nbeta
K1P8T7	CGI_10006796	Fibrillin-3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006796 PE=4 SV=1	272635	16,94	1,86	0,14
K1PJG0	CGI_10015188	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015188 PE=4 SV=1	25796	24,07	1,84	0,16
K1PYA2	CGI_10017362	Host cell factor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017362 PE=4 SV=1	111377	16,07	1,82	0,18
K1QIU0	CGI_10003738	Acyl-CoA synthetase family member 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003738 PE=4 SV=1	61002	18,16	1,81	0,19
K1RU07	CGI_10022743	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022743 PE=4 SV=1	108564	29,66	1,8	0,2
K1Q369	CGI_10028583	C-type mannose receptor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028583 PE=4 SV=1	49968	21,59	1,78	0,22
K1RDJ6	CGI_10022187	cAMP-responsive element modulator OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022187 PE=4 SV=1	30710	11,7	1,76	0,24
K1QG41	CGI_10012328	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012328 PE=4 SV=1	94698	17,99	1,73	0,27
K1QPJ1	CGI_10021674	Actin cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021674 PE=3 SV=1	41657	19,46	1,71	0,29
K1QI52	CGI_10004099	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004099 PE=4 SV=1	40274	19,88	1,69	0,31
K1QED7	CGI_10016097	Replication protein A subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016097 PE=3 SV=1	69179	19,87	1,62	0,38
K1R2N0	CGI_10008056 CGI_10008061	Histone H4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008056 PE=3 SV=1	11367	16,47	1,6	0,4
K1QWP6	CGI_10001544	Protein boule OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001544 PE=4 SV=1	12876	14,2	1,6	0,4
K1RUW0	CGI_10028125	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028125 PE=4 SV=1	282294	16,36	1,59	0,41
K1PUZ7	CGI_10015800	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015800 PE=4 SV=1	22502	15,63	1,59	0,41
K1R2T7	CGI_10009679	UPF0468 protein C16orf80-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009679 PE=4 SV=1	22661	14,96	1,58	0,42
K1R7V7	CGI_10012330	Tubulin beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012330 PE=3 SV=1	49936	19,61	1,56	0,44
K1RFD2	CGI_10010021	Adenylate kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010021 PE=3 SV=1	25522	17,64	1,56	0,44
K1PRV7	CGI_10009537	Profilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009537 PE=3 SV=1	14245	17,51	1,56	0,44
K1Q9G3	CGI_10019894	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019894 PE=3 SV=1	39658	14,75	1,56	0,44
K1RN77	CGI_10019269	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019269 PE=4 SV=1	72947	11,59	1,56	0,44
K1Q923	CGI_10010075	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010075 PE=3 SV=1	81504	23,4	1,55	0,45
K1RAU3	CGI_10028786	DNA ligase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028786 PE=3 SV=1	102057	19,18	1,54	0,46
K1R4Y6	CGI_10014999	Carboxypeptidase D OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014999 PE=4 SV=1	202048	13,84	1,54	0,46
K1QVJ8	CGI_10008757	Piwi-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008757 PE=3 SV=1	99952	23,29	1,53	0,47
K1QMT1	CGI_10009495	DnaJ-like protein subfamily B member 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009495 PE=4 SV=1	38825	18,52	1,53	0,47
K1QVX4	CGI_10018859	Glycogen synthase kinase-3 beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018859 PE=3 SV=1	45938	17,44	1,51	0,49
K1PTC2	CGI_10002799	c-Myc-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002799 PE=4 SV=1	12285	12,52	1,51	0,49
K1PD30	CGI_10008446	Putative histone-binding protein Caf1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008446 PE=4 SV=1	44700	12,2	1,51	0,49
K1PYI4	CGI_10018475	Sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018475 PE=4 SV=1	13338	10,48	1,51	0,49
K1QNX7	CGI_10017198	Homer-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017198 PE=4 SV=1	49081	15,48	1,49	0,51
K1S270	CGI_10025677	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025677 PE=4 SV=1	25454	19,11	1,48	0,52
K1RHJ9	CGI_10016471	Suppressor of G2 allele of SKP1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016471 PE=4 SV=1	41712	13,92	1,47	0,53
K1QGI3	CGI_10020393	Actin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020393 PE=4 SV=1	25374	12,83	1,47	0,53
K1QK18	CGI_10015463	Cytochrome b5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015463 PE=3 SV=1	15524	12,3	1,47	0,53
K1R2K6	CGI_10008057	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008057 PE=3 SV=1	13693	16,17	1,46	0,54
K1PUQ5	CGI_10008078 CGI_10008083	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008078 PE=3 SV=1	13709	16,17	1,46	0,54
K1R2L4	CGI_10008062 CGI_10008068	Histone H2B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008062 PE=3 SV=1	13737	16,17	1,46	0,54
K1P421	CGI_10012372	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012372 PE=3 SV=1	14159	18,87	1,44	0,56
K1RXS6	CGI_10025376	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025376 PE=3 SV=1	14244	18,87	1,44	0,56
K1PUM2	CGI_10008058 CGI_10008063	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008058 PE=3 SV=1	13485	18,87	1,44	0,56
K1P6B3	CGI_10009642	Endoplasmic reticulum resident protein ERp44 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009642 PE=4 SV=1	44796	19,13	1,43	0,57
K1R6C2	CGI_10011875	Peroxisomal 3 2-trans-enoyl-CoA isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011875 PE=4 SV=1	41567	14,26	1,43	0,57
K1RJH5	CGI_10021647	Polyadenylate-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021647 PE=3 SV=1	71660	12,2	1,43	0,57
K1Q9W5	CGI_10013567	T-complex protein 1 subunit eta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013567 PE=3 SV=1	46554	12,24	1,41	0,59
K1Q3H9	CGI_10027748	Argininosuccinate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027748 PE=4 SV=1	30408	11,12	1,41	0,59
K1PKF6	CGI_10002798	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002798 PE=4 SV=1	33898	10,98	1,41	0,59
K1PR47	CGI_10028301	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028301 PE=3 SV=1	63660	14,83	1,4	0,6

K1R466	CGI_10004346	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004346 PE=3 SV=1	63906	12,53	1,4	0,6
K1QZ08	CGI_10000789	Transcription elongation factor B polypeptide 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000789 PE=3 SV=1	20025	11,32	1,4	0,6
K1QUK1	CGI_10023237	Ubiquitin fusion degradation protein 1-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023237 PE=4 SV=1	78036	14	1,39	0,61
K1RMV1	CGI_10022145	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022145 PE=4 SV=1	38020	12,72	1,39	0,61
K1QKR5	CGI_10019166	WW domain-binding protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019166 PE=4 SV=1	28307	14,21	1,38	0,62
K1Q358	CGI_10011577	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011577 PE=3 SV=1	11461	13,62	1,38	0,62
K1R158	CGI_10014742	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014742 PE=4 SV=1	46119	12,88	1,38	0,62
K1Q4Z4	CGI_10005314	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005314 PE=4 SV=1	54390	12,22	1,38	0,62
K1QLU6	CGI_10027569	Poly [ADP-ribose] polymerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027569 PE=4 SV=1	110519	15,55	1,37	0,63
K1R150	CGI_10027566	Ras-related protein Rab-1A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027566 PE=4 SV=1	22898	17,25	1,36	0,64
K1QYH5	CGI_10024151	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024151 PE=3 SV=1	55146	14,72	1,35	0,65
K1RAP8	CGI_10002873	Malic enzyme OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002873 PE=3 SV=1	67541	13,84	0,66	1,34
K1RZ99	CGI_10012231	Filamin-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012231 PE=4 SV=1	90767	12,05	0,66	1,34
K1Q662	CGI_10025192	Actin-interacting protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025192 PE=4 SV=1	65361	21,85	0,65	1,35
K1QPH7	CGI_10013630	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013630 PE=4 SV=1	29012	12,6	0,65	1,35
K1QTD6	CGI_10016257	Catalase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016257 PE=4 SV=1	46723	11,48	0,65	1,35
K1Q6Z7	CGI_10024383	DDB1-and CUL4-associated factor 15 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024383 PE=4 SV=1	83974	16,08	0,64	1,36
K1PVW0	CGI_10006000	S-adenosylmethionine synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006000 PE=3 SV=1	45342	16,05	0,64	1,36
K1QSW8	CGI_10023427	Caspase-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023427 PE=3 SV=1	34514	15,72	0,64	1,36
K1PXC3	CGI_10025810	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025810 PE=4 SV=1	35248	14,15	0,64	1,36
K1QTP1	CGI_10021123	Dipeptidyl peptidase family member 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021123 PE=4 SV=1	73632	11,73	0,64	1,36
K1QQ93	CGI_10025016	Adenosine kinase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025016 PE=4 SV=1	48976	10,66	0,64	1,36
K1QDI4	CGI_10017958	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017958 PE=3 SV=1	15926	18,08	0,63	1,37
K1QT28	CGI_10016928	Ectoine hydroxylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016928 PE=4 SV=1	81843	16,28	0,62	1,38
K1R5P2	CGI_10024680	Tumor protein D54 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024680 PE=4 SV=1	31023	15,25	0,62	1,38
K1QS53	CGI_10008292	Fatty acid-binding protein heart OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008292 PE=3 SV=1	19791	12,35	0,62	1,38
K1QP30	CGI_10020339	Growth factor receptor-bound protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020339 PE=4 SV=1	22631	10,63	0,62	1,38
K1Q2D7	CGI_10004665	Putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004665 PE=3 SV=1	154533	10,05	0,62	1,38
K1Q7M3	CGI_10010897	Proline iminopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010897 PE=3 SV=1	37544	18,54	0,61	1,39
K1QVK0	CGI_10002311	Transaldolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002311 PE=3 SV=1	62889	16,02	0,61	1,39
K1QDX5	CGI_10011266	Uncharacterized protein yqjG OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011266 PE=4 SV=1	31163	18,44	0,6	1,4
K1R8K0	CGI_10018115	Phosphomannomutase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018115 PE=3 SV=1	59491	13,96	0,6	1,4
K1R7Q9	CGI_10026431	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026431 PE=4 SV=1	19627	11,51	0,6	1,4
K1QIT0	CGI_10015514	Receptor expression-enhancing protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015514 PE=3 SV=1	16905	10,77	0,6	1,4
K1S058	CGI_10018619	Transcription factor RFX3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018619 PE=4 SV=1	112075	10,6	0,6	1,4
K1PQI4	CGI_10004564	Enolase-phosphatase E1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004564 PE=3 SV=1	34671	19,44	0,59	1,41
K1Q183	CGI_10003741	Charged multivesicular body protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003741 PE=3 SV=1	24359	11,82	0,59	1,41
K1QRW5	CGI_10017862	Arginase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017862 PE=3 SV=1	38199	10,9	0,59	1,41
K1RLJ5	CGI_10016135	Glucose-6-phosphate 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016135 PE=3 SV=1	31430	12,53	0,58	1,42
K1QUZ1	CGI_10009951	Putative aminopeptidase W07G4.4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009951 PE=4 SV=1	46776	10,97	0,58	1,42
D7EZH1	CGI_10013578	Cystatin B-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013578 PE=2 SV=1	10581	10,69	0,58	1,42
K1R647	CGI_10023831	Lactoylglutathione lyase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023831 PE=4 SV=1	20596	10,32	0,58	1,42
K1RJ70	CGI_10023407	Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023407 PE=4 SV=1	58733	19,53	0,57	1,43
K1QT91	CGI_10012729	LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012729 PE=4 SV=1	155065	13,97	0,57	1,43
K1PEW7	CGI_10006881	F-box only protein 22 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006881 PE=4 SV=1	45556	11,21	0,57	1,43
K1QQU9	CGI_10005008	Abhydrolase domain-containing protein 14A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005008 PE=4 SV=1	29868	10,99	0,57	1,43
K1QHW8	CGI_10021660	Ferritin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021660 PE=3 SV=1	19885	10,46	0,57	1,43
K1RLT0	CGI_10020559	D-erythrulose reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020559 PE=4 SV=1	25953	14,96	0,56	1,44
K1P6I1	CGI_10009277	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009277 PE=3 SV=1	35018	13,63	0,56	1,44
K1RJK6	CGI_10026433	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026433 PE=4 SV=1	24512	12,09	0,56	1,44

K1QL49	CGI_10013973	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013973 PE=3 SV=1	39565	10,52	0,56	1,44
K1QI97	CGI_10022483	Adenylyl cyclase-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022483 PE=3 SV=1	67293	14,24	0,55	1,45
K1RGD1	CGI_10003285	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003285 PE=3 SV=1	63676	13,58	0,55	1,45
K1QYF0	CGI_10017858	Putative beta-D-xylosidase 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017858 PE=4 SV=1	82994	10,6	0,55	1,45
K1QDH4	CGI_10008340	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008340 PE=4 SV=1	11505	10,03	0,55	1,45
K1RAR8	CGI_10021231	Protein FAM49B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021231 PE=4 SV=1	42363	10	0,55	1,45
K1RLZ7	CGI_10021018	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021018 PE=4 SV=1	37160	26,35	0,54	1,46
K1PE57	CGI_10002689	Severin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002689 PE=4 SV=1	37210	19,45	0,54	1,46
K1QRQ0	CGI_10017221	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017221 PE=4 SV=1	64842	14,92	0,54	1,46
K1Q2H3	CGI_10015791	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015791 PE=3 SV=1	27754	11,64	0,54	1,46
K1P746	CGI_10008507	Glutathione synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008507 PE=3 SV=1	62484	11,38	0,54	1,46
K1Q257	CGI_10023064	Carnitine O-acetyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023064 PE=3 SV=1	68630	11,31	0,54	1,46
K1P8Z2	CGI_10006511	Histidyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006511 PE=4 SV=1	58070	10,51	0,54	1,46
K1RBF6	CGI_10018053	Uncharacterized protein yfeX OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018053 PE=4 SV=1	39593	15,16	0,53	1,47
K1R8G6	CGI_10024518	Ester hydrolase C11orf54-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024518 PE=4 SV=1	33911	14,55	0,53	1,47
K1QFC1	CGI_10006472	Sodium-and chloride-dependent GABA transporter ine OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006472 PE=4 SV=1	84710	12,03	0,53	1,47
K1QRR4	CGI_10007593	ADP-ribose pyrophosphatase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007593 PE=4 SV=1	33923	10,73	0,53	1,47
K1RNJ2	CGI_10027529	Hydroxyacylglutathione hydrolase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027529 PE=3 SV=1	31659	19,57	0,52	1,48
K1QAR9	CGI_10011808	Fermitin family-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011808 PE=4 SV=1	70304	17,32	0,52	1,48
K1PZU6	CGI_10024363	Plasma glutamate carboxypeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024363 PE=4 SV=1	48081	16,52	0,52	1,48
K1S4Y8	CGI_10016359	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016359 PE=4 SV=1	65713	14,3	0,52	1,48
K1R5W2	CGI_10016569	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016569 PE=4 SV=1	63205	13,26	0,52	1,48
K1R627	CGI_10015045	Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015045 PE=3 SV=1	40820	18,21	0,51	1,49
K1QR72	CGI_10017163	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017163 PE=3 SV=1	84168	15,23	0,51	1,49
K1R1I0	CGI_10022305	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022305 PE=4 SV=1	16110	14,75	0,51	1,49
K1QCX0	CGI_10008695	V-type proton ATPase subunit F OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008695 PE=4 SV=1	104612	13,49	0,51	1,49
K1PWS2	CGI_10018083	Alpha-aspartyl dipeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018083 PE=4 SV=1	37446	12,54	0,51	1,49
K1QE20	CGI_10009812	Nucleoredoxin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009812 PE=4 SV=1	15989	12,29	0,51	1,49
K1Q407	CGI_10013036	Ras GTPase-activating protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013036 PE=4 SV=1	35829	12,13	0,51	1,49
K1QXK0	CGI_10011108	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011108 PE=4 SV=1	10090	10,78	0,51	1,49
K1Q9C8	CGI_10014941	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014941 PE=4 SV=1	31043	18,8	0,5	1,5
K1R9R1	CGI_10009709	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009709 PE=3 SV=1	31524	14,21	0,5	1,5
K1QYP7	CGI_10025264	Cathepsin F OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025264 PE=3 SV=1	78587	11,55	0,5	1,5
K1QCM0	CGI_10019175	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019175 PE=4 SV=1	23571	18,57	0,49	1,51
K1PTA7	CGI_10007277	3-ketoacyl-CoA thiolase B peroxisomal OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007277 PE=4 SV=1	11370	17,45	0,49	1,51
K1QPL8	CGI_10019696	RNA-binding motif single-stranded-interacting protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019696 PE=4 SV=1	35984	15,46	0,49	1,51
K1PXJ8	CGI_10004549	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004549 PE=4 SV=1	59245	14,8	0,49	1,51
K1PJY2	CGI_10009354	Inositol polyphosphate 1-phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009354 PE=4 SV=1	82346	12,98	0,49	1,51
K1RS36	CGI_10020637	COP9 signalosome complex subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020637 PE=4 SV=1	52846	10,88	0,49	1,51
K1RNB6	CGI_10015523	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015523 PE=3 SV=1	55217	22,44	0,48	1,52
K1PMY2	CGI_10006560	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006560 PE=4 SV=1	78625	16,34	0,48	1,52
K1QAM7	CGI_10011899	Copine-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011899 PE=4 SV=1	60305	12,95	0,48	1,52
K1P137	CGI_10000611	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000611 PE=3 SV=1	16686	12,7	0,48	1,52
K1Q1I3	CGI_10011934	Ornithine aminotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011934 PE=3 SV=1	47450	12,15	0,48	1,52
K1RF31	CGI_10024801	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024801 PE=4 SV=1	88900	11,1	0,48	1,52
K1QU66	CGI_10014801	Aminoacylase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014801 PE=4 SV=1	48833	10,35	0,48	1,52
K1R9C2	CGI_10015243	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015243 PE=4 SV=1	38706	15,84	0,47	1,53
K1R7T2	CGI_10018568	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018568 PE=3 SV=1	46308	14,35	0,47	1,53
K1R192	CGI_10027619	Thymidine phosphorylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027619 PE=3 SV=1	48202	13,73	0,47	1,53
K1Q5Q2	CGI_10004058	Plastin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004058 PE=4 SV=1	17761	12,19	0,47	1,53

K1QTD2	CGI_10010092	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010092 PE=4 SV=1	20618	11,9	0,47	1,53
K1PGD2	CGI_10017704	Putative aminopeptidase NPEPL1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017704 PE=4 SV=1	55944	20	0,46	1,54
K1Q3F4	CGI_10027722	Inorganic pyrophosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027722 PE=4 SV=1	48340	13,89	0,46	1,54
K1QP10	CGI_10013699	Alpha-parvin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013699 PE=4 SV=1	20618	13,59	0,46	1,54
K1Q4E1	CGI_10013314	N-acetyl-D-glucosamine kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013314 PE=4 SV=1	44267	13,53	0,46	1,54
K1PC55	CGI_10003961	Beta-galactosidase-1-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003961 PE=3 SV=1	44291	11,95	0,46	1,54
K1QK42	CGI_10015618	tRNA-dihydrouridine synthase 2-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015618 PE=4 SV=1	58050	11,18	0,46	1,54
K1Q307	CGI_10012398	Dihydrodipicolinate synthase-like mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012398 PE=4 SV=1	13628	23,32	0,45	1,55
K1QK30	CGI_10007641	S-adenosylmethionine synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007641 PE=3 SV=1	44415	15,76	0,45	1,55
K1QM61	CGI_10009700	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009700 PE=4 SV=1	40414	15,25	0,45	1,55
K1QTB5	CGI_10015392	TIP41-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015392 PE=4 SV=1	50654	12,32	0,45	1,55
K1RCB1	CGI_10015435	Regucalcin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015435 PE=4 SV=1	33959	11,9	0,45	1,55
K1RQX8	CGI_10022767	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022767 PE=4 SV=1	27033	10,07	0,45	1,55
K1PG84	CGI_10000045 CGI_10019425	Glutaredoxin-C6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000045 PE=4 SV=1	11569	20,11	0,44	1,56
K1R0M4	CGI_10007787	Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007787 PE=4 SV=1	10251	11,66	0,44	1,56
K1PVX0	CGI_10027775	Protein ETHE1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027775 PE=4 SV=1	27773	11,38	0,44	1,56
K1QPM9	CGI_10011204	Fatty acid-binding protein brain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011204 PE=4 SV=1	15312	25,88	0,43	1,57
K1QFI9	CGI_10020328	Phosphotriesterase-related protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020328 PE=3 SV=1	38543	17,44	0,43	1,57
K1RTR1	CGI_10025561	ATP-citrate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025561 PE=3 SV=1	123006	15,62	0,43	1,57
K1PR93	CGI_10016672	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016672 PE=3 SV=1	42831	14,49	0,43	1,57
K1R109	CGI_10025422	Malate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025422 PE=4 SV=1	36780	21,02	0,42	1,58
K1RNB2	CGI_10024319	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024319 PE=3 SV=1	34714	19,64	0,42	1,58
K1Q954	CGI_10002827	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002827 PE=3 SV=1	34887	19,64	0,42	1,58
K1PZ57	CGI_10004443	L-ascorbate oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004443 PE=3 SV=1	83732	15,97	0,42	1,58
K1R2E1	CGI_10017982	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017982 PE=4 SV=1	50299	13,82	0,42	1,58
K1PWQ4	CGI_10013041	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013041 PE=4 SV=1	62710	12,48	0,42	1,58
K1RDV2	CGI_10004935	Myotrophin-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004935 PE=3 SV=1	35501	11,27	0,42	1,58
K1QBH3	CGI_10010724	Alpha-methylacyl-CoA racemase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010724 PE=4 SV=1	41579	33,15	0,41	1,59
K1QGJ2	CGI_10001818	Uridine phosphorylase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001818 PE=4 SV=1	34683	16,35	0,41	1,59
K1S5N3	CGI_10023886	Phosphotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023886 PE=3 SV=1	51599	15,31	0,41	1,59
K1QBB5	CGI_10023385	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023385 PE=4 SV=1	38458	14,1	0,41	1,59
K1R8B2	CGI_10020389	Isovaleryl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020389 PE=3 SV=1	51676	12,29	0,41	1,59
K1QN94	CGI_10007012	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007012 PE=4 SV=1	28437	25,01	0,4	1,6
K1PYB0	CGI_10027462	Cofilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027462 PE=3 SV=1	18617	21,46	0,4	1,6
K1R0F1	CGI_10010064	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010064 PE=4 SV=1	34578	16,4	0,4	1,6
K1RGG1	CGI_10028856	Alanyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028856 PE=3 SV=1	107055	13,09	0,4	1,6
K1QNV6	CGI_10013164	Tropomyosin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013164 PE=3 SV=1	39009	12,03	0,4	1,6
K1PVV6	CGI_10000669	Putative aminopeptidase W07G4.4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000669 PE=4 SV=1	55710	18,81	0,39	1,61
K1QXS3	CGI_10025808	4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025808 PE=3 SV=1	50068	16,9	0,39	1,61
K1PQZ3	CGI_10010784	Armadillo repeat-containing protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010784 PE=4 SV=1	119666	15,24	0,39	1,61
K1Q5P9	CGI_10027463	Neuroendocrine convertase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027463 PE=3 SV=1	73018	18,11	0,38	1,62
K1QLP7	CGI_10012997	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012997 PE=4 SV=1	69891	12,55	0,38	1,62
K1P188	CGI_10000577	Histone-lysine N-methyltransferase PRDM9 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000577 PE=4 SV=1	60239	17,14	0,37	1,63
K1QAD2	CGI_10017744	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017744 PE=4 SV=1	19135	13,71	0,37	1,63
K1QSY6	CGI_10009070	Tetratricopeptide repeat protein 38 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009070 PE=4 SV=1	19622	12,78	0,37	1,63
K1S687	CGI_10028902	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028902 PE=4 SV=1	24650	12,24	0,37	1,63
K1Q2A1	CGI_10000994	Amidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000994 PE=4 SV=1	59114	10,83	0,37	1,63
K1Q4W6	CGI_10025850	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025850 PE=4 SV=1	84522	21,18	0,36	1,64
K1PGS0	CGI_10005256	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005256 PE=4 SV=1	22297	20,95	0,36	1,64
K1QFK6	CGI_10020344	Troponin C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020344 PE=4 SV=1	25651	16,78	0,36	1,64

K1Q1A3	CGI_10002037	UPF0124 protein C13orf31 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002037 PE=4 SV=1	38856	15,79	0,36	1,64
K1R4H7	CGI_10014090	Purine nucleoside phosphorylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014090 PE=4 SV=1	73352	14,39	0,35	1,65
K1RNG6	CGI_10027501	Serine--pyruvate aminotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027501 PE=3 SV=1	42852	13,75	0,35	1,65
K1RJQ4	CGI_10012736	Protein phosphatase inhibitor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012736 PE=4 SV=1	22420	12,44	0,35	1,65
K1RHB3	CGI_10022015	Phosphoenolpyruvate phosphomutase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022015 PE=4 SV=1	36235	22,33	0,34	1,66
K1S6S4	CGI_10022332	Metalloendopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022332 PE=4 SV=1	37330	14,48	0,34	1,66
K1RRY6	CGI_10022815	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022815 PE=4 SV=1	22023	11,05	0,34	1,66
K1R2N6	CGI_10021010	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021010 PE=4 SV=1	25641	19,06	0,33	1,67
K1RDX5	CGI_10022249	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022249 PE=3 SV=1	26920	18,58	0,33	1,67
K1R832	CGI_10025379	Protein unc-87 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025379 PE=4 SV=1	56984	16,85	0,33	1,67
K1REN5	CGI_10028018	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028018 PE=4 SV=1	25502	15,73	0,33	1,67
K1QUQ2	CGI_10023850	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023850 PE=3 SV=1	15865	23,65	0,32	1,68
K1QFJ4	CGI_10006249	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006249 PE=4 SV=1	101096	19,43	0,32	1,68
K1RE34	CGI_10010762	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010762 PE=4 SV=1	82541	15,41	0,32	1,68
K1RL06	CGI_10023610	Kyphoscoliosis peptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023610 PE=4 SV=1	24025	15,12	0,32	1,68
K1PK14	CGI_10013358	Beta-galactosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013358 PE=3 SV=1	70965	13,12	0,32	1,68
K1PBH1	CGI_10004435	Sarcoplasmic calcium-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004435 PE=4 SV=1	20680	31,21	0,31	1,69
K1QRG3	CGI_10026323	Guanine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026323 PE=4 SV=1	50046	29,69	0,31	1,69
K1Q2K8	CGI_10005470	Glutathione peroxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005470 PE=4 SV=1	26545	19,65	0,31	1,69
K1PH24	CGI_10020905	Uncharacterized protein C11D3.13 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020905 PE=4 SV=1	39860	14,99	0,31	1,69
K1P2H1	CGI_10016767	Fatty acid-binding protein adipocyte OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016767 PE=4 SV=1	14307	12,03	0,3	1,7
K1QKM4	CGI_10007621	Xylose isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007621 PE=3 SV=1	99065	10,05	0,3	1,7
K1PJF4	CGI_10003310	Isoleucyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003310 PE=3 SV=1	166715	15,48	0,29	1,71
K1PM19	CGI_10018252	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018252 PE=4 SV=1	22107	10,69	0,29	1,71
K1PR19	CGI_10004188	Sulfotransferase 1C4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004188 PE=4 SV=1	34329	20,99	0,28	1,72
K1Q8V9	CGI_10012293	Agmatinase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012293 PE=3 SV=1	36607	19,28	0,28	1,72
K1QFV5	CGI_10013163	Tropomyosin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013163 PE=4 SV=1	33730	16,6	0,28	1,72
K1QXM1	CGI_10012583	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012583 PE=4 SV=1	10668	14	0,28	1,72
K1R4S7	CGI_10021264	Ras-related protein Rab-10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021264 PE=4 SV=1	24208	16,02	0,27	1,73
K1Q8Y2	CGI_10023927	Monomeric sarcosine oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023927 PE=4 SV=1	45860	15,67	0,27	1,73
K1Q2Z6	CGI_10019698	Carboxylic ester hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019698 PE=3 SV=1	69733	14,13	0,27	1,73
K1Q5P7	CGI_10027458	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027458 PE=3 SV=1	23741	13	0,27	1,73
K1PV73	CGI_10000713	Pyridoxal phosphate phosphatase PHOSPHO2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000713 PE=4 SV=1	28635	10,97	0,27	1,73
K1Q8P5	CGI_10021822	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021822 PE=4 SV=1	35277	22,24	0,26	1,74
K1PNZ5	CGI_10003355	Catalase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003355 PE=3 SV=1	58005	20,78	0,26	1,74
K1RFU6	CGI_10023719	Proteasome activator complex subunit 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023719 PE=4 SV=1	29152	19,09	0,26	1,74
K1QRR1	CGI_10011301	Calmodulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011301 PE=4 SV=1	17849	16,95	0,26	1,74
K1R8W7	CGI_10021946	Fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021946 PE=4 SV=1	35860	16,25	0,26	1,74
K1QY41	CGI_10026345	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026345 PE=4 SV=1	13393	15,98	0,26	1,74
K1Q585	CGI_10016721	Cathepsin L OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016721 PE=3 SV=1	36987	11,99	0,26	1,74
K1RYF7	CGI_10011376	Heat shock protein beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011376 PE=3 SV=1	19687	19,77	0,25	1,75
K1QPE8	CGI_10026602	Chitotriosidase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026602 PE=3 SV=1	67602	12,93	0,25	1,75
K1PI52	CGI_10017903	Aldose 1-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017903 PE=3 SV=1	41381	24,26	0,24	1,76
K1PLF9	CGI_10021481	Arginine kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021481 PE=3 SV=1	39624	20,7	0,24	1,76
K1R0U2	CGI_10028928	Peptidase M20 domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028928 PE=4 SV=1	50630	13,68	0,23	1,77
K1Q0U6	CGI_10024026	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024026 PE=4 SV=1	27042	11,34	0,21	1,79
K1QET9	CGI_10027363	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027363 PE=4 SV=1	45650	21,16	0,2	1,8
K1RQC1	CGI_10024698	Xanthine dehydrogenase/oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024698 PE=4 SV=1	148529	12,25	0,2	1,8
K1Q3P8	CGI_10028727	Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX4 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028727 PE=3 SV=1	49983	11,31	0,19	1,81
K1R1A1	CGI_10013781	Xanthine dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013781 PE=4 SV=1	175159	14,68	0,18	1,82

K1Q2V0	CGI_10015209	Aldo-keto reductase family 1 member B10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015209 PE=4 SV=1	31679	10,43	0,18	1,82
K1PV71	CGI_10006552	Calumenin-B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006552 PE=4 SV=1	36657	17,6	0,17	1,83
K1QYM5	CGI_10020716	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020716 PE=3 SV=1	27303	10,63	0,16	1,84
K1QPB7	CGI_10020432	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020432 PE=4 SV=1	27147	15,13	0,14	1,86
K1QNY4	CGI_10025919	Salivary glue protein Sgs-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025919 PE=4 SV=1	223955	19,03	0,11	1,89
K1QTN3	CGI_10017498	Glycosyltransferase 25 family member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017498 PE=4 SV=1	69860	12,65	0,1	1,9
K1S493	CGI_10028030	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028030 PE=4 SV=1	174363	12,09	0,1	1,9
K1QJ85	CGI_10013077	Glutathione S-transferase A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013077 PE=3 SV=1	23058	10,39	0,1	1,9
K1PNR5	CGI_10015207	Aldo-keto reductase family 1 member B10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015207 PE=4 SV=1	25846	12,79	0,08	1,92
K1Q3E1	CGI_10024986	Hyaluronan mediated motility receptor OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024986 PE=4 SV=1	164810	25,46	0,05	1,95

Crassostrea gigas - Stade 1			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	3nalpha	3nbeta
K1QHV6	CGI_10018227	Whirlin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018227 PE=4 SV=1	16662	23,31	1,62	0,38
K1RA17	CGI_10023658	Tetraspanin-7 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023658 PE=3 SV=1	67253	17,24	1,57	0,43
K1PW06	CGI_10003521	Filamin-C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003521 PE=4 SV=1	323737	16,33	1,43	0,57
K1PJC1	CGI_10003372	Adipophilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003372 PE=3 SV=1	54040	15,09	1,41	0,59
K1QHK9	CGI_10004652	Dynein heavy chain cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004652 PE=4 SV=1	561577	12,1	1,4	0,6
K1PV35	CGI_10001357	Kyphoscoliosis peptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001357 PE=4 SV=1	77787	14,95	1,36	0,64
K1R1K6	CGI_10017582	Heat shock protein beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017582 PE=3 SV=1	27702	14,69	1,36	0,64
K1QMT1	CGI_10009495	DnaJ-like protein subfamily B member 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009495 PE=4 SV=1	38825	14,29	1,34	0,66
K1RUY4	CGI_10017093	ADP-ribosylation factor-like protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017093 PE=3 SV=1	20925	16,98	0,67	1,33
K1Q947	CGI_10000075	Dynein light chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000075 PE=3 SV=1	10319	10,63	0,67	1,33
K1Q4W6	CGI_10025850	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025850 PE=4 SV=1	84522	13,21	0,66	1,34
K1Q645	CGI_10023797	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023797 PE=3 SV=1	35682	10,98	0,66	1,34
K1QV25	CGI_10020575	Transcription elongation factor B polypeptide 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020575 PE=4 SV=1	12724	10,21	0,66	1,34
K1QKF8	CGI_10022811	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022811 PE=3 SV=1	39729	26,24	0,65	1,35
K1PVF6	CGI_10011558	Proteasome subunit beta OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011558 PE=3 SV=1	30059	13,47	0,65	1,35
K1Q105	CGI_10012403	Ferrochelatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012403 PE=3 SV=1	41656	12,88	0,65	1,35
K1R716	CGI_10018989	Putative isovaleryl-CoA dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018989 PE=3 SV=1	41500	12,6	0,65	1,35
K1RZR1	CGI_10013525	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013525 PE=4 SV=1	64765	10,5	0,65	1,35
K1Q4C3	CGI_10006585	Fumarylacetoacetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006585 PE=4 SV=1	46288	28,19	0,64	1,36
K1QZX2	CGI_10009528	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009528 PE=3 SV=1	66727	16,34	0,64	1,36
K1RN77	CGI_10019269	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019269 PE=4 SV=1	72947	13,81	0,64	1,36
K1QE94	CGI_10019827	Alpha-galactosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019827 PE=3 SV=1	60569	13,53	0,64	1,36
K1QSA2	CGI_10025345	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025345 PE=3 SV=1	47570	13,37	0,64	1,36
K1RGQ0	CGI_10025622	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025622 PE=4 SV=1	34059	10,73	0,64	1,36
K1R866	CGI_10028148	Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028148 PE=4 SV=1	116127	31,32	0,63	1,37
K1Q463	CGI_10007355	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007355 PE=3 SV=1	28957	20,55	0,63	1,37
K1QRR4	CGI_10007593	ADP-ribose pyrophosphatase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007593 PE=4 SV=1	33923	19,32	0,63	1,37
K1PUE0	CGI_10014929	Cystathionine beta-synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014929 PE=3 SV=1	71149	18,36	0,63	1,37
K1R109	CGI_10025422	Malate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025422 PE=4 SV=1	36780	17,1	0,63	1,37
K1P8B7	CGI_10007222	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007222 PE=3 SV=1	14700	16,73	0,63	1,37
K1QC26	CGI_10025772	Plasma alpha-L-fucosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025772 PE=3 SV=1	52803	16,25	0,63	1,37
K1R7Q8	CGI_10013503	Transporter OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013503 PE=3 SV=1	81414	15,76	0,63	1,37
K1QNZ7	CGI_10006535	Ubiquilin-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006535 PE=4 SV=1	61816	15,58	0,63	1,37
K1PVV6	CGI_10000669	Putative aminopeptidase W07G4.4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000669 PE=4 SV=1	55710	13,88	0,63	1,37
K1QGK6	CGI_10013640	Adenosine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013640 PE=4 SV=1	42126	11,7	0,63	1,37
K1QMS4	CGI_10021969	Alpha-N-acetylglucosaminidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021969 PE=4 SV=1	99348	10,64	0,63	1,37
K1QYA2	CGI_10026385	UDP-glucose 4-epimerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026385 PE=3 SV=1	37356	12,27	0,62	1,38
K1P137	CGI_10000611	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000611 PE=3 SV=1	16686	12,01	0,62	1,38
K1RK12	CGI_10028140	40S ribosomal protein S23 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028140 PE=4 SV=1	79569	11,7	0,62	1,38
K1PIB7	CGI_10011753	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011753 PE=4 SV=1	82692	11,98	0,61	1,39
K1QMF0	CGI_10026261	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026261 PE=3 SV=1	72017	11,98	0,61	1,39
K1RAL0	CGI_10014092	Aspartate aminotransferase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014092 PE=4 SV=1	45714	11,74	0,61	1,39
K1PJP2	CGI_10012061	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012061 PE=4 SV=1	83036	11,13	0,61	1,39
K1R2Q9	CGI_10017668	Aspartate aminotransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017668 PE=4 SV=1	43186	10,56	0,61	1,39
K1QAY3	CGI_10017854	Dipeptidyl-peptidase 1 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017854 PE=3 SV=1	44672	15,08	0,6	1,4
K1Q4E1	CGI_10013314	N-acetyl-D-glucosamine kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013314 PE=4 SV=1	44267	14	0,6	1,4
K1R5G5	CGI_10018507	Insulin-degrading enzyme OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018507 PE=3 SV=1	117333	12,61	0,6	1,4
K1PJF4	CGI_10003310	Isoleucyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003310 PE=3 SV=1	166715	10,78	0,6	1,4

K1S4Y8	CGI_10016359	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016359 PE=4 SV=1	65713	23,05	0,59	1,41
K1P1Z8	CGI_10000102	Tubulin-specific chaperone E OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000102 PE=4 SV=1	28141	17,18	0,59	1,41
K1R7V7	CGI_10012330	Tubulin beta chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012330 PE=3 SV=1	49936	16,17	0,59	1,41
K1RAZ8	CGI_10013074	Prenylcysteine oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013074 PE=4 SV=1	72946	14,61	0,59	1,41
K1Q4F6	CGI_10021896	5'-nucleotidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021896 PE=3 SV=1	33607	13,68	0,59	1,41
K1QCC9	CGI_10019057	Protein disulfide-isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019057 PE=3 SV=1	71521	14,7	0,58	1,42
K1Q9X5	CGI_10004940	Acetoacetyl-CoA synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004940 PE=4 SV=1	80548	14,34	0,58	1,42
K1R9C2	CGI_10015243	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015243 PE=4 SV=1	38706	12,5	0,58	1,42
K1PXL6	CGI_10004458	Spermatogenesis-associated protein 20 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004458 PE=4 SV=1	77120	12,18	0,58	1,42
K1PZX5	CGI_10014377	WD repeat-containing protein 54 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014377 PE=4 SV=1	35870	10,55	0,58	1,42
K1PH54	CGI_10019638	Semaphorin-2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019638 PE=4 SV=1	46605	17,85	0,57	1,43
K1QA50	CGI_10014337	V-type proton ATPase subunit H OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014337 PE=3 SV=1	55442	17,94	0,56	1,44
K1QWY7	CGI_10015274	Plasma alpha-L-fucosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015274 PE=3 SV=1	62843	16,52	0,56	1,44
K1QSY6	CGI_10009070	Tetratricopeptide repeat protein 38 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009070 PE=4 SV=1	19622	15,36	0,56	1,44
K1QB76	CGI_10028811	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028811 PE=4 SV=1	110405	14,7	0,56	1,44
K1QQV1	CGI_10022001	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022001 PE=4 SV=1	41965	13,66	0,56	1,44
K1PNR3	CGI_10015202	Clathrin heavy chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015202 PE=3 SV=1	191892	13,65	0,56	1,44
K1QRW5	CGI_10017862	Arginase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017862 PE=3 SV=1	38199	13,21	0,56	1,44
K1Q8L9	CGI_10013849	Eukaryotic translation initiation factor 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013849 PE=4 SV=1	50845	10,81	0,56	1,44
K1RJK6	CGI_10026433	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026433 PE=4 SV=1	24512	10,68	0,56	1,44
K1QRD4	CGI_10027210	S-formylglutathione hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027210 PE=3 SV=1	31184	10,28	0,56	1,44
K1RNJ2	CGI_10027529	Hydroxyacylglutathione hydrolase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027529 PE=3 SV=1	31659	17,93	0,55	1,45
K1S3Y1	CGI_10025279	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase mitochondrial (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025279 PE=3 SV=1	43417	12,16	0,55	1,45
K1Q8N8	CGI_10011950	PRA1 family protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011950 PE=3 SV=1	20368	11,43	0,55	1,45
K1R7S5	CGI_10026446	Rho GTPase-activating protein 8 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026446 PE=4 SV=1	47006	13,53	0,54	1,46
K1RKZ5	CGI_10005537	DNA damage-binding protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005537 PE=4 SV=1	129438	12,9	0,54	1,46
K1QBE4	CGI_10009380	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009380 PE=3 SV=1	34819	10,27	0,54	1,46
K1Q7K0	CGI_10007785	Putative serine carboxypeptidase CPVL OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007785 PE=3 SV=1	58210	15,57	0,53	1,47
K1PGS0	CGI_10005256	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005256 PE=4 SV=1	22297	15,37	0,53	1,47
K1QTH1	CGI_10026089	Protein archease OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026089 PE=4 SV=1	12951	11,26	0,53	1,47
K1Q253	CGI_10016534	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016534 PE=4 SV=1	70714	10,71	0,53	1,47
K1PG84	CGI_10000045 CGI_10019425	Glutaredoxin-C6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000045 PE=4 SV=1	11569	16,4	0,52	1,48
K1PSR5	CGI_10008477	Fatty acid-binding protein heart OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008477 PE=4 SV=1	14930	12,69	0,52	1,48
K1Q7E6	CGI_10019531	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019531 PE=4 SV=1	225133	12,21	0,52	1,48
K1Q0S7	CGI_10013789	Citrate lyase subunit beta-like protein mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013789 PE=4 SV=1	37513	16,46	0,51	1,49
K1QR72	CGI_10017163	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017163 PE=3 SV=1	84168	14,4	0,51	1,49
K1QP10	CGI_10013699	Alpha-parvin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013699 PE=4 SV=1	20618	14,14	0,51	1,49
K1RAU8	CGI_10021270	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021270 PE=3 SV=1	51034	12,99	0,51	1,49
K1PH89	CGI_10008850	Calumenin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008850 PE=4 SV=1	47659	11,96	0,51	1,49
K1PY78	CGI_10015475	Deoxyhypusine hydroxylase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015475 PE=3 SV=1	34242	11,53	0,51	1,49
K1PH10	CGI_10014652	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014652 PE=4 SV=1	47629	11,53	0,51	1,49
K1PWP4	CGI_10005385	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005385 PE=4 SV=1	56201	11,46	0,51	1,49
K1PAR4	CGI_10012024	Unc-45-like protein A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012024 PE=4 SV=1	104557	11,26	0,51	1,49
K1PWR0	CGI_10018072	Protein SET OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018072 PE=3 SV=1	28104	23,27	0,5	1,5
K1QLH0	CGI_10024227	Peroxiredoxin-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024227 PE=4 SV=1	27525	20,11	0,5	1,5
K1PQE3	CGI_10011751	RNA-binding protein Raly OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011751 PE=4 SV=1	32552	16,98	0,5	1,5
K1PG07	CGI_10005904	Lupus La-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005904 PE=4 SV=1	65606	15,16	0,5	1,5
K1QXJ9	CGI_10025058	Pantothenate kinase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025058 PE=4 SV=1	45577	12,85	0,49	1,51
K1R0M4	CGI_10007787	Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007787 PE=4 SV=1	10251	11,35	0,49	1,51
K1RE34	CGI_10010762	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010762 PE=4 SV=1	82541	19,75	0,48	1,52

K1Q9B9	CGI_10004598	Carnitine O-palmitoyltransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004598 PE=4 SV=1	52531	16,04	0,48	1,52
K1P8X5	CGI_10000031 CGI_10011849	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000031 PE=4 SV=1	10927	13,34	0,48	1,52
K1Q6X5	CGI_10026048	Protein disulfide-isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026048 PE=3 SV=1	55500	13,29	0,48	1,52
K1QBM3	CGI_10010490	Ras-related protein Rab-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010490 PE=4 SV=1	23349	13,23	0,48	1,52
K1QZK4	CGI_10023406	Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023406 PE=4 SV=1	38014	12,47	0,47	1,53
K1Q3R9	CGI_10028776	3 2-trans-enoyl-CoA isomerase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028776 PE=3 SV=1	42023	10,79	0,47	1,53
K1Q5P0	CGI_10009797	60S ribosomal protein L17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009797 PE=3 SV=1	57774	12,26	0,46	1,54
K1P2B8	CGI_10017702	GDP-mannose 4 6 dehydratase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017702 PE=3 SV=1	42810	18,75	0,45	1,55
K1PZS6	CGI_10003541	Dynactin subunit 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003541 PE=4 SV=1	44630	15,09	0,45	1,55
K1QH58	CGI_10015793	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015793 PE=3 SV=1	25624	13,79	0,45	1,55
K1PNI1	CGI_10016170	Bifunctional protein NCOAT OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016170 PE=4 SV=1	91874	13,28	0,45	1,55
K1QG04	CGI_10011647	Carboxypeptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011647 PE=3 SV=1	42711	11,11	0,45	1,55
K1Q2L2	CGI_10009164	60S ribosomal protein L12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009164 PE=3 SV=1	18737	10,07	0,45	1,55
K1PM66	CGI_10000595	60S ribosomal protein L12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000595 PE=3 SV=1	17781	10,07	0,45	1,55
K1R028	CGI_10023898	Calmodulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023898 PE=4 SV=1	60161	14,71	0,44	1,56
K1RRT2	CGI_10028391	Coiled-coil domain-containing protein 91 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028391 PE=4 SV=1	58528	10,61	0,44	1,56
K1RK73	CGI_10028199	Calcyphosin-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028199 PE=4 SV=1	30571	15,29	0,43	1,57
K1QQL6	CGI_10017030	Leucyl-tRNA synthetase cytoplasmic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017030 PE=3 SV=1	136616	14,78	0,43	1,57
K1QGB4	CGI_10005808	40S ribosomal protein S17 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005808 PE=3 SV=1	16233	14,05	0,43	1,57
K1QAX2	CGI_10014330	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014330 PE=4 SV=1	17551	13,33	0,43	1,57
K1QUU0	CGI_10024094	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024094 PE=4 SV=1	60627	13,27	0,43	1,57
K1QN24	CGI_10017980	Carboxypeptidase B OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017980 PE=4 SV=1	44162	10,41	0,43	1,57
K1R1I0	CGI_10022305	Peptidylprolyl isomerase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022305 PE=4 SV=1	16110	23,59	0,42	1,58
K1R282	CGI_10026893	Adenylate kinase isoenzyme 5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026893 PE=3 SV=1	99843	11,05	0,42	1,58
K1Q9T1	CGI_10014625	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014625 PE=4 SV=1	223165	21	0,41	1,59
K1PB94	CGI_10011426	ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011426 PE=4 SV=1	84606	16,5	0,41	1,59
K1PW28	CGI_10005973	mRNA-decapping enzyme 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005973 PE=4 SV=1	48441	11,27	0,41	1,59
K1PH31	CGI_10014628	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014628 PE=3 SV=1	41298	14,08	0,4	1,6
K1PQA3	CGI_10004718	Pseudouridylate synthase 7-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004718 PE=4 SV=1	48547	13,38	0,4	1,6
K1R3V8	CGI_10019314	COP9 signalosome complex subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019314 PE=4 SV=1	46498	16,61	0,38	1,62
K1RRV5	CGI_10008675	Glucosylceramidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008675 PE=3 SV=1	21838	13,61	0,38	1,62
K1R7D7	CGI_10013963	Poly(A)-specific ribonuclease PARN OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013963 PE=4 SV=1	55085	25,68	0,37	1,63
K1RDV2	CGI_10004935	Myotrophin-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004935 PE=3 SV=1	35501	13,43	0,37	1,63
K1PK85	CGI_10008933	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008933 PE=4 SV=1	138764	20,71	0,36	1,64
K1QEF9	CGI_10001021	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001021 PE=4 SV=1	62363	18,36	0,36	1,64
K1PQZ3	CGI_10010784	Armadillo repeat-containing protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010784 PE=4 SV=1	119666	17,94	0,35	1,65
K1QEJ3	CGI_10009320	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009320 PE=4 SV=1	37611	22,9	0,33	1,67
K1R0U2	CGI_10028928	Peptidase M20 domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028928 PE=4 SV=1	50630	12,56	0,33	1,67
K1RDT2	CGI_10026256	WD repeat-containing protein 16 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026256 PE=4 SV=1	73787	11,84	0,33	1,67
K1Q3N8	CGI_10012019	Src substrate cortactin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012019 PE=4 SV=1	76574	10,58	0,32	1,68
K1PV49	CGI_10019470	RuvB-like helicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019470 PE=3 SV=1	52574	18,08	0,28	1,72
K1PSD0	CGI_10008571	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008571 PE=4 SV=1	39255	13,48	0,28	1,72
K1RLX8	CGI_10020996	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2-A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020996 PE=4 SV=1	59866	15,17	0,27	1,73
K1QY89	CGI_10024815 CGI_10024816	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold-like protein mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024815 PE=4 SV=1	23369	12,33	0,27	1,73
K1QFK7	CGI_10017122	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017122 PE=4 SV=1	40573	12,12	0,26	1,74
K1R401	CGI_10025721	Spectrin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025721 PE=4 SV=1	287004	12,99	0,25	1,75
K1QGQ4	CGI_10024548	Uridine 5'-monophosphate synthase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024548 PE=3 SV=1	53505	16,01	0,23	1,77
K1R852	CGI_10021960	Ras-related protein Rab-3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021960 PE=4 SV=1	24809	33,39	0,22	1,78
K1RYF7	CGI_10011376	Heat shock protein beta-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10011376 PE=3 SV=1	19687	21,34	0,17	1,83

K1RMW3	CGI_10022162	Protein kinase C OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022162 PE=3 SV=1	70300	10,39	0,17	1,83
K1QET6	CGI_10022557	Neurobeachin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022557 PE=4 SV=1	243863	12,13	0,15	1,85
K1R4F0	CGI_10021872	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021872 PE=3 SV=1	16924	12,89	0,13	1,87
K1S493	CGI_10028030	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028030 PE=4 SV=1	174363	12,87	0,11	1,89
K1R7K4	CGI_10021633	N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021633 PE=4 SV=1	45437	17,7	0,05	1,95
K1PL64	CGI_10002228	Poly(A) polymerase gamma OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002228 PE=4 SV=1	84456	11,54	0,04	1,96

Protéines différentiellement exprimées entre les individus diploïdes et triploïdes mâles au stade 2 de différenciation des cellules germinales.

Crassostrea gigas - Stade 2			MW (Da)	Significance	Group ratios		
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nalpha	3nbeta
K1QCF5	CGI_10019072	Fumarate hydratase class I aerobic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019072 PE=4 SV=1	62791	10,81	1,87	0,32	0,8
K1PXC3	CGI_10025810	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025810 PE=4 SV=1	35248	10,62	1,83	0,47	0,7
K1QWU9	CGI_10016612	Allantoicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016612 PE=3 SV=1	47148	13,79	1,67	0,43	0,9
K1QX22	CGI_10022007	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022007 PE=4 SV=1	211578	13,5	1,6	0,66	0,74
K1PMP2	CGI_10000267	Phosphoglucomutase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000267 PE=4 SV=1	13265	10,28	1,6	0,35	1,05
K1QJN3	CGI_10019234	Oligoribonuclease mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019234 PE=4 SV=1	20929	11,08	1,59	1,29	0,12
K1QQB3	CGI_10008716	Glycyl-tRNA synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008716 PE=4 SV=1	84591	10,56	1,58	0,65	0,77
K1PD48	CGI_10008470	Beta-ureidopropionase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008470 PE=4 SV=1	41995	12,21	1,56	0,75	0,69
K1RDF6	CGI_10028471	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028471 PE=3 SV=1	52164	11,16	1,53	0,87	0,6
K1Q2Y9	CGI_10012378	Centriolin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012378 PE=4 SV=1	283933	10,91	1,5	0,91	0,59
K1QZX8	CGI_10009534	Myosin-XVI OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009534 PE=3 SV=1	256953	13,56	1,45	1,2	0,35
K1Q8V9	CGI_10012293	Agmatinase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012293 PE=3 SV=1	36607	11,78	1,41	0,99	0,6
K1PRF8	CGI_10012056	Regucalcin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012056 PE=4 SV=1	33411	10,14	1,4	1,04	0,56
K1QTK2	CGI_10021062	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021062 PE=4 SV=1	22237	11,3	1,24	0,57	1,19
K1R158	CGI_10014742	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014742 PE=4 SV=1	46119	11,63	0,9	0,39	1,71
K1QDH0	CGI_10016250	Group XV phospholipase A2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016250 PE=4 SV=1	54708	11,81	0,73	1,63	0,64
K1QI40	CGI_10018510	Selenium-binding protein 1 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018510 PE=4 SV=1	53353	15,06	0,67	1,53	0,8
K1QS22	CGI_10013384	UPF0160 protein MYG1 mitochondrial (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013384 PE=4 SV=1	39219	15,02	0,63	1,03	1,34
K1Q9G3	CGI_10019894	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019894 PE=3 SV=1	39658	10,59	0,47	0,98	1,54
K1R920	CGI_10026140	Eukaryotic translation initiation factor 1A X-chromosomal OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026140 PE=3 SV=1	21140	10,92	0,45	0,63	1,92
K1R401	CGI_10025721	Spectrin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025721 PE=4 SV=1	287004	11,04	0,34	0,75	1,91
K1PMT6	CGI_10015594	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015594 PE=4 SV=1	84135	17,78	0,2	1,01	1,79
K1Q369	CGI_10028583	C-type mannose receptor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028583 PE=4 SV=1	49968	10,36	0,2	1,57	1,23

Crassostrea gigas - Stade 2			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nalpha
K1QLJ4	CGI_10022842	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022842 PE=4 SV=1	16053	18,19	1,7	0,3
K1PZ57	CGI_10004443	L-ascorbate oxidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004443 PE=3 SV=1	83732	18	1,61	0,39
K1QNP9	CGI_10017333	Putative deoxyribose-phosphate aldolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017333 PE=4 SV=1	35148	13,73	1,61	0,39
K1PXC3	CGI_10025810	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025810 PE=4 SV=1	35248	13,69	1,59	0,41
K1RLT0	CGI_10020559	D-erythrulose reductase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020559 PE=4 SV=1	25953	12,81	1,59	0,41
K1PMP2	CGI_10000267	Phosphoglucomutase-1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000267 PE=4 SV=1	13265	12,6	1,59	0,41
K1PC14	CGI_10004022	Proapoptotic caspase adapter protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004022 PE=4 SV=1	23518	10,42	1,57	0,43
K1QVR0	CGI_10014835	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014835 PE=4 SV=1	30836	10,59	1,54	0,46
K1Q2P9	CGI_10002264	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10002264 PE=4 SV=1	14995	20,62	1,52	0,48
K1Q8P5	CGI_10021822	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021822 PE=4 SV=1	35277	14,1	1,49	0,51
K1QKU3	CGI_10023805	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023805 PE=4 SV=1	24604	10,11	1,47	0,53
K1PXZ4	CGI_10008263	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008263 PE=4 SV=1	17209	12,71	1,45	0,55
K1R107	CGI_10010837	S-crystallin SL11 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010837 PE=3 SV=1	31071	10,2	1,45	0,55
K1QEK7	CGI_10007216	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007216 PE=3 SV=1	89265	19,15	1,42	0,58
K1R8I8	CGI_10024545	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024545 PE=3 SV=1	52060	14,53	1,41	0,59
K1QX22	CGI_10022007	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022007 PE=4 SV=1	211578	13,84	1,41	0,59
K1QCF5	CGI_10019072	Fumarate hydratase class I aerobic OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019072 PE=4 SV=1	62791	10,58	1,41	0,59
K1QAR3	CGI_10003693	UMP-CMP kinase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003693 PE=4 SV=1	42478	11,47	1,4	0,6
K1QXY1	CGI_10016846	Glycerol kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016846 PE=4 SV=1	23293	11,5	1,38	0,62
K1QBX0	CGI_10021544	Glutathione S-transferase 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021544 PE=4 SV=1	24943	11,41	1,38	0,62
K1PD48	CGI_10008470	Beta-ureidopropionase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008470 PE=4 SV=1	41995	10,11	1,35	0,65
K1PPK1	CGI_10023363	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023363 PE=3 SV=1	19643	13,48	1,34	0,66
K1QBN4	CGI_10018455	NSFL1 cofactor p47 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018455 PE=4 SV=1	28655	10,49	0,66	1,34
K1PV35	CGI_10001357	Kyphoscoliosis peptidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001357 PE=4 SV=1	77787	17,11	0,62	1,38
K1QDH0	CGI_10016250	Group XV phospholipase A2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016250 PE=4 SV=1	54708	13,49	0,62	1,38
K1R0Y3	CGI_10027951	Ras-related protein Rap-1b OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027951 PE=4 SV=1	20983	12,9	0,58	1,42
K1QK84	CGI_10005207	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005207 PE=4 SV=1	13201	15,03	0,57	1,43
K1PIF4	CGI_10004667	Plasma alpha-L-fucosidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004667 PE=3 SV=1	46480	13,1	0,56	1,44
K1R2C6	CGI_10006640	Alkaline phosphatase tissue-nonspecific isozyme OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006640 PE=3 SV=1	57546	11,98	0,56	1,44
K1QA19	CGI_10015782	Calmodulin-like protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015782 PE=4 SV=1	29737	11,28	0,56	1,44
K1PR14	CGI_10028252	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028252 PE=4 SV=1	47097	11,49	0,55	1,45
K1RAU7	CGI_10028829	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028829 PE=4 SV=1	44044	11,35	0,55	1,45
K1QXD2	CGI_10017736	Prefoldin subunit 6 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017736 PE=4 SV=1	14495	13,42	0,53	1,47
K1R459	CGI_10022620	SCO-spondin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022620 PE=4 SV=1	104602	11,47	0,46	1,54
K1R4S7	CGI_10021264	Ras-related protein Rab-10 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021264 PE=4 SV=1	24208	11,41	0,42	1,58
K1RFT1	CGI_10015239	Band 4.1-like protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015239 PE=4 SV=1	175634	12,25	0,38	1,62
K1QI52	CGI_10004099	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004099 PE=4 SV=1	40274	11,59	0,33	1,67
K1PJG0	CGI_10015188	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015188 PE=4 SV=1	25796	14,55	0,28	1,72
K1Q369	CGI_10028583	C-type mannose receptor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028583 PE=4 SV=1	49968	13,56	0,22	1,78
K1QJU8	CGI_10005261	Putative phospholipase B-like 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005261 PE=4 SV=1	150505	14,48	0,21	1,79

Crassostrea gigas - Stade 2			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	2n	3nbeta
K1QD88	CGI_10008555	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD+] OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008555 PE=3 SV=1	27605	10,55	1,63	0,37
K1Q8I9	CGI_10001845	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001845 PE=4 SV=1	12669	10,68	1,57	0,43
K1QRG3	CGI_10026323	Guanine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026323 PE=4 SV=1	50046	13,69	1,56	0,44
K1QCQ9	KYNU CGI_10008930	Kynureninase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=KYNU PE=3 SV=1	61577	12,66	1,5	0,5
K1Q2A1	CGI_10000994	Amidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10000994 PE=4 SV=1	59114	12,25	1,5	0,5
K1PD48	CGI_10008470	Beta-ureidopropionase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008470 PE=4 SV=1	41995	14,94	1,45	0,55
K1PXC3	CGI_10025810	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025810 PE=4 SV=1	35248	10,31	1,45	0,55
K1Q2Y9	CGI_10012378	Centriolin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012378 PE=4 SV=1	283933	13,7	1,43	0,57
K1PYB0	CGI_10027462	Cofilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027462 PE=3 SV=1	18617	18,48	1,42	0,58
K1PR19	CGI_10004188	Sulfotransferase 1C4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004188 PE=4 SV=1	34329	16,25	1,42	0,58
K1Q8V9	CGI_10012293	Agmatinase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012293 PE=3 SV=1	36607	13,88	1,42	0,58
K1Q330	CGI_10028528	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028528 PE=3 SV=1	173917	11,4	1,41	0,59
K1RGD1	CGI_10003285	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003285 PE=3 SV=1	63676	13,77	1,4	0,6
K1PBB6	CGI_10010868	Ectoine hydroxylase (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010868 PE=4 SV=1	22559	10,58	1,4	0,6
K1QFP9	CGI_10001846	Ectoine hydroxylase (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001846 PE=4 SV=1	23145	10,58	1,4	0,6
K1RDF6	CGI_10028471	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028471 PE=3 SV=1	52164	14,08	1,39	0,61
K1PLX6	CGI_10007415	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007415 PE=4 SV=1	38399	12,78	1,39	0,61
K1Q3R9	CGI_10028776	3 2-trans-enoyl-CoA isomerase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028776 PE=3 SV=1	42023	12,72	1,38	0,62
K1RNB6	CGI_10015523	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015523 PE=3 SV=1	55217	13,81	1,37	0,63
K1QNT7	CGI_10012671	Aldehyde dehydrogenase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012671 PE=3 SV=1	56964	10,85	1,36	0,64
K1QE55	CGI_10009501	Methylmalonyl-CoA mutase mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009501 PE=4 SV=1	81727	20,65	1,34	0,66
K1PR93	CGI_10016672	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016672 PE=3 SV=1	42831	14,39	1,34	0,66
K1QX22	CGI_10022007	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022007 PE=4 SV=1	211578	13,84	1,34	0,66
K1QRW8	CGI_10007560	Pyruvate kinase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007560 PE=3 SV=1	58463	11,45	1,34	0,66
K1QQB3	CGI_10008716	Glycyl-tRNA synthetase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008716 PE=4 SV=1	84591	10,03	1,34	0,66
K1QCB0	CGI_10009651	40S ribosomal protein S5 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10009651 PE=4 SV=1	14190	11,61	0,65	1,35
K1PJC1	CGI_10003372	Adipophilin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003372 PE=3 SV=1	54040	15,2	0,61	1,39
K1RJH5	CGI_10021647	Polyadenylate-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021647 PE=3 SV=1	71660	12,79	0,61	1,39
K1Q9M0	CGI_10015300	tRNA (Cytosine-5-)-methyltransferase NSUN2 (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015300 PE=3 SV=1	84612	12,22	0,58	1,42
K1QQK1	CGI_10017011	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017011 PE=4 SV=1	52676	13,54	0,55	1,45
K1QLT5	CGI_10015357	26S protease regulatory subunit 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015357 PE=4 SV=1	97466	10,78	0,36	1,64
K1RYE4	CGI_10010027	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010027 PE=4 SV=1	20596	10,13	0,33	1,67
K1PMT6	CGI_10015594	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015594 PE=4 SV=1	84135	32,81	0,32	1,68
K1R401	CGI_10025721	Spectrin alpha chain OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025721 PE=4 SV=1	287004	13,94	0,3	1,7
K1Q369	CGI_10028583	C-type mannose receptor 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10028583 PE=4 SV=1	49968	12,11	0,28	1,72
K1R4F0	CGI_10021872	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10021872 PE=3 SV=1	16924	11,07	0,17	1,83
K1PV49	CGI_10019470	RuvB-like helicase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019470 PE=3 SV=1	52574	12,39	0,14	1,86

Crassostrea gigas - Stade 2			MW	Significance	Group ratios	
Accession	Gene name	Protein name	Avg. Mass	Significance	3nalpha	3nbeta
K1QCS7	CGI_10005776	Leucine-rich repeat-containing protein 16A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005776 PE=4 SV=1	183057	10,6	1,83	0,17
K1QVG0	CGI_10024742	Secernin-2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024742 PE=4 SV=1	46910	10,34	1,71	0,29
K1RMI6	CGI_10010068	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010068 PE=4 SV=1	57943	18,19	1,7	0,3
K1RQZ1	CGI_10022784	Glutathione S-transferase P 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022784 PE=3 SV=1	26873	10,83	1,61	0,39
K1PV52	CGI_10006718	Glutathione S-transferase P 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10006718 PE=3 SV=1	27929	10,83	1,61	0,39
K1P9M1	CGI_10005130 CGI_10015573	Mitochondrial enolase superfamily member 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005130 PE=4 SV=1	50033	10,78	1,61	0,39
K1QRG3	CGI_10026323	Guanine deaminase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10026323 PE=4 SV=1	50046	12,43	1,58	0,42
K1R716	CGI_10018989	Putative isovaleryl-CoA dehydrogenase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018989 PE=3 SV=1	41500	11,78	1,55	0,45
K1PD70	CGI_10003277	Apolipoprotein A-I-binding protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003277 PE=4 SV=1	36800	12,76	1,52	0,48
K1PFJ8	CGI_10001875	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10001875 PE=4 SV=1	22682	10,84	1,52	0,48
K1QZJ6	CGI_10023395	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023395 PE=4 SV=1	33930	13,83	1,48	0,52
K1QUC1	CGI_10018566	CDV3-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10018566 PE=4 SV=1	28813	12,62	1,45	0,55
Q70MM3	fer CGI_10027591	Ferritin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=fer PE=2 SV=1	19970	13,31	1,44	0,56
K1R8G6	CGI_10024518	Ester hydrolase C11orf54-like protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024518 PE=4 SV=1	33911	11,78	1,42	0,58
K1RB89	CGI_10019208	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 mitochondrial OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019208 PE=3 SV=1	53446	11,86	1,38	0,62
K1Q4S7	CGI_10015917	Calreticulin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10015917 PE=3 SV=1	61753	10,73	1,35	0,65
K1QQT2	CGI_10024826	Uncharacterized protein y4xO OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10024826 PE=4 SV=1	47015	10,38	0,65	1,35
K1Q435	CGI_10003139	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10003139 PE=4 SV=1	29392	11,54	0,62	1,38
K1PA22	CGI_10005809	Osteoclast-stimulating factor 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10005809 PE=4 SV=1	23765	14,84	0,56	1,44
K1PC14	CGI_10004022	Proapoptotic caspase adapter protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004022 PE=4 SV=1	23518	13,17	0,56	1,44
K1R158	CGI_10014742	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10014742 PE=4 SV=1	46119	18,07	0,55	1,45
K1Q9J5	CGI_10019390	Importin-4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10019390 PE=4 SV=1	121530	12,15	0,54	1,46
K1QQK1	CGI_10017011	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10017011 PE=4 SV=1	52676	11,09	0,51	1,49
K1PXZ4	CGI_10008263	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008263 PE=4 SV=1	17209	15,31	0,46	1,54
K1P421	CGI_10012372	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10012372 PE=3 SV=1	14159	17,01	0,43	1,57
K1RXS6	CGI_10025376	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10025376 PE=3 SV=1	14244	17,01	0,43	1,57
K1PUM2	CGI_10008058 CGI_10008063	Histone H2A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10008058 PE=3 SV=1	13485	17,01	0,43	1,57
K1QHT8	CGI_10023785	RNA-binding protein 8A OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10023785 PE=3 SV=1	62686	12,66	0,4	1,6
K1PXU6	CGI_10004554	60S ribosomal protein L24 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10004554 PE=4 SV=1	13244	10,13	0,38	1,62
K1PX47	CGI_10013187	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10013187 PE=3 SV=1	36541	13,28	0,36	1,64
K1QLJ4	CGI_10022842	Uncharacterized protein OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10022842 PE=4 SV=1	16053	13,47	0,35	1,65
K1QAG9	CGI_10016317	Ferritin OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10016317 PE=3 SV=1	30429	19,67	0,34	1,66
K1QMJ8	CGI_10020494	Transcription initiation factor IIA subunit 1 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020494 PE=4 SV=1	27535	19,58	0,31	1,69
K1PLW6	CGI_10007448	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007448 PE=4 SV=1	11919	13,24	0,31	1,69
K1QBI9	CGI_10027171	Cytosolic purine 5'-nucleotidase OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10027171 PE=4 SV=1	64347	13,53	0,26	1,74
K1PQZ3	CGI_10010784	Armadillo repeat-containing protein 4 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10010784 PE=4 SV=1	119666	12,08	0,23	1,77
K1RI55	CGI_10020146	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10020146 PE=4 SV=1	31163	10,82	0,17	1,83
K1PJY4	CGI_10007561	Calcium-binding protein 39 OS=Crassostrea gigas OX=29159 GN=CGI_10007561 PE=4 SV=1	33010	25,84	0,05	1,95

Bibliographie

Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. Nat Rev Mol Cell Biol *16*, 711–726.

Albertin, W., and Marullo, P. (2012). Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. Proc Biol Sci *279*, 2497–2509.

Aliaga, B., Bulla, I., Mouahid, G., Duval, D., and Grunau, C. (2019). Universality of the DNA methylation codes in Eucaryotes. Sci Rep *9*, 173.

Allen, S.K., and Stanley, J.G. (1978). Reproductive Sterility in Polyploid Brook Trout, Salvelinus fontinalis. Transactions of the American Fisheries Society 107, 473–478.

Allen, S.K., and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *102*, 197–208.

Allen, S.K.J. (Washington U., Symposium on Selection, H. and G.E. in A. of F. and S. for C. and S. eng 27-30 M. 1986 B. (France), and Tiews, K. (1987). Genetic manipulations: critical review of methods and performances for shellfish.

Allen, and Downing (1990). Hatchery manual for producing triploid oysters: S.K. Allen, S.L. Downing and K.K. Chew. Washington Sea Grant Program, 1989. Price US$8.00, 27 pp., ISBN 0-295-77031-7. Aquaculture *89*, 390.

Antonio, Í.G., and Camacho, A.P. (2018). Reproduction of the introduced oyster Crassostrea gigas (Bivalvia: Ostreidae) cultured on rafts in Spain. Acta Zoologica *0*.

Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. Mol Cell *31*, 785–799.

Banerjee, T., and Chakravarti, D. (2011). A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation. Molecular and Cellular Biology *31*, 4858–4873.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res *21*, 381–395.

Barlow, A.L., Benson, F.E., West, S.C., and Hultén, M.A. (1997). Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. The EMBO Journal *16*, 5207–5215.

Bayne, B.L. (2017). Oysters and the Ecosystem. In Developments in Aquaculture and Fisheries Science, pp. 703–834.

Bazin, L.H.I., and Rémy, M.-H. (2006). NEDD1 et les complexes de nucléation des microtubules : recruter pour mieux organiser. Med Sci (Paris) *22*, 804–806.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Mol Cell *33*, 1–13.

Bendjoudi, H., and Hubert, P. (2002). The Gravelius compactness coefficient: critical analysis of a shape index for drainage basins. Hydrological Sciences Journal *47*, 921–930.

Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C.N., Kausler, B.X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., et al. (2019). ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. Nat Methods *16*, 1226–1232.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. Genes Dev *23*, 781–783.

Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol *125*, 359–369.

Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., and Kellner, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). Invertebrate Reproduction & Development *40*, 79–86.

Bezzubova, O., Shinohara, A., Mueller, R.G., Ogawa, H., and Buerstedde, J.-M. (1993). A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. Nucleic Acids Research *21*, 1577–1580.

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics *25*, 1091–1093.

Birchler, J.A., Yao, H., and Chudalayandi, S. (2007). Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. Biochim Biophys Acta *1769*, 422–428.

Bishop, D.K., and Zickler, D. (2004). Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. Cell *117*, 9–15.

Bishop, M.J., and Hooper, P.J. (2005). Flow, stocking density and treatment against Polydora spp.: Influences on nursery growth and mortality of the oysters Crassostrea virginica and C. ariakensis. Aquaculture *246*, 251–261.

Black, B.E., and Bassett, E.A. (2008). The histone variant CENP-A and centromere specification. Curr Opin Cell Biol *20*, 91–100.

Blanc, J.M., Maunas, P., and Vallee, F. (2005). Effect of triploidy on paternal and maternal variance components in brown trout, Salmo trutta L. Aquac Research *36*, 1026–1033.

Boettcher, B., and Barral, Y. (2013). The cell biology of open and closed mitosis. Nucleus *4*, 160–165.

Bornens, M. (2003). Mitose : entrée, sortie et issues de secours. Med Sci (Paris) *19*, 259–261.

Boudry, P., Heurtebise, S., and Lapègue, S. (2003). Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed Crassostrea gigas and Crassostrea angulata specimens: a new oyster species in Hong Kong? Aquaculture *228*, 15–25.

Boudry, P., Degremont, L., Taris, N., McCombie, H., Haffray, P., and Ernande, B. (2004). Genetic variability and selective breeding for traits of aquacultural interest in the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Bulletin of the Aquaculture Association of Canada *104*, 12–18.

Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Boudry, P., and Lapègue, S. (2005). Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. Genome *48*, 177–180.

Brake, J., Davidson, J., and Davis, J. (2004). Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid Mytilus edulis. Aquaculture.

Brodeur, J., and Toussaint, M. (2006). Biologie moléculaire | Le monde en images.

Broquard, C., Martinez, A.-S., Maurouard, E., Lamy, J.-B., and Dégremont, L. (2020). Sex determination in the oyster Crassostrea gigas - A large longitudinal study of population sex ratios and individual sex changes. Aquaculture *515*, 734555.

Brown, J.R., and Hartwick, E.B. (1988). Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: I. Absolute and allometric growth. Aquaculture *70*, 231–251.

Brunet, S., Maria, A.S., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J.Z., and Maro, B. (1999). Kinetochore Fibers Are Not Involved in the Formation of the First Meiotic Spindle in Mouse Oocytes, but Control the Exit from the First Meiotic M Phase. J Cell Biol *146*, 1–12.

Callan, H.G., and Jacobs, P.A. (1957). The meiotic process inmantis religiosa L. males. J Genet *55*, 200.

Cardoso, J.F.M.F., Langlet, D., Loff, J.F., Martins, A.R., Witte, J.IJ., Santos, P.T., and van der Veer, H.W. (2007). Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) along the west European coast. Journal of Sea Research *57*, 303–315.

Carr, A.M., Moudjout, M., and Bentley, N.J. (1995). The chkl pathway is required to prevent mitosis following cell-cycle arrest at “start.” 12.

Cavelier, P., Cau, J., Morin, N., and Delsert, C. (2017). Early gametogenesis in the Pacific oyster: new insights using stem cell and mitotic markers. J. Exp. Biol. *220*, 3988–3996.

Chao, L.F.-I., Singh, M., Thompson, J., Iii, J.R.Y., and Hagstrom, K.A. (2017). An SMC-like protein binds and regulates Caenorhabditis elegans condensins. PLOS Genetics *13*, e1006614.

Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.-C., and Le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster Crassostrea gigas: origin and temperature effect. Aquaculture *214*, 115–130.

Cheeseman, I.M. (2014). The Kinetochore. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*.

Chen, C., Hou, J., Tanner, J.J., and Cheng, J. (2020). Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. Int J Mol Sci *21*.

Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J.Y.-J., and Chien, S. (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. Annu Rev Biomed Eng *19*, 195–219.

Chen, Z.J., Ha, M., and Soltis, D. (2007). Polyploidy: genome obesity and its consequences. New Phytologist *174*, 717–720.

Chuang, J.C., and Jones, P.A. (2007). Epigenetics and microRNAs. Pediatr Res *61*, 24R-29R.

Clift, D., and Marston, A.L. (2011). The Role of Shugoshin in Meiotic Chromosome Segregation. CGR *133*, 234–242.

Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature Reviews Genetics *6*, 836–846.

Comps, M., and Bonami, J.R. (1977). [Viral infection associated with mortality in the oyster Crassostrea gigas Thunberg]. C R Acad Hebd Seances Acad Sci D *285*, 1139–1140.

Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., and Mathieu, M. (2005). Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster Crassostrea gigas in Normandy (France). Helgoland Marine Research *59*, 286.

Crane, C.F., and Sleper, D.A. (2011). A model of meiotic chromosome association in tetraploids. Genome.

Degremont, L., Bedier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F., and Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). Aquaculture *249*, 213–229.

Dégremont, L., Bédier, E., and Boudry, P. (2010). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture *299*, 21–29.

Dégremont, L., Garcia, C., and Allen, S.K. (2015). Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. Journal of Invertebrate Pathology *131*, 226–241.

DeLuca, J.G. (2007). Spindle Microtubules: Getting Attached at Both Ends. Current Biology *17*, R966–R969.

Deslous-Paoli, J.-M., and Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat. Living Resour. *1*, 239–249.

Devauchelle, N., Boussaid, B., Le Pennec, G., Philip De Laborie, L., Salaun, G., and Dorange, G. (1998). Organization of the genital tract of the japanese oyster, Crassostrea gigas. p.

Dey, B.K., Mueller, A.C., and Dutta, A. (2014). Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. Transcription *5*, e944014.

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., and Favrel, P. (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster Crassostrea gigas: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. PLoS One *7*, e36353.

Dheilly, N.M., Jouaux, A., Boudry, P., Favrel, P., and Lelong, C. (2014). Transcriptomic Profiling of Gametogenesis in Triploid Pacific Oysters Crassostrea gigas: Towards an Understanding of Partial Sterility Associated with Triploidy. PLoS ONE *9*, e112094.

Diagouraga, B., Clément, J.A.J., Duret, L., Kadlec, J., de Massy, B., and Baudat, F. (2018). PRDM9 Methyltransferase Activity Is Essential for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation at Its Binding Sites. Molecular Cell *69*, 853-865.e6.

Domon, B. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. Science *312*, 212–217.

Domon, B., and Aebersold, R. (2010). Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy [AU: OK?]. Perspecti v e *28*, 13.

Dong, Z., Chen, Y., Ge, H., Li, X., Wu, H., Wang, C., Hu, Z., Wu, Y., Fu, G., Lu, J., et al. (2018). Response of growth and development of the Pacific oyster (Crassostrea gigas) to thermal discharge from a nuclear power plant. BMC Ecol *18*, 31.

Ducrotoy, J.-P., Elliott, M., and de Jonge, V.N. (2000). The North Sea. Marine Pollution Bulletin *41*, 5–23.

Dumont, J., and Desai, A. (2012). Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. Trends Cell Biol *22*, 241–249.

Dumont, S., and Mitchison, T.J. (2009). Force and Length in the Mitotic Spindle. Current Biology *19*, R749–R761.

Durand, P. (1997). Les mécanismes de contrôle de la méiose dans la lignée germinale mâle. Androl. *7*, 52–65.

Dutertre, M., Beninger, P.G., Barille, L., Papin, M., Rosa, P., Barille, A.-L., and Haure, J. (2009). Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, Crassostrea gigas, in Bourgneuf Bay, France. Aquatic Living Resources *22*, 319–329.

Dutertre, M., Beninger, P.G., Barillé, L., Papin, M., and Haure, J. (2010). Rising water temperatures, reproduction and recruitment of an invasive oyster, Crassostrea gigas, on the French Atlantic coast. Marine Environmental Research *69*, 1–9.

Dutta, B., Ren, Y., Hao, P., Sim, K.H., Cheow, E., Adav, S., Tam, J.P., and Sze, S.K. (2014). Profiling of the Chromatin-associated Proteome Identifies HP1BP3 as a Novel Regulator of Cell Cycle Progression*. Molecular & Cellular Proteomics *13*, 2183–2197.

Eberhart, A., Feodorova, Y., Song, C., Wanner, G., Kiseleva, E., Furukawa, T., Kimura, H., Schotta, G., Leonhardt, H., Joffe, B., et al. (2013). Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina. Chromosome Res *21*, 535–554.

Enriquez-Diaz, M.R. (2004). Variabilite et bioenergetique de la reproduction chez l'huître creuse Crassostrea gigas. 216.

Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., and Haure, J. (2004). Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. I. Spatial variation in food abundance. Journal of Evolutionary Biology *17*, 342–356.

Eudeline, Allen, and Guo (2000). Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas, in relation to tetraploid production. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. *248*, 151–161.

Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., and Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in Crassostrea gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun. *315*, 897–904.

Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., and Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive Crassostrea gigas reproductive internal clock. Aquaculture *250*, 458–470.

Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., and Zanuy, S. (2001). Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, Dicentrarchus labrax L. Journal of Experimental Zoology *290*, 384–395.

Fellous, A., Favrel, P., Guo, X., and Riviere, G. (2014). The Jumonji gene family in Crassostrea gigas suggests evolutionary conservation of Jmj-C histone demethylases orthologues in the oyster gametogenesis and development. Gene *538*, 164–175.

Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., et al. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 8689–8694.

Fischer, R., and Kessler, B.M. (2015). Gel-aided sample preparation (GASP)—A simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. Proteomics *15*, 1224–1229.

Flores, K.B., Wolschin, F., and Amdam, G.V. (2013). The Role of Methylation of DNA in Environmental Adaptation. Integr Comp Biol *53*, 359–372.

Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A.N., and Arredondo-Vega, B.O. (2004). Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg) spat. Aquaculture Research *35*, 1131–1140.

Foret, S., Kucharski, R., Pellegrini, M., Feng, S., Jacobsen, S.E., Robinson, G.E., and Maleszka, R. (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. PNAS *109*, 4968–4973.

Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaine, P., and Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Mollusca, Bivalvia). Tissue and Cell *40*, 251–260.

Franco, A.A., Lam, W.M., Burgers, P.M., and Kaufman, P.D. (2005). Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C. Genes Dev *19*, 1365–1375.

Fu, C., Yan, F., Wu, F., Wu, Q., Whittaker, J., Hu, H., Hu, R., and Yao, X. (2007). Mitotic phosphorylation of PRC1 at Thr470 is required for PRC1 oligomerization and proper central spindle organization. Cell Research *17*, 449–457.

Gabe, M. (1968). Techniques histologiques: par M. Gabe, ... (Paris: Masson et Cie).

Gaffney, P.M. (1990). Enzyme Heterozygosity, Growth Rate, and Viability in Mytilus Edulis: Another Look. Evolution *44*, 204–210.

Galas, S., Descamps, S., and Martinez, A.-M. (2008). Le cycle cellulaire (De Boeck Supérieur).

Gangnery, A., Normand, J., Duval, C., Cugier, P., Grangeré, K., Petton, B., Petton, S., Orvain, F., and Pernet, F. (2019). Connectivities with shellfish farms and channel rivers are associated with mortality risk in oysters. Aquaculture Environment Interactions *11*, 493–506.

Gardner, C., Maguire, G.B., and Kent, G.N. (1996). Studies on triploid oysters in Australia. VII. Assessment of two methods for determining triploidy in oysters: adductor muscle diameter and nuclear size. Journal of Shellfish Research *15*, 609–615.

Gardner, K.E., Allis, C.D., and Strahl, B.D. (2011). Operating on chromatin, a colorful language where context matters. J Mol Biol *409*, 36–46.

Garnier-Géré, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., and Gérard, A. (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster Crassostrea gigas reared in contrasting natural environments. Molecular Ecology *11*, 1499–1514.

Gavery, M.R., and Roberts, S.B. (2010). DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (Crassostrea gigas). BMC Genomics *11*, 483.

Gavery, M.R., and Roberts, S.B. (2013). Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. PeerJ *1*, e215.

Gavery, M.R., and Roberts, S.B. (2014). A context dependent role for DNA methylation in bivalves. Brief Funct Genomics *13*, 217–222.

Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S.H. (2004). Open Mass Spectrometry Search Algorithm. J. Proteome Res. *3*, 958–964.

Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., and Naciri-Graven, Y. (1999). The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster Crassostrea gigas with 6-DMAP or CB. Aquaculture *174*, 229–242.

Giribet, G. (2008). Assembling the lophotrochozoan (=spiralian) tree of life. Phil. Trans. R. Soc. B *363*, 1513–1522.

Gomes, C., Silva, F.C., Lopes, G.R., Melo, C.M.R., Gomes, C., Silva, F.C., Lopes, G.R., and Melo, C.M.R. (2014). The reproductive cycle of the oyster Crassostrea gasar. Brazilian Journal of Biology *74*, 967–976.

Gong, N., Yang, H., Zhang, G., Landau, B.J., and Guo, X. (2004). Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster Crassostrea gigas Thunberg. Heredity *93*, 408–415.

Gordon, F.K.E., and Lamb, D.J. (2007). DNA Repair Genes and Genomic Instability in Severe Male Factor Infertility. In The Genetics of Male Infertility, D.T. Carrell, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 145–163.

Goto, M., and Eddy, E.M. (2004). Speriolin is a novel spermatogenic cell-specific centrosomal protein associated with the seventh WD motif of Cdc20. J Biol Chem *279*, 42128–42138.

Goulletquer, P., and Heral, M. (1996). Etude des potentialités conchylicoles du Pertuis Breton. Proposition d'étude. Suite aux réunions de la commission de contrôle des filières du 6 juin 1995 et du 10 avril 1996.

Grangeré, K., Ménesguen, A., Lefebvre, S., Bacher, C., and Pouvreau, S. (2009). Modelling the influence of environmental factors on the physiological status of the Pacific oyster Crassostrea gigas in an estuarine embayment; The Baie des Veys (France). Journal of Sea Research *62*, 147–158.

Grangeré, K., Lefebvre, S., Bacher, C., Cugier, P., and Ménesguen, A. (2010). Modelling the spatial heterogeneity of ecological processes in an intertidal estuarine bay: dynamic interactions between bivalves and phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. *415*, 141–158.

Gregory, T.R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol Rev Camb Philos Soc *76*, 65–101.

Grizel, H., and Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (Crassostrea gigas). ICES Journal of Marine Science *47*, 399–403.

Grizzle, R.E., Ward, K.M., Peter, C.R., Cantwell, M., Katz, D., and Sullivan, J. (2017). Growth, morphometrics, and nutrient content of farmed eastern oysters, Crassostrea virginica (Gmelin), in New Hampshire, USA. Aquac Res *48*, 1525–1537.

Grote, P., and Herrmann, B.G. (2013). The long non-coding RNA Fendrr links epigenetic control mechanisms to gene regulatory networks in mammalian embryogenesis. RNA Biology *10*, 1579–1585.

Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W.K., and Chew, K.K. (1992a). Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: I. Ploidy of resultant embryos. The Biological Bulletin *183*, 381–386.

Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., and Chew, K.K. (1992b). Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: II. Segregation of chromosomes. The Biological Bulletin *183*, 387–393.

Guo, X., and Allen, S.K. (1994). Reproductive Potential and Genetics of Triploid Pacific Oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). Biol Bull *187*, 309–318.

Guo, X., and K Allen, S. (1994). Viable tetraploid Pacific oyster (Crassostrea gigas Thunburg) produced by inhibiting polar body I in eggs of triploids. Molecular Marine Biology and Biotechnology *3*, 42–50.

Guo, X., DeBrosse, G.A., and Allen, S.K. (1996). All-triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture *142*, 149–161.

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., and Allen, S.K. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, Crassostrea gigas Thunberg. Evolution *52*, 394–402.

Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M., and Ward, D.C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. PNAS *92*, 2298–2302.

Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. Nat Rev Genet *11*, 124–136.

Happel, N., and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. 12.

Hara, M., and Fukagawa, T. (2020). Dynamics of kinetochore structure and its regulations during mitotic progression. Cell. Mol. Life Sci.

Harashima, H., Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. Trends Cell Biol *23*, 345–356.

Harvey, A.C., Fjelldal, P.G., Solberg, M.F., Hansen, T., and Glover, K.A. (2017). Ploidy elicits a whole-genome dosage effect: growth of triploid Atlantic salmon is linked to the genetic origin of the second maternal chromosome set. BMC Genet *18*, 34.

Hauf, S., and Watanabe, Y. (2004). Kinetochore Orientation in Mitosis and Meiosis. Cell *119*, 317–327.

Haure, J., Fortin, A., Dupuy, B., Nourry, M., Palvadeau, H., Papin, M., Penisson, C., and Martin, J.-L. (2003). Etude comparative des caractéristiques écophysiologiques et des performances de croissance de l'huître creuse Crassostrea gigas diploïde et triploïde en milieu contrôlé.

Hawkins, A.J.S., Day, A.J., Gérard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Bayne, B.L., and Héral, M. (1994). A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, Ostrea edulis L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *184*, 21–40.

Hawkins, A.J.S., Magoulas, A., Heral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A.J., and Kotoulas, G. (2000). Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster Crassostrea gigas. Genetics Research *76*, 273–284.

Helmke, K.J., Heald, R., and Wilbur, J.D. (2013). Interplay between spindle architecture and function. Int Rev Cell Mol Biol *306*, 83–125.

Herman, J.J., and Sultan, S.E. (2016). DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences *283*, 20160988.

Heyer, W.-D. (1994). The search for the right partner: Homologous pairing and DNA strand exchange proteins in eukaryotes. Experientia *50*, 223–233.

Higgs, R.E., Butler, J.P., Han, B., and Knierman, M.D. (2013). Quantitative Proteomics via High Resolution MS Quantification: Capabilities and Limitations. International Journal of Proteomics *2013*, e674282.

His, E. (1976). Contribution à l'étude biologique de l'Huître dans le Bassin d'Arcachon, activité valvaire de Crassostrea angulata et de Crassostrea gigas; application à l'étude de la reproduction de l'Huître Japonaise. Université de Bordeaux 1.

Houssin, M., Trancart, S., Denechere, L., Oden, E., Adeline, B., Lepoitevin, M., and Pitel, P.-H. (2019). Abnormal mortality of triploid adult Pacific oysters: Is there a correlation with high gametogenesis in Normandy, France? Aquaculture *505*, 63–71.

Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. Cell *66*, 507–517.

Huiping Yang, N.S. (2018). Production and Performance of Triploid Oysters for Aquaculture (Fisheries and Aquatic Sciences).

Hulata, G. (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. Genetica *111*, 155–173.

Hyun, K.-H., Pang, I.-C., Klinck, J.M., Choi, K.-S., Lee, J.-B., Powell, E.N., Hofmann, E.E., and Bochenek, E.A. (2001). The effect of food composition on Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg) growth in Korea: a modeling study. Aquaculture *199*, 41–62.

Ibarra, A.M., Ascencio-Michel, R., Ramírez, J.L., Manzano-Sarabia, M., and Rodríguez-Jaramillo, C. (2017). Performance of Diploid and Triploid Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) Grown in Tropical Versus Temperate Natural Environmental Conditions. Shre *36*, 119–139.

Jiang, W. (1991). Comparison of growth between triploid and diploid of Pinctada martensii (D). Tropic.Oceanol. *10*, 1–7.

Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., and Fukunaga, R. (1998). PRC1: A Human Mitotic Spindle–Associated CDK Substrate Protein Required for Cytokinesis. Molecular Cell *2*, 877–885.

Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Cho, G.K., and Heath, D.D. (2007). Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Heredity (Edinb) *98*, 303–310.

Jones, K.T. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. Mol Hum Reprod *10*, 1–5.

Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., and Kellner, K. (2010). Gametogenic stages in triploid oysters Crassostrea gigas: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *395*, 162–170.

Jouaux, A., Blin, J.L., Adeline, B., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., and Kellner, K. (2013). Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters Crassostrea gigas — Involvement of insulin signaling. Aquaculture *388–391*, 173–181.

Kang, C.-K., Park, M., Lee, P.-Y., Choi, W.-J., and Lee, W.-C. (2000). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. Journal of Shellfish Research *19*, 771–778.

Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature *428*, 617–624.

Keppel, G., Gillespie, T.W., Ormerod, P., and Fricker, G.A. (2016). Habitat diversity predicts orchid diversity in the tropical south-west Pacific. Journal of Biogeography *43*, 2332–2342.

Keung, A.J., Joung, J.K., Khalil, A.S., and Collins, J.J. (2015). Chromatin regulation at the frontier of synthetic biology. Nat Rev Genet *16*, 159–171.

Khan, A.M., Rajpoot, N., Treanor, D., and Magee, D. (2014). A nonlinear mapping approach to stain normalization in digital histopathology images using image-specific color deconvolution. IEEE Trans Biomed Eng *61*, 1729–1738.

Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. Journal of Biology *8*, 88.

Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., and Rieder, C.L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. Curr Biol *10*, 59–67.

King, J.W., Malham, S.K., Skov, M.W., Cotter, E., Latchford, J.W., Culloty, S.C., and Beaumont, A.R. (2006). Growth of Crassostrea gigas spat and juveniles under differing environmental conditions at two sites in Wales. Aquat. Living Resour. *19*, 289–297.

Kipreos, E.T., and van den Heuvel, S. (2019). Developmental Control of the Cell Cycle: Insights from Caenorhabditis elegans. Genetics *211*, 797–829.

Kitajima, T.S. (2018). Mechanisms of kinetochore-microtubule attachment errors in mammalian oocytes. Development, Growth & Differentiation *60*, 33–43.

Kitamura, E., Tanaka, K., Komoto, S., Kitamura, Y., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2010). Kinetochores Generate Microtubules with Distal Plus Ends: Their Roles and Limited Lifetime in Mitosis. Developmental Cell *18*, 248–259.

Kiyomoto, M., Komaru, A., Scarpa, J., Wada, K.T., Danton, E., and Awaji, M. (1996). Abnormal Gametogenesis, Male Dominant Sex Ratio, and Sertoli Cell Morphology in Induced Triploid Mussels, Mytilus galloprowincialis. Jzoo *13*, 393–402.

Knossow, M., Campanacci, V., Khodja, L.A., and Gigant, B. (2020). The Mechanism of Tubulin Assembly into Microtubules: Insights from Structural Studies. IScience *23*, 101511.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., and Roberts, J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science *257*, 1689–1694.

Kooijman, S.A.L.M. (2000). Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems (Cambridge University Press).

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. Science *184*, 868–871.

Kornbluth, S., and Fissore, R. (2015). Vertebrate Reproduction. Cold Spring Harb Perspect Biol *7*.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. Cell *128*, 693–705.

Ku, H.-Y., and Lin, H. (2014). PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. Natl Sci Rev *1*, 205–218.

Kuroki, S., Maeda, R., Yano, M., Kitano, S., Miyachi, H., Fukuda, M., Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2020). H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline. Stem Cell Reports *15*, 424–438.

Kuznetsov, S., Pellegrini, M., Shuda, K., Fernandez-Capetillo, O., Liu, Y., Martin, B.K., Burkett, S., Southon, E., Pati, D., Tessarollo, L., et al. (2007). RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. J Cell Biol *176*, 581–592.

Langdon, C.J., and Waldock, M.J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of Crassostrea gigas Spat. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom *61*, 431–448.

Lasko, P. (2013). The DEAD-box helicase Vasa: Evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms *1829*, 810–816.

Lazure, P., and Dumas, F. (2008). An external–internal mode coupling for a 3D hydrodynamical model for applications at regional scale (MARS). Advances in Water Resources *31*, 233–250.

Le Peuch, C., and Dorée, M. (2000). Le temps du cycle cellulaire. Med Sci (Paris) *16*, 461.

Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 284–295.

Leitão, A., Thiriot-Quiévreux, C., Boudry, P., and Malheiro, I. (1999). A'G'chromosome banding study of three cupped oyster species: Crassostrea gigas, Crassostrea angulata and Crassostrea virginica (Mollusca: Bivalvia). Genetics Selection Evolution *31*, 519.

Leitão, A., Boudry, P., and Thiriot-Quiévreux, C. (2001a). Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, Crassostrea gigas: Ten years of evidence. Aquaculture *193*, 39–48.

Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A., and Thiriot-Quiévreux, C. (2001b). Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Aquatic Living Resources *14*, 233–237.

Leitão, A., Boudry, P., and Thiriot-Quiévreux, C. (2001c). Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Genome *44*, 735–737.

Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell *66*, 519–531.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. Cell *128*, 707–719.

Li, F., Xiang, J., Zhang, X., Zhou, L., Zhang, C., and Wu, C. (2003). Gonad Development Characteristics and Sex Ratio in Triploid Chinese Shrimp (Fenneropenaeus chinensis). Mar. Biotechnol. *5*, 528–535.

Li, Y.-J., Zhang, M.-Z., Qian, C., Gao, M., and Arai, K. (2012). Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, Misgurnus anguillicaudatus, in China. Journal of Applied Ichthyology *28*, 900–905.

Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Abreu-Goodger, C., Huvet, A., and Ibarra, A.M. (2013). Identification of Male Gametogenesis Expressed Genes from the Scallop Nodipecten subnodosus by Suppressive Subtraction Hybridization and Pyrosequencing. PLOS ONE *8*, e73176.

Losee, E. (1979). Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (Crassostrea virginica). Aquaculture *16*, 123–126.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature *389*, 251–260.

Lundin, C., Schultz, N., Arnaudeau, C., Mohindra, A., Hansen, L.T., and Helleday, T. (2003). RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells. Journal of Molecular Biology *328*, 521–535.

Lyndaker, A.M., Lim, P.X., Mleczko, J.M., Diggins, C.E., Holloway, J.K., Holmes, R.J., Kan, R., Schlafer, D.H., Freire, R., Cohen, P.E., et al. (2013). Conditional Inactivation of the DNA Damage Response Gene Hus1 in Mouse Testis Reveals Separable Roles for Components of the RAD9-RAD1-HUS1 Complex in Meiotic Chromosome Maintenance. PLOS Genetics *9*, e1003320.

Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., and Lajoie, G. (2003). PEAKS: Powerful Software for Peptide De Novo Sequencing by MS/MS.

Mable, B.K., Alexandrou, M.A., and Taylor, M.I. (2011). Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. Journal of Zoology *284*, 151–182.

Magoulas, A., Kotoulas, G., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Dermitzakis, E., and Hawkins, A.J.S. (2000). Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster Crassostrea gigas. Genetics Research *76*, 261–272.

Mahamadou, K.B., Issa, O., Charles, B., J.m, A.K., and Bernard, T. (2017). Caractérisation morphologique des cuvettes oasiennes du Centre-Est du Niger. Physio-Géo : Géographie Physique et Environnement 255.

Maldonado-Amparo, R., Ramírez, J.L., Ávila, S., and Ibarra, A.M. (2004). Triploid lion-paw scallop (Nodipecten subnodosus Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. Aquaculture *235*, 185–205.

Mallia, J.V., Muthiah, P., and Thomas, P.C. (2006). Growth of triploid oyster, Crassostrea madrasensis (Preston). Aquaculture Research *37*, 718–724.

Maquaire, O., Roche, A., Kergadallan, X., Cador, J.-M., Cantat, O., Delahaye, D., Laignel, B., Graff, K., Beauvais, F., and Donato, V. (2019). Facteurs hydrodynamiques (Édition Cerema).

Margueron, R., and Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. Nature Reviews Genetics *11*, 285–296.

Marks, G.E. (1966). The enigma of triploid potatoes. Euphytica *15*, 285–290.

Marston, A.L., and Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. Nature Reviews Molecular Cell Biology *5*, 983–997.

Matellán, L., and Monje-Casas, F. (2020). Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons from Saccharomyces cerevisiae. Genes *11*, 195.

Mattick, J.S., and Makunin, I.V. (2006). Non-coding RNA. Hum Mol Genet *15 Spec No 1*, R17-29.

McCombie, H., Ledu, C., Phelipot, P., Lapègue, S., Boudry, P., and Gérard, A. (2005). A Complementary Method for Production of Tetraploid Crassostrea gigas Using Crosses Between Diploids and Tetraploids with Cytochalasin B Treatments. Marine Biotechnology *7*, 318–330.

McCuistion, F. (University of F., and Elmstrom, G.W. (1994). Identifying polyploids of various cucurbits by stomatal guard cell chloroplast number. Florida State Horticultural Society. Meeting (USA).

McGuinness, B.E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A.M., Helmhart, W., Kudo, N.R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., et al. (2009). Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. Curr Biol *19*, 369–380.

McIntosh, J.R. (2016). Mitosis. Cold Spring Harb Perspect Biol *8*.

Meier, F., Brunner, A.-D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., Krause, M., Goedecke, N., Decker, J., Kosinski, T., Park, M.A., et al. (2018). Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. Mol Cell Proteomics *17*, 2534–2545.

Meijer, L. (2006). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Bulletin Du Cancer *93*, 41–53.

Melchior, M., and Poisbeau, P. (2015). Conséquences des perturbations périnatales sur les réponses douloureuses. Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement *16*, 77–85.

Mello, J.A., Silljé, H.H.W., Roche, D.M.J., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. EMBO Rep *3*, 329–334.

Melo, E.M.C., Sühnel, S., Oliveira, A.C.S. de, Lopes, B. de O., Bachi, G.C., and Melo, C.M.R.D. (2020). Growth, mortality and reproductive traits of diploid and triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas, THUNBERG, 1793) in Southern Brazil. Aquaculture Research *n/a*.

Ménesguen, A., Dussauze, M., Dumas, F., Thouvenin, B., Garnier, V., Lecornu, F., and Répécaud, M. (2019). Ecological model of the Bay of Biscay and English Channel shelf for environmental status assessment part 1: Nutrients, phytoplankton and oxygen. Ocean Modelling *133*, 56–78.

Menet, M.-C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. Revue Francophone des Laboratoires *2011*, 41–53.

Mocciaro, A., and Rape, M. (2012). Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. J Cell Sci *125*, 255–263.

Morita, T., Yoshimura, Y., Yamamoto, A., Murata, K., Mori, M., Yamamoto, H., and Matsushiro, A. (1993). A mouse homolog of the Escherichia coli recA and Saccharomyces cerevisiae RAD51 genes. PNAS *90*, 6577–6580.

Mukherjee, S., Ridgeway, A., and Lamb, D.J. (2010). DNA MISMATCH REPAIR AND INFERTILITY. Curr Opin Urol *20*, 525–532.

Muranaka, M.S., and Lannan, J.E. (1984). Broodstock management of Crassostrea gigas: Environmental influences on broodstock conditioning. Aquaculture *39*, 217–228.

Murillo-Pineda, M., Cabello-Lobato, M.J., Clemente-Ruiz, M., Monje-Casas, F., and Prado, F. (2014). Defective histone supply causes condensin-dependent chromatin alterations, SAC activation and chromosome decatenation impairment. Nucleic Acids Research *42*, 12469–12482.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 379–393.

Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. Curr Biol *25*, R1002-1018.

Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., and Sourdaine, P. (2009a). Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster Crassostrea gigas. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology *152*, 189–196.

Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Diss, B., Mathieu, M., and Sourdaine, P. (2009b). Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster Crassostrea gigas. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology *154*, 134–142.

Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the Cell Cycle at the G1–S Transition by Proteolysis of Cyclin E and p27Kip1. Biochemical and Biophysical Research Communications *282*, 853–860.

Neiman, M., Beaton, M.J., Hessen, D.O., Jeyasingh, P.D., and Weider, L.J. (2017). Endopolyploidy as a potential driver of animal ecology and evolution. Biological Reviews *92*, 234–247.

Nell, J.A. (2002). Farming triploid oysters. Aquaculture *210*, 69–88.

Nesvizhskii, A.I. (2010). A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. J Proteomics *73*, 2092–2123.

Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. Cell Mol Life Sci *66*, 407–422.

Niault, T., Hached, K., Sotillo, R., Sorger, P.K., Maro, B., Benezra, R., and Wassmann, K. (2007). Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I. PLoS One *2*, e1165.

Nicoglou, A., and Merlin, F. (2017). Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci *66*, 73–82.

Nisbet, R.M., Jusup, M., Klanjscek, T., and Pecquerie, L. (2012). Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models. Journal of Experimental Biology *215*, 892–902.

Noonan, E.J., Place, R.F., Pookot, D., Basak, S., Whitson, J.M., Hirata, H., Giardina, C., and Dahiya, R. (2009). miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. Oncogene *28*, 1714–1724.

Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem *61*, 441–470.

Normand, J., Le Pennec, M., and Boudry, P. (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquaculture *282*, 124–129.

Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., and Boudry, P. (2009). Reproductive effort and growth in Crassostrea gigas: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquatic Biology *7*, 229–241.

Nowak, R. (1994). Mining treasures from "junk DNA." Science *263*, 608–610.

Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. Trends Genet *20*, 214–220.

Oki, M., Aihara, H., and Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. Subcell Biochem *41*, 319–336.

Oliveira, R.A., Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. Nat Cell Biol *12*, 185–192.

Olson, C.E., and Roberts, S.B. (2014). Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in Crassostrea gigas male gametes. Front Physiol *5*, 224.

Orr, H.A. (1990). "Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants" Revisited. The American Naturalist *136*, 759–770.

Otto, and J, W. (2000). Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet *34*, 401–437.

Otto, S.P. (2007). The Evolutionary Consequences of Polyploidy. Cell *131*, 452–462.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J *11*, 961–971.

Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J.H., and Karnitz, L. (2004). Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. DNA Repair *3*, 1009–1014.

Passy, P., Gendre, R.L., Garnier, J., Cugier, P., Callens, J., Paris, F., Billen, G., Riou, P., and Romero, E. (2016). Eutrophication modelling chain for improved management strategies to prevent algal blooms in the Bay of Seine. Marine Ecology Progress Series *543*, 107–125.

Paterson, A.H. (2005). Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. Genetica *123*, 191–196.

Pawlowski, W., and Cande, W. (2006). Coordinating the events of the meiotic prophase. Trends in Cell Biology *15*, 674–681.

Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., and Tran, D. (2017). How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, Crassostrea gigas. PloS One *12*, e0185918.

Pernet-Coudrier, B. (2008). Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. Thesis. Université Paris-Est.

Pesenti, M.E., Weir, J.R., and Musacchio, A. (2016). Progress in the structural and functional characterization of kinetochores. Current Opinion in Structural Biology *37*, 152–163.

Peters, J.-M. (2002). The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. Molecular Cell *9*, 931–943.

Petry, S., Groen, A.C., Ishihara, K., Mitchison, T.J., and Vale, R.D. (2013). Branching Microtubule Nucleation in Xenopus Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2. Cell *152*, 768–777.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., and Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture *293*, 125–156.

Plug, A.W., Xu, J., Reddy, G., Golub, E.I., and Ashley, T. (1996). Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 5920–5924.

Pogoda, B., Buck, B.H., and Hagen, W. (2011). Growth performance and condition of oysters (Crassostrea gigas and Ostrea edulis) farmed in an offshore environment (North Sea, Germany). Aquaculture *319*, 484–492.

Poleshko, A., Mansfield, K.M., Burlingame, C.C., Andrake, M.D., Shah, N.R., and Katz, R.A. (2013). The Human Protein PRR14 Tethers Heterochromatin to the Nuclear Lamina During Interphase and Mitotic Exit. Cell Rep *5*.

Potapova, T., and Gorbsky, G.J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. Biology (Basel) *6*.

Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., and Alunno-Bruscia, M. (2006). Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, Crassostrea gigas, reared under various environmental conditions. Journal of Sea Research 12.

Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? Journal of Cell Science *116*, 3677–3685.

Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. Nat Rev Mol Cell Biol *18*, 187–201.

Purdom, C.E. (1972). Induced polyploidy in plaice (Pleuronectes platessa) and its hybrid with the flounder (Platichthys flesus). Heredity *29*, 11–24.

Ragone Calvo, L., and Burreson, E. (2000). Status of the Major Oyster Diseases in Virginia 1999 A Summary of the Annual Monitoring Program. Reports.

Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. Nat Genet *38 Suppl*, S8-13.

Ramsey, J., and Schemske, D. (1998). Ramsey J, Schemske DW. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Ann Rev Ecol Syst 29: 467-501. Annual Review of Ecology and Systematics *29*, 467–501.

Rando, O.J., and Chang, H.Y. (2009). Genome-wide views of chromatin structure. Annu Rev Biochem *78*, 245–271.

Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., Antony, C., Sachidanandam, R., and Pillai, R.S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. Nature *480*, 264–267.

Riddle, N.C., Kato, A., and Birchler, J.A. (2006). Genetic variation for the response to ploidy change in Zea mays L. Theor Appl Genet *114*, 101–111.

Riviere, G., Wu, G.-C., Fellous, A., Goux, D., Sourdaine, P., and Favrel, P. (2013). DNA methylation is crucial for the early development in the Oyster C. gigas. Mar. Biotechnol. *15*, 739–753.

Rivière, G. (2014). Epigenetic features in the oyster Crassostrea gigas suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. Front Physiol *5*, 129.

Roberts, S.B., and Gavery, M.R. (2012). Is There a Relationship between DNA Methylation and Phenotypic Plasticity in Invertebrates? Front. Physiol. *2*.

Royer, J., Ropert, M., and Costil, K. (2007). Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the pacific oyster, Crassostrea gigas, in Normandy (France). Journal of Shellfish Research *26*, 973–984.

Royer, J., Seguineau, C., Park, K.-I., Pouvreau, S., Choi, K.-S., and Costil, K. (2008). Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, Crassostrea gigas, reared in Normandy. Aquaculture *277*, 313–320.

Rui, X., Qi, L., and Hong, Y. (2020). Expression pattern of Piwi-like gene implies the potential role in germline development in the Pacific oyster Crossosrea gigas. Aquaculture Reports *18*, 100486.

Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M., and Sánchez, J.L. (1992). Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, Ostrea edulis, from San Cibran (Galicia, Spain). Marine Biology *112*, 67–74.

Ruiz-Verdugo, C.A., Ramírez, J.L., Allen, S.K., and Ibarra, A.M. (2000). Triploid catarina scallop (Argopecten ventricosus Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. Aquaculture *186*, 13–32.

Rybovich, M.M. (2014). Growth and mortality of spat, seed, and market-sized oysters (Crassostrea virginica) in low salinities and high temperatures. 71.

Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., et al. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. Aquaculture *268*, 227–243.

Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H.K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K., and Nakayama, T. (2006). Asf1 Is Required for Viability and Chromatin Assembly during DNA Replication in Vertebrate Cells *. Journal of Biological Chemistry *281*, 13817–13827.

Sarà, G., and Mazzola, A. (1997). Effects of trophic and environmental conditions on the growth of Crassostrea gigas in culture. Aquaculture *153*, 81–91.

Saxena, A., and Carninci, P. (2011). Long non-coding RNA modifies chromatin. BioEssays *33*, 830–839.

Schulz, L.L., and Tyler, J.K. (2006). The histone chaperone ASF1 localizes to active DNA replication forks to mediate efficient DNA replication. The FASEB Journal *20*, 488–490.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res *13*, 2498–2504.

Sharp, J.A., Franco, A.A., Osley, M.A., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in S. cerevisiae. Genes Dev *16*, 85–100.

Sheridan, A.K. (1997). Genetic improvement of oyster production—a critique. Aquaculture *153*, 165–179.

Sherr, C.J. (1995). D-type cyclins. Trends Biochem Sci *20*, 187–190.

Shevelyov, Y.Y., and Ulianov, S.V. (2019). The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. Cells *8*.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell *119*, 941–953.

Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., and Ogawa, T. (1993). Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. Nature Genetics *4*, 239–243.

Shpigel, M., Barber, B.J., and Mann, R. (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas Thunberg. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *161*, 15–25.

Soletchnik, P. (2008). Département ODE Laboratoire Environnement-Ressources des Pertuis Charentais. 34.

Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., and Joffe, B. (2009). Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. Cell *137*, 356–368.

Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T.V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. Cell *152*, 584–598.

Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., and Koji, T. (2011). Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. Acta Histochemica Et Cytochemica *44*, 183–190.

Sousa, J.T., Allen, S., Wolfe, B.M., and Small, J.M. (2017). Mitotic instability in triploid and tetraploid one-year old Eastern oyster, Crassostrea virginica, assessed by cytogenetic and flow cytometry techniques. Genome.

Sreekumari, M.T., Jos, J.S., and Nair, S.G. (1999). 'Sree Harsha': A superior triploid hybrid in cassava. Euphytica *106*, 1–6.

Staiber, W. (2012). Germ line-limited and somatic chromosomes of Acricotopus lucidus differ in distribution and timing of alterations of histone modifications in male gonial mitosis and meiosis. Chromosome Res *20*, 717–734.

Stanley, J.G., Allen, S.K., and Hidu, H. (1981). Polyploidy induced in the American oyster, Crassostrea virginica, with cytochalasin B. Aquaculture *23*, 1–10.

Stanley, J.G., Hidu, H., and Allen, S.K. (1984). Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture *37*, 147–155.

Starega-Roslan, J., Krol, J., Koscianska, E., Kozlowski, P., Szlachcic, W.J., Sobczak, K., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Structural basis of microRNA length variety. Nucleic Acids Res *39*, 257–268.

Steele, S., and Mulcahy, M.F. (1999). Gametogenesis of the oyster Crassostrea gigas in southern Ireland. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom *79*, 673–686.

Stormo, B.M., and Fox, D.T. (2019). Interphase cohesin regulation ensures mitotic fidelity after genome reduplication. Mol. Biol. Cell *30*, 219–227.

Sun, S.-C., and Kim, N.-H. (2012). Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. Human Reproduction Update *18*, 60–72.

Suquet, M., Malo, F., Quere, C., Ledu, C., Le Grand, J., and Benabdelmouna, A. (2016). Gamete quality in triploid Pacific oyster (Crassostrea gigas). Aquaculture *451*, 11–15.

Suryadinata, R., Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. Biosci Rep *30*, 243–255.

Swarup, H. (1959). Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure inGasterosteus aculeatus (L). J Genet *56*, 143–155.

Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S. (2001). Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. Mol Cell Biol *21*, 2858–2866.

Takeuchi, K., and Fukagawa, T. (2012). Molecular architecture of vertebrate kinetochores. Experimental Cell Research *318*, 1367–1374.

Tamayo, D., Ibarrola, I., Urrutxurtu, I., and Navarro, E. (2014). Physiological basis of extreme growth rate differences in the spat of oyster (Crassostrea gigas). Mar Biol *161*, 1627–1637.

Teixeira, L.K., and Reed, S.I. (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. Annu Rev Biochem *82*, 387–414.

Thiriot-Quiévreux, C., and Insua, A. (1992). Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *157*, 33–40.

Thorne, M., Collins, R., and Sheldon, B. (1991). Triploidy and other chromosomal abnormalities in a selected line of chickens. Genetics Selection Evolution *23*, S212.

Thul, P.J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Blal, H.A., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L.M., et al. (2017). A subcellular map of the human proteome. Science *356*.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature *439*, 811–816.

Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. Nature *402*, 555–560.

Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiott, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the Drosophila CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. Mol Cell Biol *21*, 6574–6584.

Ubertini, M., Lefebvre, S., Gangnery, A., Grangeré, K., Gendre, R.L., and Orvain, F. (2012). Spatial Variability of Benthic-Pelagic Coupling in an Estuary Ecosystem: Consequences for Microphytobenthos Resuspension Phenomenon. PLOS ONE *7*, e44155.

Valenti, R.J. (1975). Induced polyploidy in Tilapia aurea (Steindachner) by means of temperature shock treatment. Journal of Fish Biology *7*, 519–528.

Van der Veer, H.W., Cardoso, J.F.M.F., and van der Meer, J. (2006). The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. Journal of Sea Research *56*, 107–124.

Vandenhout, H., Ortiz, R., Vuylsteke, D., Swennen, R., and Bai, K.V. (1995). Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. Euphytica *83*, 117–122.

Vialova, O.Y. (2020). Comparative morphological analysis of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, farmed in the Black Sea. Turk J Vet Anim Sci *44*, 740–746.

Villanueva Fonseca, B., Villanueva Fonseca, B.P., Gongora Gomez, A.M., Munoz Sevilla, N.P., Dominguez Orozco, A.L., Hernandez Sepulveda, J.A., Garcia Ulloa, M., and Ponce Palafox, J.T. (2017). Growth and economic performance of diploid and triploid Pacific oysters Crassostrea gigas cultivated in three lagoons of the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research *45*, 466–480.

Volland, M., Blasco, J., and Hampel, M. (2017). Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary Ruditapes philippinarum hemocytes. Aquatic Toxicology *185*, 86–94.

Wadsworth, P., Wilson, A.E., and Walton, W.C. (2019a). A meta-analysis of growth rate in diploid and triploid oysters. Aquaculture *499*, 9–16.

Wadsworth, P., Casas, S., La Peyre, J., and Walton, W. (2019b). Elevated mortalities of triploid eastern oysters cultured off-bottom in northern Gulf of Mexico. Aquaculture *505*, 363–373.

Walt, S. van der, Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., and Yu, T. (2014). scikit-image: image processing in Python. PeerJ *2*, e453.

Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Mol Cell *43*, 904–914.

Wang, T., Zhang, J., and Yu, R. (2018). Effects of salinity, stocking density, and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster Crassostrea nippona larvae. Aquaculture International *26*.

Wang, X., Li, Q., Lian, J., Li, L., Jin, L., Cai, H., Xu, F., Qi, H., Zhang, L., Wu, F., et al. (2014). Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster Crassostrea gigas provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. BMC Genomics *15*, 1119.

Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 370–382.

Watanabe, T., and Lin, H. (2014). Posttranscriptional Regulation of Gene Expression by Piwi Proteins and piRNAs. Molecular Cell *56*, 18–27.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. Cell *97*, 99–109.

Whittaker, S.R., Mallinger, A., Workman, P., and Clarke, P.A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. Pharmacol Ther *173*, 83–105.

Woodcock, C.L., and Ghosh, R.P. (2010). Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*.

Yamada, M., and Goshima, G. (2017). Mitotic Spindle Assembly in Land Plants: Molecules and Mechanisms. Biology (Basel) *6*.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. Oncogene *26*, 5310–5318.

Yokobayashi, S., and Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. Cell *123*, 803–817.

Yu, H. (2002). Regulation of APC–Cdc20 by the spindle checkpoint. Current Opinion in Cell Biology *14*, 706–714.

Yu, H., Zhao, X., and Li, Q. (2016). Genome-wide identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster. Scientific Reports *6*, 20796.

Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., and Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. J Integr Bioinform *16*.

Zhao, X., Yu, H., Kong, L., Liu, S., and Li, Q. (2016). High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two Crassostrea oysters identifies microRNAs involved in osmotic stress response. Scientific Reports *6*, 22687.

Zhu, Z., and Wang, X. (2018). Roles of cohesin in chromosome architecture and gene expression. Semin. Cell Dev. Biol.

Zhu, L., Wang, Z., Wang, W., Wang, C., Hua, S., Su, Z., Brako, L., Garcia-Barrio, M., Ye, M., Wei, X., et al. (2015). Mitotic Protein CSPP1 Interacts with CENP-H Protein to Coordinate Accurate Chromosome Oscillation in Mitosis*. Journal of Biological Chemistry *290*, 27053–27066.

Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Annu Rev Genet *33*, 603–754.

Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S., Guerrero, A., and Bettencourt-Dias, M. (2014). Polo-like kinases: Structural variations lead to multiple functions. Nature Reviews. Molecular Cell Biology *15*, 433–452.

Régulation de la gamétogenèse et de sa perturbation en lien avec la triploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Résumé

L'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, est un mollusque bivalve hermaphrodite irrégulier successif avec un cycle de reproduction annuel et saisonnier. Son cycle gamétogénétique est fortement influencé par les paramètres environnementaux. Comme la majorité des êtres vivants, les huîtres sont naturellement diploïdes (2n). Pour la conchyliculture, les huîtres triploïdes (3n) ont été développées afin d'obtenir des animaux stériles. Par conséquent, elles présentent une croissance supérieure en allouant leurs réserves d'énergie principalement à la croissance. Cependant, des études ont montré la capacité d'un groupe d'huîtres 3n (3nα) à réaliser une gamétogenèse proche des 2n avec de nombreuses gonies en prolifération et un second groupe sans ou avec un faible potentiel de reproduction (3nβ) présentant une accumulation anormale de cellules germinales bloquées avec des condensations nucléaires. Notre étude aspire à comprendre les régulations de la spermatogenèse dans les groupes α et β, lors de la mitose et de la méiose. Ainsi, nos résultats montrent que la spermatogenèse plus faible chez les huîtres 3n résulte tout d'abord d'une dérégulation de la lignée germinale et de la mise en place du tractus gonadique. L'analyse transcriptomique des acteurs du SAC (Spindle Assembly Complex) et une approche protéomique montrent l'implication du point de contrôle du fuseau pendant la mitose et la méiose et des régulations de la recombinaison homologue méiotique dans le succès de la spermatogenèse chez les 3nα et dans l'échec de celle des 3nβ. La spermatogenèse des 3nα peut également être liée à des régulations épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN impliquées dans le silençage génique. Pris ensemble, ces résultats fournissent des données importantes pour comprendre les régulations de la reproduction 3nα et β, surtout dans le contexte des changements globaux vis-à-vis des huîtres 2n naturelles.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, huître, triploïdie, reproduction, spermatogenèse, cycle cellulaire, mitose, méiose, environnement.

Gametogenesis regulation and its disturbance in relation to triploidy in cupped oysters, *Crassostrea gigas*

Abstract

The Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* is a successive irregular hermaphrodite bivalve mollusc with an annual and seasonal breeding cycle. Its gametogenetic cycle is strongly influenced by the environment parameters. Most of living species, oysters are naturally diploids (2n). For shellfish aquaculture, triploids oysters (3n) have been developed to obtain sterile animals. Therefore, they exhibit a higher growth by allocating these energy reserves for the growth. But, some studies have shown the ability of a group of 3n oysters (3nα) to carry out gametogenesis closed to 2n with numerous proliferating gonial cells and a second group without or with low reproduction potential (3nβ) showing an abnormal accumulation of locked germ cells with condensed nuclei. Our study aims to understand the regulations of spermatogenesis in both α and β groups, during mitosis and meiosis events. Thus, our results argue to the deregulation of the germinal lineage and the establishment of the gonadal tract to explain the lower spermatogenesis in 3n oysters. Transcriptomic analysis on the SAC (Spindle Assembly Complex) actors and a proteomic approach reveals the involvement of a cell spindle checkpoint during mitosis and meiosis and of the meiotic homologous recombination in the successful of spermatogenesis in 3nα and disruptions in 3nβ. The spermatogenesis of the 3nα oysters can be explain by epigenetic regulations such as DNA methylation have involved in gene silencing. To conclude, these results provide major data to understand the reproductive regulations of 3nα and β, particularly in the context of global changes, regarding the natural 2n oysters.

Keywords: *Crassostrea gigas*, oyster, triploidy, reproduction, spermatogenesis, cell cycle, mitosis, meiosis, environment.