



Université de Caen  
Basse-Normandie

**UNIVERSITE de CAEN BASSE-NORMANDIE**

**U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée**

**ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE BIOLOGIE INTEGRATIVE,  
SANTÉ, ENVIRONNEMENT**



**EdNBISE**

**Ecole doctorale Normande  
Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement**

**THESE**

présentée par

**Monsieur Amine NAIMI**

et soutenue

**Le 04 Mai 2009**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN  
BASSE-NORMANDIE**

**Spécialité : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions**  
*(Arrêté du 07 août 2006)*

**Le déterminisme du sexe de l'huître creuse *Crassostrea  
gigas* au cours de son développement et du cycle  
gamétogénétique adulte :  
recherche de déterminants moléculaires**

**MEMBRES du JURY :**

**Mr D. MORAGA,**

**Mr Y. GUIGUEN,**

**Mr P. BOUDRY,**

**Mr A. MOUKRIM,**

**M<sup>elle</sup> A-S. MARTINEZ,**

**Mr P. SOURDAINE,**

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Directeur de recherche, INRA, Station SCRIBE, Rennes

Chargé de recherche, IFREMER, Plouzané

Professeur, Université IBN ZOHR, Agadir, MAROC

Maître de conférences, Université de Caen Basse-Normandie

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Directeur de thèse**



## Avant-Propos

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'école doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE) sous la direction du professeur Pascal SOURDAINE et du Docteur Anne-Sophie MARTINEZ au laboratoire Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins (PE2M), Unité Mixte de Recherche 100 IFREMER, IFR 146 ICORE de l'Université de Caen Basse-Normandie.



Cette thèse a bénéficié du soutien financier par une allocation de recherche du conseil Régional de Basse-Normandie et de la Société Atlantique de Mariculture (SATMAR), Convention n° SJC 2005 – 12, du contrat de recherche de la Région de Basse-Normandie (CRAB, convention 05P00588) et du contrat de recherche Européen IFOP (Instruments financier d'orientation de la pêche, action innovatrices, convention N°11593/2004/DRAM Le Havre).



## Remerciements

*Cet avant propos est l'occasion pour moi de remercier le Professeur Pascal Sourdain pour m'avoir confié ce projet de recherche. Je le remercie pour son soutien, sa patience, sa rigueur scientifique et sa disponibilité. Il m'a fait confiance tout au long de ces années en me laissant une grande autonomie.*

*Je tiens à remercier le Docteur Anne-Sophie Martinez pour tout le soutien méthodologique et pratique qu'elle m'a apporté durant toutes ces années, pour les conseils scientifiques, pour l'encadrement, pour le temps et l'énergie qu'elle a passé à relire ce manuscrit.*

*Je remercie également sincèrement le Professeur Michel Mathieu pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins (PE2M), UMR M 100 IFREMER depuis ma maîtrise, pour son soutien, pour l'intérêt qu'il manifeste à ce travail.*

*J'exprime également toute ma gratitude au Docteurs Dario Moraga et Yann Guiguen qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'adresse évidemment mes sincères remerciements au Docteur Pierre Boudry pour sa participation à ce jury.*

*C'est un grand plaisir que le Professeur Abdellatif Moukrim soit présent pour juger ce travail et je le remercie vivement d'avoir fait l'effort de se déplacer d'Agadir afin d'apporter son expérience.*

*Je remercie Blandine Diss, responsable éclosion et R&D et Philippe Enaut de la SATMAR, pour l'approvisionnement en huîtres adultes et des stades de développement malgré les difficultés rencontrées à l'éclosion ainsi que pour l'intérêt porté à mon travail.*

*Je tiens également à remercier Béatrice Adeline pour les nombreuses coupes et colorations qu'elle a réalisées pour l'histologie, l'immunohistochimie et l'hybridation in situ, et ce, avec le sourire et une grande disponibilité.*

*Merci à Abdellah Mrac, Marie-Laure Specq et Christelle Santerre, étudiants en Master I et II, pour leur travail, notamment en biologie moléculaire, immunohistochimie ou hybridation in situ.*

*Je voudrais remercier tout particulièrement les Docteurs Kristell Kellner et Clothilde Heude avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche, ainsi que le Docteur Christophe Lelong, pour m'avoir fait bénéficier de leur savoir-faire scientifique, pour leurs grande disponibilité et leur confiance ainsi que Mlle Marie-Pierre Dubos, ingénieur d'étude au sein du laboratoire pour ces conseils et sa bonne humeur.*

*Je tiens aussi à remercier Didier Goux, Ingénieur en charge du plateau technique de Microscopie de l'IFR 146 ICORE, le CMABio, pour son aide, notamment en microscopie électronique à balayage.*

*Je remercie Mme Jeanne Mathieu pour son implication dans l'ensemble de mes démarches administratives.*

*Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire, professeurs, maîtres de conférences, personnels techniques et administratifs, et étudiants pour tous ces jours passés ensemble.*

*Tout d'abord je pense aux « anciens » du LBBM qui m'ont accueilli chaleureusement : Estelle Le Bihan, Fabien Badariotti, Christophe Fleury, Benoît Bernay, Julio César Marin Leal, Franck Rodet, Emilie Duval, Emily Farcy, Laurence Challier, Armelle Perrin, Jean-Marc Poncet.*

*A mes collègues, qui sont devenus de grands amis maintenant,*

*Alban Franco « Bamban, Bambino », Anne-Caroline Hanquet, Aude Jouaux, Fanou « Stéphane Frouel », Hervé Le Quéré (Pisou, P'tit Gris, Hervet), Laetitia Bigot, Rached Gharbi, Romain Thuau « Romanou, Bob », merci.*

*Alban pour ta gentillesse, pour les matchs de foot, pour ta bonne humeur et désolé pour la douche.... ce n'est pas bien de se venger.*

*Anne-Caroline pour les parties de pêches avec Damien, pour votre gentiesse et les moments qu'on a passé ensemble.*

*Hervé, pour ta présence, pour toutes les discussions, pour les moments inoubliables passés ensemble, pour tes blagues (des fois très spéciales), pour ton énergie parfois très débordante au bureau et que Bamban n'oubliera jamais, pour « Gojira et Sleepers », pour les noëls passés ensemble et pour m'avoir présenté ta famille très sympathique.*

*Fanou, pour ta bonne humeur, pour l'ambiance que tu as apportée au bureau, pour ta playlist et tes vidéos très spéciales, Bitoussa.*

*Rached, pour ta gentillesse, pour les moments passés ensemble, c'est un plaisir de te connaître.*

*Romanou, notre chimiste, pour ta gentillesse naturelle, pour ton soutien, pour ta bonne humeur, pour les moments qu'on a passé ensemble.*

*A mes grands amis, qui m'ont supporté pendant toute ces années même si je n'étais pas très disponible, Abdellah Mrac, Ali Bouali, Amr Loutfi, Mehdi Haidache, Mariem Janah, Mohamed El hioui, Omar Kamalou, Soufiane Ouberka, Yassine Alaoui. Abdellah « à ... la dedans », pour ton aide, pour ta gentillesse naturelle, pour ton sourire. Soufiane, pour ta présence, pour ton soutien à tout moment, pour tes conseils. Yassine, mon coloc, pour ton soutien, pour ta générosité, pour les moments passés ensemble. Mehdi, pour ton accueil à mon arrivée, pour les moments passés ensemble et nos discussions parfois très animées. Omar, pour ta simplicité, pour ton courage et ta gentillesse. Un grand Merci à tous.*

*A Célia, pour son soutien, pour sa présence, pour les moments passés ensemble et à sa famille très vivante et très sympathique.*

*Je dédie ce travail à mes parents « Driss, Khadija » et à mes sœurs « Jamila, Amal et Mouna » ainsi qu'à tous mes proches pour leur soutien. Un immense merci pour tout ce qu'ils ont fait et pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant toutes mes études, et à qui je dois énormément.*

## Résumé

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est un hermaphrodite protandre irrégulier successif. Les facteurs qui déterminent la première différenciation sexuelle et ceux impliqués dans les changements sexuels de l'adulte restent inconnus. Cette thèse a consisté en l'identification de facteurs moléculaires de la différenciation gonadique de l'huître au cours de son cycle adulte et de son développement. Ainsi, les orthologues respectifs des facteurs à domaine DM et de *Foxl2*, *Cg-DMI* et *Cg-Foxl2*, ont été identifiés chez l'huître par RT-PCR. Leur étude en PCR en temps réel, hybridation *in situ* et immunohistochimie, a montré une expression ubiquiste de *Cg-DMI* dans des cellules potentiellement en prolifération / différenciation, notamment dans les gonades des deux sexes. L'expression de *Cg-Foxl2* est spécifique de la gonade (à l'exception des palpes labiaux) chez les deux sexes. L'expression gonadique de ces facteurs est en accord avec le développement saisonnier de la gonade adulte. L'augmentation significative de l'expression de *Cg-DMI* chez le mâle au stade III et de *Cg-Foxl2* chez la femelle au stade II pourrait laisser supposer une fenêtre temporelle de réversion sexuelle variable selon les sexes, à la fin du cycle précédent le repos sexuel, plus précoce chez la femelle que chez le mâle. Au cours du développement, un pic d'expression de *Oyylg* et *Cg-DMI* a été observé après la métamorphose chez le naissain âgé de 1-1,5 mois alors que *Cg-Foxl2* décroît alors significativement. Cette fenêtre temporelle clé du développement pourrait correspondre à la différenciation des cellules germinales primordiales en cellules germinales souches lors de la première mise en place de la gonade.

## Summary

The pacific oyster *Crassostrea gigas* is a successive protandric irregular hermaphrodite. The factors involved in the first gonadic differentiation in juveniles and those involved in sex reversal in adults are still unknown. This thesis consisted in the identification of molecular factors of the oyster's gonadic differentiation during its adult cycle and its development. Thus, the respective orthologs to a DM-family factor and to *Foxl2*, *Cg-DMI* and *Cg-Foxl2*, have been characterized in the oyster by RT-PCR. Their study by real-time PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry, has highlighted a ubiquitous expression of *Cg-DMI* in potentially proliferating / differentiating cells in the gonads of both sexes. The *Cg-Foxl2* expression is specific to the gonads (excepted in the labial palps) in both sexes. The gonadic expression of these factors is in agreement with the seasonal development of the adult gonad. The significant increase of *Cg-DMI* in stage III male and of *Cg-Foxl2* in stage II female may suggest a temporal window of sex reversal variable according to sexes, at the end of the cycle preceding the sexual rest, more precocious in female than in male. During the development, a peak of expression of *Oyvlg* and *Cg-DMI* was observed after metamorphosis in 1-1.5 old month spats whereas *Cg-Foxl2* expression decreased significantly. This key temporal window of the development may correspond to the differentiation of primordial germ cells in germinal stem cells during the first gonadic establishment.

# Sommaire

**Avant propos**  
**Remerciements**

**Résumé**  
**Summary**

**Sommaire**  
**Liste des figures**  
**Liste des tableaux**  
**Liste des abréviations**

## Introduction générale

<b>I. Présentation générale de l’huître.....</b>	<b>1</b>
1. Données sur l’ostréiculture.....	1
2. Position phylogénétique de l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .....	2
3. Anatomie de l’huître adulte.....	6
4. Développement et reproduction de l’huître creuse.....	9
4.1. Développement de l’huître et formation de la lignée germinale.....	9
4.2. Développement de la gonade et cycle de reproduction de l’huître adulte.....	12
<b>II. Déterminisme du sexe chez l’huître et données génétiques.....</b>	<b>18</b>
<b>III. Les différents modes de déterminisme sexuel dans le règne animal.....</b>	<b>22</b>
1. Le déterminisme chromosomique du sexe.....	23
1.1. L’hétérogamétie mâle.....	23
1.1.1. Cas des Mammifères.....	23
1.1.2. Autres exemples.....	26
1.2. L’hétérogamétie femelle.....	27
1.2.1. Cas des oiseaux.....	27
1.2.2. Autres exemples.....	28
1.3. Le cas de trois chromosomes sexuels.....	29
2. Le déterminisme dose-dépendant.....	29
3. Le déterminisme à un seul locus complémentaire (Cas des hyménoptères).....	34
4. Le déterminisme environnemental du sexe.....	36
<b>IV. Le cas de l’hermaphrodisme.....</b>	<b>39</b>
<b>V. Les facteurs à domaine DM et la différenciation gonadique.....</b>	<b>42</b>
1. Structure des facteurs à domaine DM.....	42
2. Structure du domaine DM.....	45

3. Phylogénie et nomenclature des gènes à domaine DM.....	48
4. Rôle des facteurs à domaine DM.....	51
4.1. DMRT1, facteurs du déterminisme et/ou de la différenciation sexuelle.....	51
4.2. Les autres facteurs de la famille DMRT.....	53
<b>VI. Forkhead box-L2 (Foxl2) et la différenciation ovarienne.....</b>	<b>58</b>
1. Découverte et classification des facteurs Fox.....	58
2. Structure des facteurs Fox.....	60
3. Expression de Foxl2 et rôle dans la différenciation ovarienne.....	63
<b>VII. Problématique de l'étude et objectifs.....</b>	<b>67</b>

## Matériels et méthodes

<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>69</b>
1. Animaux.....	69
2. Prélèvement d'échantillons biologiques.....	70
<b>II. Techniques histologiques.....</b>	<b>72</b>
1. Préparation et coupe des échantillons biologiques.....	72
2. Coloration au trichrome de Prenant gabe (Gabe, 1968).....	72
<b>III. Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>73</b>
1. Préparation des ARN.....	73
1.1. Extraction des ARN totaux.....	73
1.2. Traitement à la DNase.....	73
1.3. Qualité et quantité des ARN.....	73
1.4. Purification des ARN polyadénylés à partir des ARN totaux.....	74
2. Rétrotranscription des ARN polyadénylés en ADN <sub>c</sub> .....	74
3. Extraction de l'ADN génomique.....	76
4. Choix des amorces.....	76
5. Réactions de PCR.....	77
6. Extension de l'ADN <sub>c</sub> par RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends PCR).....	77
6.1. Déphosphorylation des ARN.....	78
6.2. Clivage de la coiffe.....	78
6.3. Ligation de l'adaptateur oligoribonucléique.....	78
6.4. Transcription inverse.....	80
6.5. Amplification par PCR.....	80
7. Sous-clonage et séquençage.....	81
7.1. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose.....	81
7.2. Sous-clonage des fragments d'ADN.....	81
7.3. Transformation de bactéries électrocompétentes.....	81
7.4. Extraction de l'ADN plasmidique.....	82
7.5. Séquençage automatique.....	83
8. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	83

9. Analyses informatiques des séquences.....	84
10. RT-PCR quantitative en temps réel (real time qRT-PCR).....	84
10.1. Principe.....	84
10.2. Validation et efficacité des couples d'amorces.....	85
10.3. Rétrotranscription et amplification.....	87
11. Synthèse des sondes pour le criblage de la banque d'ADNg, le Northern blot et l'hybridation <i>in situ</i> .....	88
12. Criblage d'une banque d'ADN génomique et analyse des clones.....	90
12.1. Transfert sur membrane et hybridation.....	90
12.2. Purification de l'ADN de phages recombinants.....	91
12.3. Criblage différentiel de l'ADN des phages recombinants.....	91
12.4. Digestions enzymatiques et <i>Southern blotting</i> .....	92
13. <i>Northern Blotting</i> .....	92
14. Hybridation <i>in situ</i> .....	93

#### **IV. Techniques biochimiques : *Western Blotting*.....**

1. Extraction et dosage des protéines.....	94
2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	95
3. Transfert des protéines sur membrane PVDF ( <i>PolyVinylidene DiFluoride</i> ).....	95
4. Choix des anticorps.....	95
5. Immunomarquage indirect.....	96

#### **V. Immunohistochimie.....**

#### **VI. Observations et prises de vues.....**

#### **VII. Analyse statistiques des résultats.....**

## **Résultats**

### **Chapitre I: Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*.**

#### **Introduction.....**

*Article 1: Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster Crassostrea gigas (2009). Amine Naimi, Anne-Sophie Martinez, Marie-Laure Specq, Abdellah Mrac, Blandine Diss, Michel Mathieu, Pascal Sourdain. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 152, 189-196.....*

#### **Annexes.....**

**Chapitre II: Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*.**

<b>Introduction.....</b>	<b>131</b>
<i>Article 2: Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster Crassostrea gigas. Amine NAIMI, Anne-Sophie MARTINEZ, Blandine DISS, Michel MATHIEU, Pascal SOURDAINE. Soumis à Comparative Biochemistry and Physiology.....</i>	<b>133</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>159</b>
<b>Discussion générale, conclusions et perspectives.....</b>	<b>161</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>169</b>
<b>Liste des publications et communications personnelles.....</b>	<b>190</b>

## Liste des figures (texte et articles)

<b>Figure 1 :</b> Phylogénie des métazoaires basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Adoutte <i>et al.</i> , 2000).....	5
<b>Figure 2:</b> Anatomie de l'huître creuse <i>C. gigas</i> .....	7
<b>Figure 3 :</b> Cycle de développement de <i>Crassostrea gigas</i> à 25°C.....	10
<b>Figure 4 :</b> Ontogenèse de la lignée germinale de <i>Crassostrea gigas</i> (d'après Fabioux, 2004 b).....	11
<b>Figure 5:</b> Aire gonadique de <i>Crassostrea gigas</i> .....	13
<b>Figure 6:</b> Cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> adulte.....	17
<b>Figure 7 :</b> Schéma de deux portions de follicules bisexuels chez <i>C. virginica</i> de 4 mois d'âge.....	20
<b>Figure 8 :</b> Hypothèse de déterminisme sexuel chez l'huître creuse <i>C. gigas</i> d'après les travaux de Guo <i>et al.</i> (1998).....	21
<b>Figure 9 :</b> Cascade simplifiée du déterminisme du sexe chez les Mammifères.....	25
<b>Figure 10 :</b> Cascade de déterminisme du sexe chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
<b>Figure 11 :</b> Cascades du déterminisme du sexe chez <i>C. elegans</i> .....	33
<b>Figure 12 :</b> Déterminisme du sexe à un seul locus complémentaire lors de la reproduction haplo-diploïde chez les hyménoptères.....	35
<b>Figure 13 :</b> Profils d'expression de <i>Dmrt1</i> , <i>Sox9</i> et <i>Dax1</i> dans les gonades au cours du développement chez la tortue olivâtre <i>Lepidochelys olivacea</i> , une espèce présentant un déterminisme du sexe dépendant de la température.....	38
<b>Figure 14 :</b> Représentation schématique des différents facteurs Dmrt chez les Vertébrés.....	44
<b>Figure 15 :</b> Alignement des domaines DM des facteurs Dmrt chez les métazoaires.....	46
<b>Figure 16 :</b> Représentation en 3D de la structure du domaine DM de DSX entre les résidus 41-81.....	47
<b>Figure 17 :</b> Phylogénie moléculaire des protéines Dmrt chez les Vertébrés.....	50
<b>Figure 18 :</b> Analyse phylogénétique des protéines Fox basée sur la séquence en acides aminés du domaine <i>Forkhead</i> (d'après Adell et Müller, 2004).....	59
<b>Figure 19 :</b> Structure tridimensionnelle et alignement des séquences en acides aminés du domaine <i>Forkhead</i> de liaison à l'ADN de différentes protéines Fox.....	62
<b>Figure 20 :</b> Calendrier des prélèvements des échantillons biologiques.....	71

<b>Figure 21 :</b> Principe de la technique de RACE-PCR à l'aide du kit GeneRacer™ (Invitrogen®).....	79
<b>Figure 22 :</b> (A) Exemple de courbe d'amplification. (B) Courbe d'efficacité d'amplification par qRT-PCR. (C) Dérivée de la courbe de fusion des amplicons.....	86
<b>Figure 23:</b> Structure tridimensionnelle du domaine DM de Cg-DMI.....	111
<b>Figure 24 :</b> Recherche d'un épissage alternatif du transcrit <i>Cg-DMI</i> aux extrémités 3' et 5' par RACE-PCR sur du naissain de 1 et 1,5 mois.....	112
<b>Figure 25 :</b> Séquences nucléiques (A, C) et protéiques (B, D) des fragments de 300pb (nommée <i>Cg-DMI-b</i> ) (A, B) et de 500pb (nommée <i>Cg-DMI-c</i> ) (C, D) des isoformes différentiellement poly-adenylées de <i>Cg-DM</i> dans la région 3'.....	113
<b>Figure 26 :</b> Alignement multiple des séquences protéiques des fragments de 1500 ( <i>Cg-DMI-a</i> ), 300 ( <i>Cg-DMI-b</i> ) et 500pb ( <i>Cg-DMI-c</i> ) des isoformes différentiellement poly-adenylées de <i>Cg-DMI</i> dans la région 3'.....	114
<b>Figure 27 :</b> RT-PCR d'ARNm de différents tissus d'huîtres.....	115
<b>Figure 28 :</b> Quantité relative de transcrits du gène <i>Cg-DMI</i> dans divers tissus d'huître analysée par RT-PCR en temps réel.....	116
<b>Figure 29 :</b> <i>Western Blot</i> à partir de tissus d'huîtres, de rat et de souris.....	119
<b>Figure 30 :</b> Immunohistochimie du testicule de souris.....	121
<b>Figure 31 :</b> Stades de gamétogenèse de la souris (d'après Russell <i>et al.</i> , 1990).....	122
<b>Figure 32 :</b> Expression de la protéine Cg-DMI dans le manteau (A - D) et la glande digestive (E - H) de <i>C. gigas</i> .....	125
<b>Figure 33 :</b> Expression de la protéine Cg-DMI dans la gonade mâle (A - E) et la gonade femelle (F-K) au stade IIIa chez <i>C. gigas</i> .....	126
<b>Figure 34 :</b> Dessin d'une larve véligère d' <i>Ostrea edulis</i> (Galtsoff, 1964).....	129
<b>Figure 35 :</b> Expression de la protéine et du transcrit de Cg-DMI chez la larve véligère de <i>C. gigas</i> .....	129
<b>Figure 36 :</b> Dessin d'une huître juvénile (naissain) d' <i>Ostrea edulis</i> (Galtsoff, 1964).....	130
<b>Figure 37 :</b> Expression de la protéine Cg-DMI chez le naissain de 1 mois de <i>C. gigas</i> ....	130
<b>Figure 38 :</b> Séquences nucléotidique et protéique de Cg-Foxl2. En minuscule, les régions 5' et 3' non traduites. Le domaine <i>Forkhead</i> est souligné. La séquence consensus du signal de polyadénylation est encadrée.....	159
<b>Figure 39 :</b> Structure tridimensionnelle du domaine du domaine <i>Forkhead</i> de Cg-Foxl2 et Foxc2.....	160

**Figure 40 :** Schéma préliminaire récapitulant la période potentielle du déterminisme du sexe et les implications potentielles de Cg-DML et Cg-Foxl2 dans la différenciation gonadique au cours de la 1ère mise en place de la gonade chez *C. gigas*..... 167

**Figure 41 :** Schéma préliminaire récapitulant la période potentielle des réversions sexuelles et les implications potentielles de Cg-DML et Cg-Foxl2 dans la différenciation gonadique au cours du cycle gamétogénétique adulte chez *C. gigas*..... 168

*Article 1: Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster Crassostrea gigas (2009) Amine Naimi, Anne-Sophie Martinez, Marie-Laure Specq, Abdellah Mrac, Blandine Diss, Michel Mathieu, Pascal Sourdain. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 152, 189-196.*

**Figure 1 :** (A) Nucleotide sequence of the *Cg-DML* cDNA and its deduced amino acid sequence (EU046234). (B) Nucleotide sequence of the *Cg-DML* intron. (C) Schematic presentation of *Cg-DML*, *Dmrt1*, *Dmrt4* and *Dmrt5* genes..... 106

**Figure 2 :** (A) Southern blot analysis of three of the eight clones obtained from the screening of the genomic library of *C. gigas*. (B) Differential hybridization of the DNA of the clones 2A1, 2B1 and 3P1 with either a DM domain probe found in all the factors of the family (Line 1), the *Cg-DML* intron probe (Line 2) or a HDM probe specific to *Cg-DML* (Line 3)..... 107

**Figure 3 :** (A) Alignment of amino acid sequences of the DM domain of oyster *Cg-DML*, *Drosophila Dmrt99B*, mouse (Mus), human (Hsa) and medaka (Ola) *Dmrt4* and *Dmrt5*, tilapia (Oreni) *DMO* and mouse and human *Dmrt1*. (B) Alignment of amino acid sequences of the DMA domain and the short conserved motif of oyster *Cg-DML*, coral *AmDML*, *Drosophila DmelDmrt93B* and *99B* and human (Hsa) *Dmrt4* and *Dmrt5*..... 107

**Figure 4 :** Phylogenetic tree generated using the DM domain of the DMRT proteins showing that *Cg-DML* is clustered together with *DMRT5*..... 108

**Figure 5 :** Real time RT-PCR transcripts quantification relative to *EF1α* in developmental stages of *C. gigas* with DM (black bars) and HDM (grey bars) primers... 108

**Figure 6 :** Real time RT-PCR transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle with DM (diamonds) and HDM (insert)..... 108

**Figure 7 :** Histological sections of gonads of stage II male (A) and female (D) stained with a Prenant-Gabe trichrome - *Cg-DMI* mRNA expression pattern by *in situ* hybridization with anti-sense riboprobe (B, E and G) and sense riboprobe (C, F and H)... 109

**Figure 8 :** Histological sections of the mantle (A) and the digestive gland (D) stained with a Prenant-Gabe trichrome - *Cg-DMI* mRNA expression pattern by *in situ* hybridization with anti-sense riboprobe (B and E) and sense riboprobe (C and F)..... 109

*Article 2: Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster Crassostrea gigas (2009). Amine NAIMI, Anne-Sophie MARTINEZ, Blandine DISS, Michel MATHIEU, Pascal SOURDAINE. Soumis à Comparative Biochemistry and Physiology.*

**Figure 1 :** Alignment of amino acid sequences of oyster *Cg-Foxl2* with *Foxl2* proteins of some Vertebrates..... 147

**Figure 2 :** Northern blot analysis of *Cg-Foxl2* mRNA in male (M) and female (F) gonads of adults of *C. gigas* showing the presence of only one *Cg-Foxl2* mRNA transcript between 1500 and 2000b in both sexes..... 148

**Figure 3 :** Phylogenetic tree of the Fox proteins showing that *Cg-Foxl2* is clustered together with *Foxl2*..... 149

**Figure 4 :** Phylogenetic tree of the *Foxl2* proteins showing that *Cg-Foxl2* presents an out group with the trout *Foxl2b* and ciona *Foxl2*..... 150

**Figure 5 :** Real-time RT-PCR *Cg-Foxl2* transcripts quantification relative to *EF1α* in different tissues of *C. gigas*..... 151

**Figure 6 :** Real time RT-PCR transcripts quantification relative to *EF1α* in developmental stages of *C. gigas* with *Cg-Foxl2*, *Cg-DMI* and *OyVlg* primers..... 152

**Figure 7 :** (A) Real time RT-PCR *Cg-Foxl2* transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle. (B) Real time RT-PCR *Oyvlg* transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle..... 153

**Figure 8 :** Histological sections of the gonadic area of spats of 3 months (A), 3.5 months (B) and 4 months old (C) stained with a Prenant-Gabe trichrome..... 154

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Expression des différents facteurs DMRT chez les Vertébrés.....	57
<b>Tableau 2</b> : Evolution du <i>sexe-ratio</i> des familles de géniteurs adultes 01-3, 02-Sé1 et 02-Sé2 entre 2004 et 2005.....	69
<b>Tableau 3</b> : Présentation des séquences des diverses amorces utilisées.....	75



## Liste des abréviations

aa : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

AFLP : *Amplified fragment-length polymorphism*

AmDML : *Acropora millepora DM-like*

Amh : Hormone anti-müllérienne

AR : Récepteur aux androgènes

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARN polyA : Acide ribonucléique poly-adénylé

Asw : *Avian Sex-specific W-linked*

BCA : Acide bicinchoninique

BPES : Blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome

BSA : Albumine sérique bovine

Cg-DML : *C. gigas DM like*

Cg-Foxl2 : *C. gigas Forkhead box L2*

CGPs : cellules germinales primordiales

CGSs : cellules germinales souches

CIP : Phosphatase intestinale de veau

CODEHOP : Consensus-DEgenerated Hybrid Oligonucleotide Primers

CSD : Déterminisme chromosomique du sexe

Csd : Complementary sex determination

Ct : Cycle threshold (Cycle seuil)

DAB : 3-3 Diaminobenzidinetétrahydrochloride

Dax1 : *dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital-critical region of the X chromosome gene 1*

DEPC : DiEthyl PyroCarbonate

Dhh : *Desert hedgehog*

DIG : Digoxygénine

Dmrt : *Doublesex and mab-3-related transcription factor*  
DNAse I RQI : Désoxyribonucléase I RNA-Qualified I  
dNTP : Désoxyribonucléotide tri-phosphate  
DO : Densité optique  
Dsx : *Doublesex*  
DTT : Dithiothreitol  
EDTA: Ethyldiamine Tetraacetic Acid  
EF1- $\alpha$ : *Elongation factor 1-  $\alpha$*   
EGTA : Ethylene glycol tetraacetic acid  
ER : Récepteur aux estrogens  
EST: expressed sequence tag  
FAO: Food and Agriculture Organization  
Fet1 : *Female-Expressed Transcript 1*  
Fgf9 : *Fibroblast growth factor 9*  
Fig $\alpha$  : *Factor in germ line  $\alpha$*   
Foxl2 : *Forkhead box-L2*  
FPT: *Female-promoting temperature*  
Fru : *Fruitless*  
GnRHR: *Gonadotropin releasing hormone receptor*  
GRAS : *GnRH-receptor activating sequence*  
HDM : Hors domaine DM  
Her : *Hermaphrodite*  
Hintw : *Histidine triad nucleotide binding protein W-linked*  
HIS : Hybridation *In Situ*  
hpf: Heure post-fécondation  
IDM : Intron *Cg-DMI*  
IHC : Immunohistochimie  
IPTG : Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosidase  
Ix : Intersex  
jpc : Jour *post-coïtum*  
jpf : Jour post-fécondation  
kDa: KiloDalton  
LB: Luria Bertani  
LH : Hormone lutéinisante

Mb : Megabase

mg : Milligramme

ml : Millilitre

M : Mole.l<sup>-1</sup>

mM : Millimole.l<sup>-1</sup>

M-MLV RT: Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase

MOPS : Acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique

MPT : Male-promoting temperature

µg : Microgramme

µl: Microlitre

NBT/BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl Phosphate

ng : Nanogramme

NLS : Nuclear localization signal

nmole : Nanomole

OD1 et 2 : Oligomerization domain 1 et 2

ORF : Open Reading Frame

Oyvlg : *Oyster Vasa like gene*

pb : paire de base

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEG : PolyEthylèneGlycol

Pfu : plaque forming units

pg : Picogramme

PIS : *Polled intersex syndrome*

pmole : Picomole

PVDF : PolyVinylidene\_DiFluoride

QR : Quantités relatives

qRT-PCR : Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA Ends – Polymerase Chain Reaction

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNase free : Ribonuclease free

RNP : Ribonucleoprotein

SATMAR : Société Atlantique de Mariculture

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Sf1 : *Steroidogenic factor 1*

Sex-1 : *Signal element on X*

Sry : *Sex-determining region on Y chromosome*

Sox9 : *SRY-like HMG box 9*

StAR : *Steroidogenic acute regulatory protein*

Sxl : *Sex-Lethal*

TAP : *Tabacco Acid Pyrophosphatase*

Tm: *Température de fusion*

TSD : *Déterminisme du sexe sous influence de la température*

Tra : *Transformer*

UV : *Ultra violet*

Wnt4 : *Wingless-related MMTV integration site 4*

Wpkci : *W-linked protein kinase C inhibitor*

Wt1 : *Wilm's tumour 1*

X-Gal : *5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase*

Xol-1 : *XO lethal*

## I. Présentation générale de l'huître

### 1. Données sur l'ostréiculture

Avec près de 4,5 millions de tonnes produites par an, les huîtres représentent plus du tiers de la production mondiale de Mollusques. *Crassostrea gigas* est de loin l'espèce prédominante puisqu'en 2003, elle représentait plus de 99 % de la production d'huîtres d'une valeur de 3,7 billions de dollars américain (FAO, pêches et aquaculture). La France, avec près de 126 000 tonnes par an en 2006-2007, se situe au premier rang européen et au quatrième rang mondial des producteurs d'huîtres creuse après la Chine, le Japon et la Corée (Comité national de la conchyliculture). La région Basse-Normandie est l'une des plus importantes régions ostréicoles françaises avec une production annuelle de près de 27000 tonnes.

Originnaire du Japon, *Crassostrea gigas* a été introduite en France dans les années 70 afin de reconstituer le parc ostréicole français décimé par plusieurs épizooties consécutives de *Marteilia refringens* et de *Bonamia ostreae*. L'ostréiculture française est ainsi dans une situation de quasi monoculture (Grizel *et al.*, 1974 ; Comps et Duthoit, 1976), ce qui la rend particulièrement vulnérable à tout nouveau risque d'épizootie.

Cette espèce connaît un élevage intensif nécessitant un approvisionnement important en juvéniles obtenus soit par captage, qui consiste en la récupération de naissain dans le milieu naturel, soit à partir de productions d'écloseries. En France, l'approvisionnement majoritaire reste le captage naturel (80% de la production française contre seulement 10% aux USA et au Canada) qui présente l'inconvénient d'être tributaire des conditions environnementales parfois incompatibles avec les impératifs économiques. De plus, depuis une dizaine d'années, le parc ostréicole français connaît un nouveau type d'huîtres, les triploïdes (3n), obtenues soit par croisement entre des femelles diploïdes (2n) et des mâles tétraploïdes (4n) (triploïde naturel), soit par blocage de l'un des globules polaires (triploïde chimique) après la fécondation, à l'aide de la cytochalasine B. Ces huîtres présentent, du fait de leur stérilité partielle ou totale, une qualité constante tout au long de l'année. C'est pourquoi, il est nécessaire d'approvisionner régulièrement les ostréiculteurs en juvéniles d'élevage et pour cela les écloseries doivent maîtriser les stocks et le conditionnement de leurs géniteurs.

Cette production en conditions contrôlées nécessite une connaissance accrue de la physiologie de la reproduction de cette espèce afin, par exemple, d'éviter des déséquilibres de *sexe-ratio* des géniteurs.

## 2. Position phylogénétique de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'acquisition des données moléculaires a permis à la classification phylogénétique de prendre le pas sur la classification phénétique d'où une réorganisation de l'arbre phylogénétique des Métazoaires (Figure 1).

La classification phénétique est fondée sur la similitude des morphologies ou des caractères entre espèces alors que la classification phylogénétique est basée sur la parenté évolutive de groupes issus d'ancêtres communs. Cette classification cladistique repose sur le principe qu'une espèce ancestrale donne naissance à deux espèces-filles. Un groupe d'espèces est dit monophylétique lorsqu'il dérive d'un seul ancêtre commun et polyphylétique lorsque les espèces ne descendent pas toutes en ligne directe d'un ancêtre commun. Les méthodes de la phylogénie moléculaire reposent également sur l'hypothèse que les homologies de séquences des gènes sont d'autant plus importantes que leur lien de parenté est étroit (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Toutes les phylogénies moléculaires classent les Bilatériens comme un groupe monophylétique clairement séparé des éponges, des Cnidaires et des Cténophores et situent son émergence il y a 570 à 670 millions d'années (Ayala *et al.*, 1998 ; Peterson *et al.*, 2004) avec l'apparition de l'*Urbilateria* comme ancêtre commun (Peterson *et al.*, 2000). Cette estimation est en accord avec les données paléontologiques qui indiquent que le plus ancien fossile de Bilatériens connu est âgé d'environ 555 millions d'années.

Les analyses de la séquence de l'ARNr 18S (Adoutte *et al.*, 1999, 2000), de diverses protéines (Peterson *et al.*, 2004) et des gènes Hox (De Rosa *et al.*, 1999) permettent de distinguer trois grands clades au sein des Bilatériens. Leurs origines proviendraient d'une double divergence survenue à la fin du précambrien, il y a 560 à 570 millions d'années. La première aurait conduit à la séparation des Deutérostomiens et des Protostomiens. La seconde serait responsable de la scission du groupe des Protostomiens en Lophotrochozoaires et Ecdysozoaires (Figure 1).

Les Deutérostomiens sont des organismes définis sur la base d'un critère embryologique qui est l'ontogenèse de la bouche (*stoma*) qui apparaît secondairement

(*deutero*), après l'anus. Ce clade regroupe les Vertébrés, les Céphalochordés, les Urochordés, les Hémichordés et Echinodermes (Adoutte *et al.*, 2000).

Les Protostomiens Ecdysozoaires, qui regroupent notamment les Arthropodes, les Nématodes et les Céphalorhynches, réalisent leur croissance par des mues et montrent une forte proximité phylogénétique.

Les Protostomiens Lophotrochozoaires regroupent les Mollusques, les Bryozoaires, les Plathelminthes, les Brachiopodes, les Némertes, les Annélides et les autres Protostomiens présentant une larve trochophore. Cette dernière, en forme de toupie, est caractérisée par la présence d'une bande de cils locomoteurs, la prototroche, et peut présenter également un lophophore, couronne de tentacules entourant la bouche, d'où le nom du groupe (Adoutte *et al.*, 2000 ; Lecointre et Le Guyader, 2001).

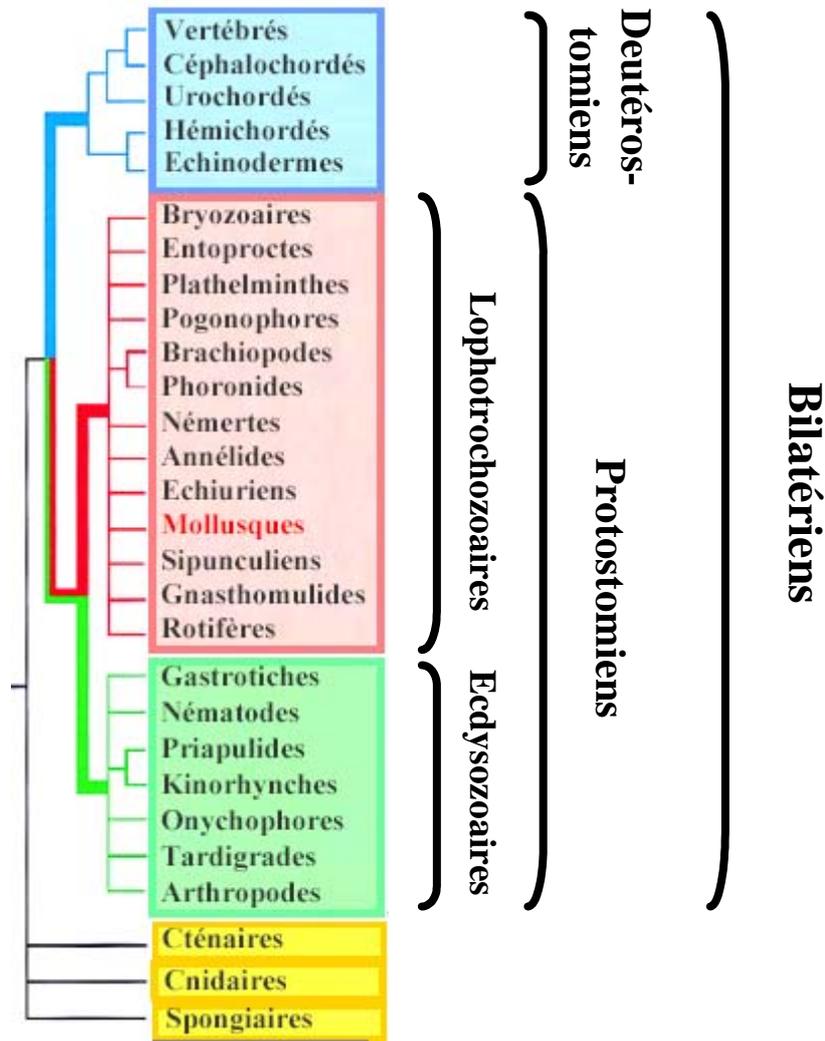
Les Mollusques (du latin *mollis*, mou) comptent plus de 117 400 espèces dont le plus ancien fossile connu datant du Cambrien inférieur, il y a 540 millions d'années. Ce sont des organismes de formes très variées mais dont le plan d'organisation est homogène, non segmentés, à symétrie bilatérale quelquefois altérée par une torsion du corps. Leur corps se compose généralement d'une tête, absente chez les Bivalves, d'une masse viscérale et d'un pied. La masse viscérale est recouverte en tout ou partie par un manteau qui sécrète des formations calcaires (carbonate de calcium) sous forme de spicules lorsque les glandes sécrétrices du manteau sont diffuses ou sous forme de plaques lorsque ces glandes sont regroupées en zones de sécrétion. Le système nerveux comprend un anneau entourant l'œsophage, plusieurs paires de ganglions, une paire de connectifs innervant le pied et une boucle palléale innervant le manteau et la masse viscérale. La cavité générale est plus ou moins réduite au péricarde et aux néphridies.

Il y a actuellement huit classes de Mollusques : les Solénogastres, les Caudofovéates, les Polyplacophores, les Monoplacophores, les Gastéropodes, les Céphalopodes, les Bivalves (ou Lamellibranches) et les Scaphopodes. L'absence de mise en évidence du caractère monophylétique que ce soit pour les Mollusques ou pour les Bivalves (Winnepenninckx *et al.*, 1996) pourrait être liée à la variabilité de la séquence de l'ARNr 18S du fait d'une divergence rapide de la majorité des phylums des Métazoaires au début du Cambrien (Erwin, 1991 ; Adoutte et Philippe, 1993). Toutefois, l'analyse combinée des séquences des grandes et des petites sous-unités ribosomales (ARNr 18S et 28S) des Lophotrochozoaires montre que les Mollusques sont monophylétiques (Passamaneck et Halanych, 2006) et la restriction de cette étude aux séquences des Mollusques révèle l'absence de caractère monophylétique des

Bivalves alors que les Polyplacophores, les Gastéropodes, les Céphalopodes et les Scaphopodes (Passamaneck *et al.*, 2004) le sont.

Les Bivalves ou Lamellibranches sont des Mollusques au corps comprimé latéralement et enveloppé dans un repli du manteau. Ce dernier est doublé extérieurement d'une coquille constituée de deux valves, une droite et une gauche, qui délimite la cavité palléale. La fermeture et la liaison des valves sont assurées par deux muscles adducteurs antérieur et postérieur, le premier pouvant s'atrophier ou disparaître.

Les huîtres appartiennent à l'ordre des Ostréoidés et à la famille des Ostréidés caractérisée par une coquille à valve gauche plus profonde que la droite. Trois genres sont représentés actuellement *Pycnodonta*, *Ostrea* et *Crassostrea*. Parmi les espèces du genre *Pycnodonta* on trouve *Pycnodonta cochlear*, *P. hyotis* et *P. numisma* ; les genres *Ostrea* et *Crassostrea* comprennent respectivement les espèces *Ostrea edulis*, *O. lurida*, *O. sinuata* et *Crassostrea gigas* (huître japonaise dites huître du Pacifique ou huître creuse), *C. angulata* (huître portugaise) et *C. virginica* (huître américaine).



**Figure 1 : Phylogénie des métazoaires basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Adoutte *et al.*, 2000).**

Les Animaux Bilatériens se subdivisent en trois grands clades appelés Deutérostomiens, Protostomiens Lophotrochozoaires et Protostomiens Ecdysozoaires.

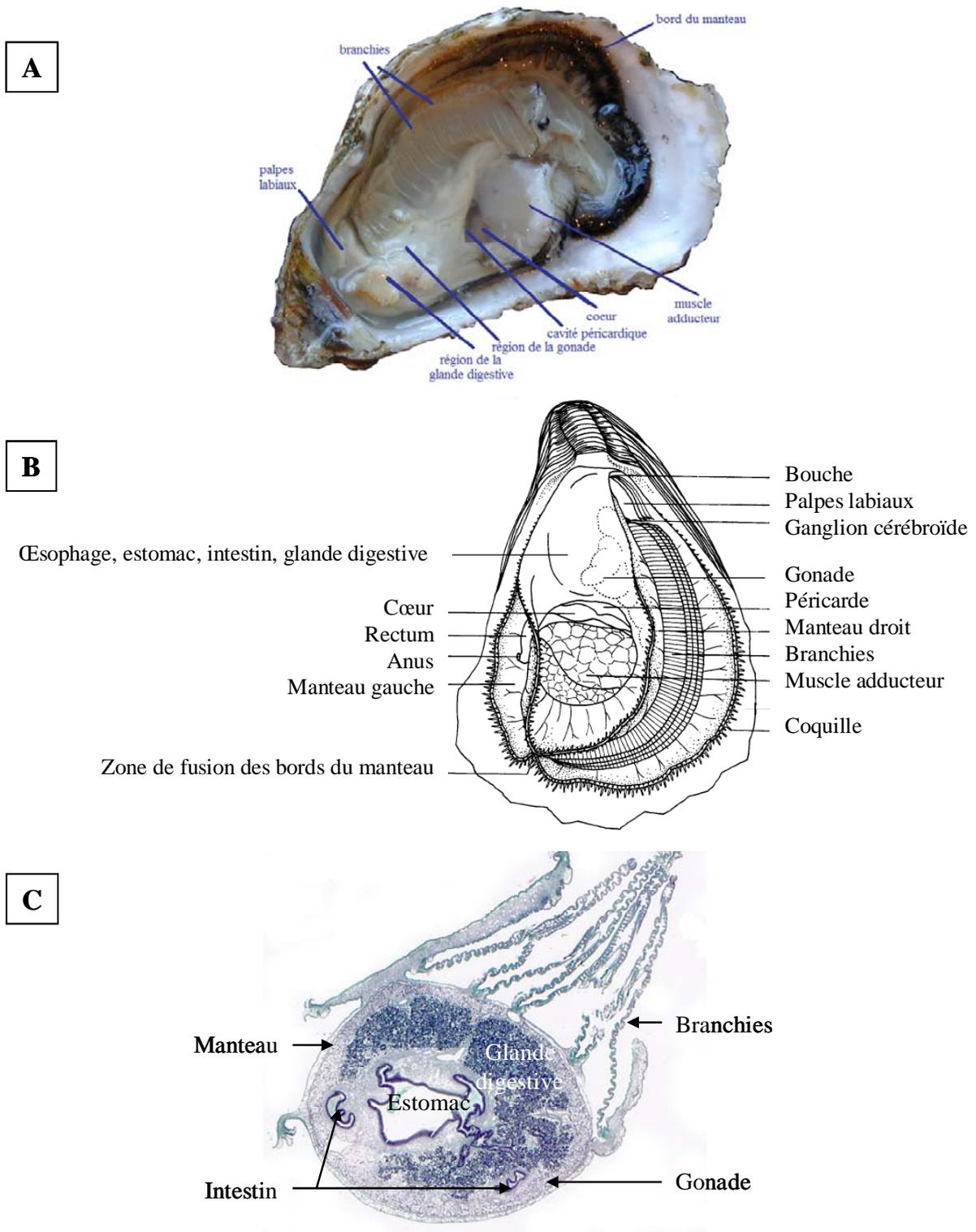
### **3. Anatomie de l'huître adulte (Galtsoff, 1964 ; Marteil, 1976)**

(Figure 2)

Les huîtres présentent deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un seul muscle adducteur puissant. La valve inférieure (gauche) est creuse et se recourbe sur la charnière tandis que la valve supérieure (droite) est plane; les bords des deux valves s'emboîtent. Les stries de croissance sont peu visibles. La coquille se compose de trois couches comme chez tous les Mollusques : i) la couche la plus externe ou périostracum, fine et cornée, est formée de protéines tannées non minéralisées et recouvre initialement la totalité de la coquille puis disparaît progressivement en raison de sa fragilité ; ii) la couche intermédiaire composée de prismes verticaux de carbonate de calcium (cristaux de calcite) reposant sur une matrice protéique de conchyoline ; iii) la couche interne ou nacre constituée de cristaux d'aragonite empilés horizontalement et d'une matrice organique peu abondante.

L'ensemble des parties molles de l'animal est enveloppé dans le manteau dont les deux lobes sont soudés près de la charnière et forment un renflement, le capuchon céphalique. Le bord du manteau qui est fortement pigmenté est composé de trois bourrelets: le bourrelet externe, médian et interne. Les cellules du bord de manteau sont impliquées dans la formation de la coquille notamment en synthétisant le périostracum et les matrices organiques des deux couches minéralisées. Par ailleurs, le repli médian du bord du manteau a un rôle sensoriel et le repli interne est musculéux. Le manteau est également couvert de cils à l'origine d'un courant d'eau entre les valves. L'espace compris entre les deux lobes du manteau est la cavité palléale. Celle-ci est remplie par de l'eau de mer, ce qui permet à l'animal de supporter des périodes d'émersion de plusieurs heures.

Les huîtres sont acéphales; la masse céphalique n'est représentée que par la bouche et les palpes labiaux. Ces palpes labiaux, au nombre de quatre, sont situés sous le capuchon céphalique. Ils ont une fonction de tri et d'orientation des particules alimentaires vers l'orifice buccal. Ils constituent aussi des organes de réserve énergétique.



**Figure 2: Anatomie de l'huître creuse *C. gigas*.**

**A-** Photo montrant l'anatomie de l'huître: palpes labiaux, muscle adducteur, glande digestive, branchies, manteau, cœur et gonade. (Photo: <http://www.snv.jussieu.fr>)

**B-** Dessin illustrant l'anatomie de l'huître (d'après Galtsoff, 1964).

**C-** Coupe histologique d'huître montrant la localisation des branchies, du manteau, de la gonade, de la glande digestive, de l'estomac et de l'intestin.

Le système digestif comprend une bouche, un œsophage très court, un estomac, un intestin, une glande digestive, un rectum et un anus. L'estomac forme un long cæcum avec une évagination tubulaire contenant le stylet cristallin. Celui-ci est rempli d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives et agit comme un pilon pour broyer les particules alimentaires contre un épaissement de l'estomac appelé bouclier gastrique. L'estomac communique directement avec la glande digestive. Cette dernière est constituée de nombreux diverticules digestifs qui englobent complètement l'estomac et les replis de l'intestin. L'intestin, quant à lui, forme une large boucle et se termine par le rectum qui est localisé contre le muscle adducteur.

L'animal possède également deux paires de branchies lamellaires soudées au manteau par leurs bases et qui s'étendent depuis l'anus jusqu'aux palpes labiaux. Elles assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Elles sont constituées de filaments ciliés qui créent un courant d'eau permanent afin d'assurer l'apport continu en oxygène et en particules alimentaires. Ces particules alimentaires seront retenues par le mucus qui recouvre les branchies puis elles sont transportées jusqu'aux palpes labiaux qui les trient et les dirigent alors vers la bouche.

Le système circulatoire est partiellement clos et de type lacunaire. En effet, l'hémolymphe n'est pas confiné aux vaisseaux et au cœur mais peut s'insinuer librement au sein des tissus et des sinus cœlomiques. Ce système circulatoire intervient dans le transport des nutriments, de l'oxygène et des déchets du métabolisme. Le cœur est simple, constitué par deux oreillettes et un ventricule. Il est situé en avant du muscle adducteur dans la cavité péricardique. Le cœur propulse l'hémolymphe dans les artères et les artérioles vers la masse viscérale et le muscle adducteur. L'hémolymphe aboutit ensuite dans les grands espaces libres que sont les lacunes puis, désoxygénée, elle est alors renvoyée vers les branchies et les reins. Après réoxygénation au niveau des branchies elle est enfin reconduite au cœur par un système artériel.

Le système d'excrétion est assuré par un rein formé par une glande tubulaire contenue dans un sinus rénal. Celui-ci est localisé sous le muscle adducteur dans la zone péricardique et sous le manteau.

Le système nerveux est réduit et n'est constitué que de quelques ganglions difficilement observables.

Enfin, la gonade qui recouvre la glande digestive est un organe non permanent dont la structure varie au cours du cycle de reproduction.

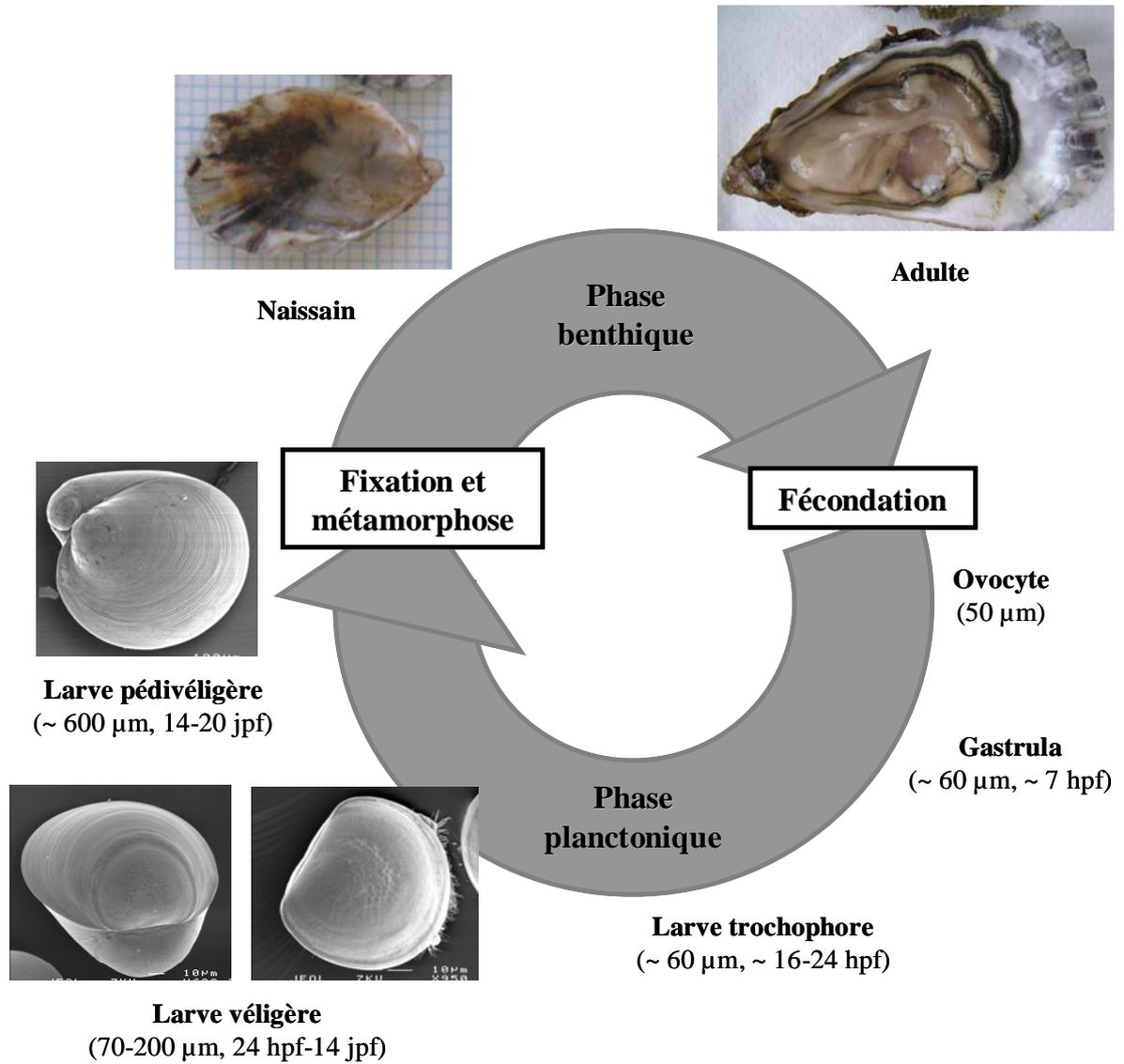
## 4. Développement et reproduction de l'huître creuse

### 4.1. Développement de l'huître et formation de la lignée germinale

Le cycle de développement de *Crassostrea gigas* peut être classiquement découpé en quatre étapes : développement embryonnaire, développement larvaire, croissance juvénile et stade adulte (Figure 3).

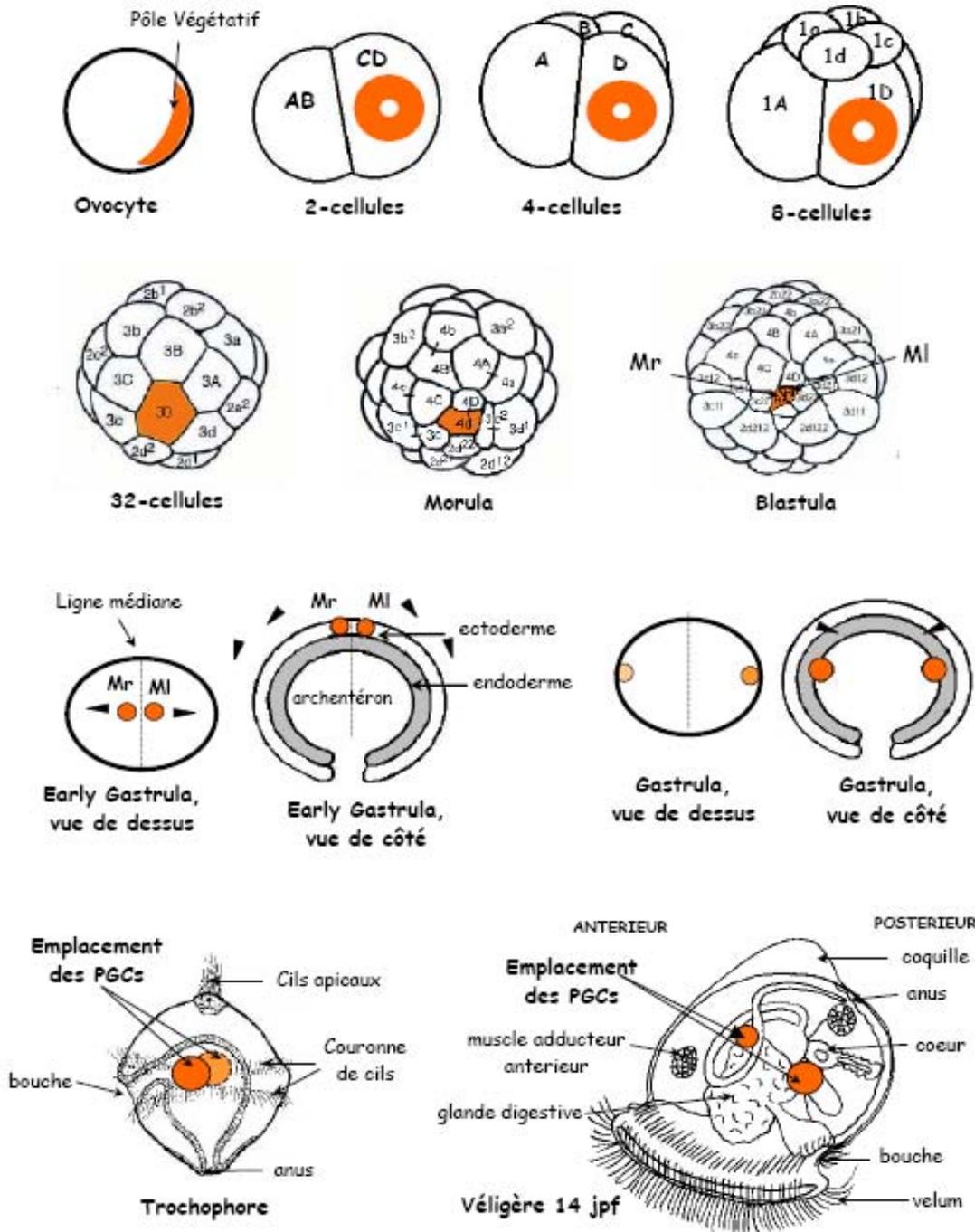
La fécondation des ovocytes bloqués en prophase de méiose est externe. L'œuf qui en résulte présente une segmentation holoblastique de type spiral dont les plans de divisions sont obliques par rapport à l'axe pôle animal-pôle végétatif. Cette succession de mitoses conduit aux stades de morula, 3 heures après la fécondation (3 hpf), de blastula (5 hpf), de gastrula (7 hpf) puis l'éclosion donne la larve trochophore (16-24 hpf). Les différents stades de la larve véligères sont successivement la larve D (24-48 hpf), à umbo sept jours après la fécondation (7 jpf) et oeuillée (14 jpf). Au stade de la larve pédivéligère (14-20 jpf) le développement du pied permet la fixation au substrat puis est suivi de la métamorphose au cours de laquelle est mis en place le plan d'organisation des huîtres juvéniles, le naissain (30 jpf).

La caractérisation d'un orthologue de *vasa* (*Oyvgl*) chez l'huître creuse (Fabioux *et al.*, 2004 a, b) a permis de disposer d'un marqueur spécifique des cellules germinales primordiales (CGPs) (Figure 4). Au cours du développement, l'ARNm *Oyvgl* d'origine maternelle est initialement localisé au niveau du pôle végétatif des ovocytes puis se retrouve uniquement dans l'un des deux blastomères du stade 2-cellules qui pourrait correspondre à un cytoplasme germinatif (Fabioux *et al.*, 2004 b). Les cellules germinales primordiales apparaissent au cours de la gastrulation puis, au cours du développement larvaire, elles migrent le long de la masse viscérale en formation pour se situer de part et d'autre de la glande digestive de la larve véligère à umbo jusqu'à la larve métamorphosée, ce qui correspond à l'emplacement de la future gonade (Fabioux *et al.*, 2004 b). A partir de ces deux zones situées d'une part entre le muscle adducteur antérieur et la glande digestive et, d'autre part, entre le cœur et la glande digestive, les CGPs se différencient en cellules germinales souches (CGSs) chez les juvéniles. Les CGSs entreraient dans une phase de prolifération intense pour former deux groupes de tubules gonadiques qui se développeraient au sein du tissu conjonctif vers la partie antérieure de l'huître, formant ainsi, en se ramifiant un réseau complexe entourant la glande digestive.



**Figure 3 : Cycle de développement de *Crassostrea gigas* à 25°C.**

(Photos D. Goux, AS Martinez).



**Figure 4 :** Ontogénèse de la lignée germinale de *Crassostrea gigas*. (d'après Fabioux *et al.* 2004b)

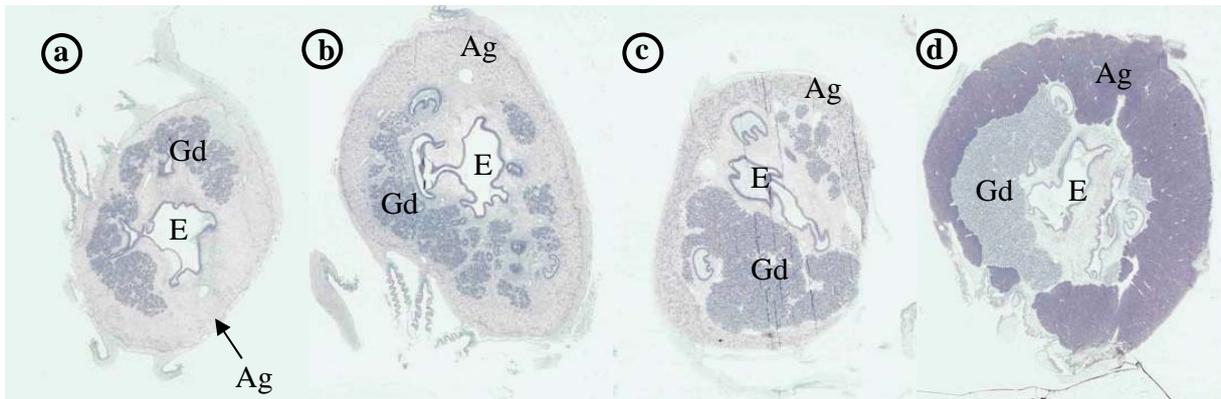
Les zones oranges représentent la localisation des déterminants supposés de la lignée germinale au stade embryonnaire : les CGPs (cellules germinales primordiales) à partir de la larve trochophore, les CGS (cellule germinales souches) et les cellules germinales formant la gonade au stade juvénile et adulte. Les pointes de flèches noires représentent le sens de migration des cellules.

## **4.2. Développement de la gonade et cycle de reproduction de l'huître adulte**

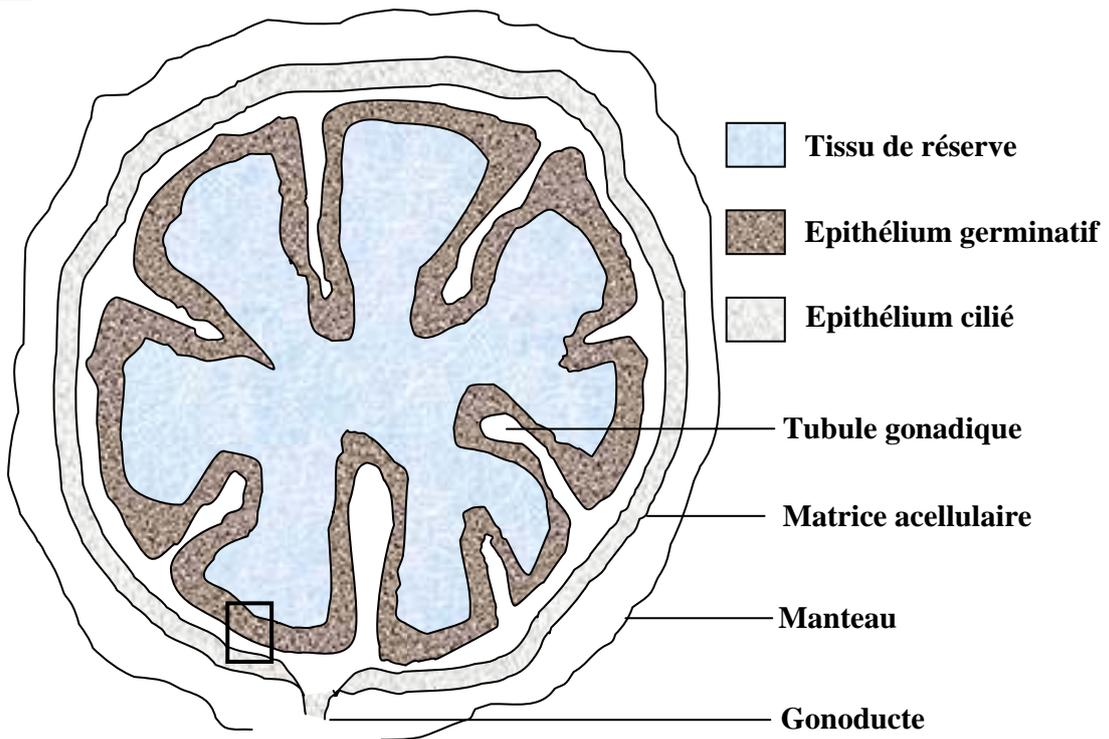
La première maturité sexuelle a lieu dès la première année de la vie de l'huître entre 3 et 10 mois d'âge selon les conditions de culture et les individus. La gonade est un organe non permanent qui se développe à chaque cycle de reproduction (Figure 5A). Après la ponte, les tubules gonadiques régressent et les cellules germinales qui n'ont pas été évacuées sont résorbées par phagocytoses par des hémocytes infiltrés. Pendant la période de repos sexuel, un petit nombre de CGSs persiste dans les tubules gonadiques résiduels qui apparaissent dispersés dans le tissu conjonctif vésiculeux. Ces CGSs prolifèrent de nouveau lors de l'initiation du cycle de reproduction suivant et les nouveaux tubules gonadiques se développent à partir des tubules résiduels pour constituer la nouvelle gonade (Fabioux *et al.*, 2004 a). Lors de cette phase de maturation, le développement de la gonade est tel, qu'elle devient l'organe le plus volumineux de l'animal (Galtsoff, 1964). Le développement du tissu conjonctif vésiculeux, quant à lui, est inversement corrélé à la progression de la gamétogenèse (Berthelin *et al.*, 2000a) (Figure 5A, B). En effet, lors de la reprise d'une gamétogenèse active, les réserves énergétiques constituées principalement de glycogène, seront mobilisées afin de soutenir l'effort reproducteur de l'animal et permettre ainsi le développement des tubules gonadiques et la formation des gamètes (Li *et al.*, 2000).

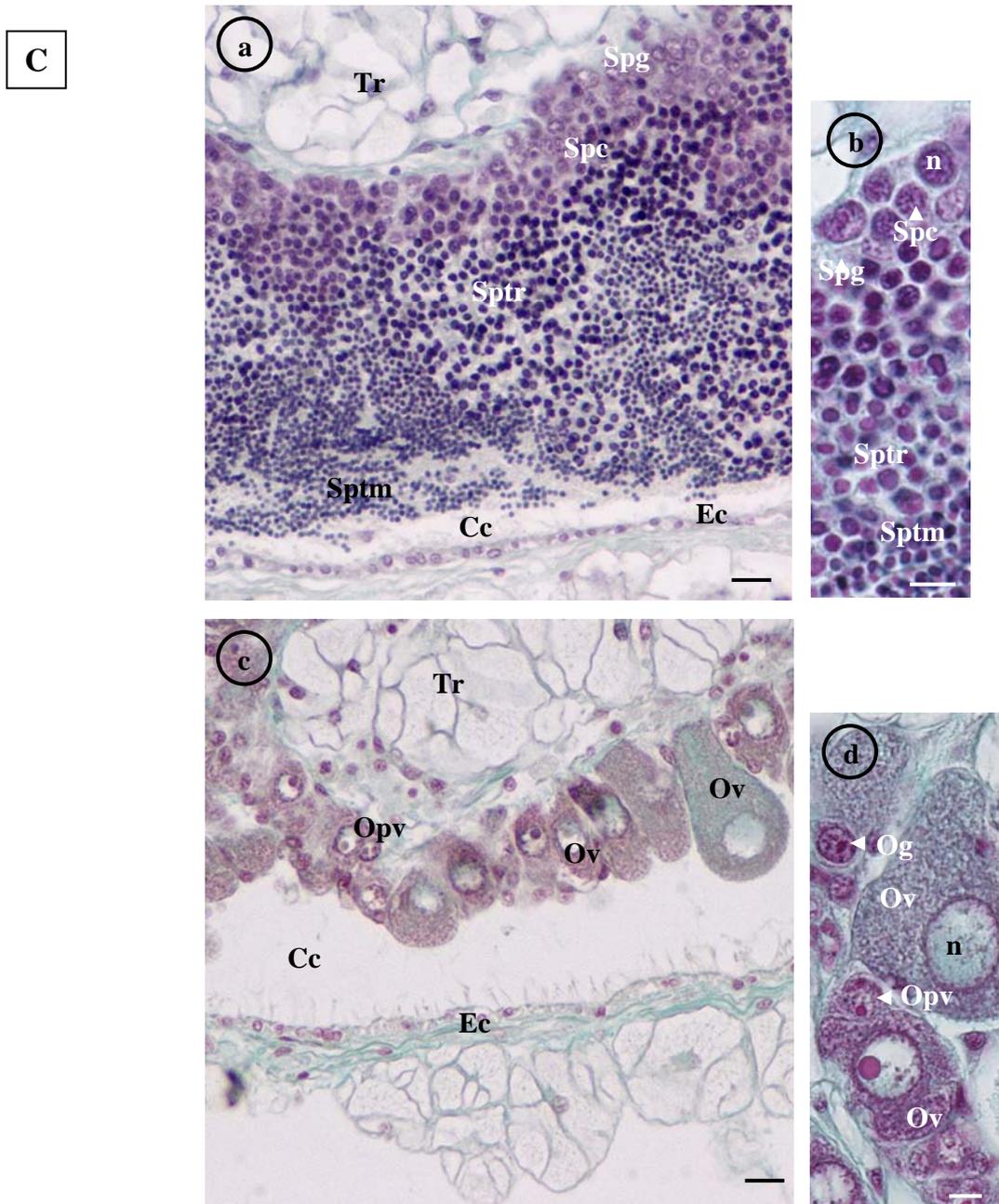
La gonade, bien que délimitée par une matrice acellulaire, ne constitue pas un tissu individualisé mais se présente sous forme de tubules gonadiques s'invaginant dans le tissu de réserve, ou tissu conjonctif vésiculeux, pour former un tissu mixte (Figure 5B). Les tubules gonadiques périphériques localisés à proximité du manteau présentent une organisation différente de ceux qui sont plus interne et qui présentent un épithélium germinatif sur l'ensemble de leurs faces. En effet, ces tubules périphériques présentent une face constituée d'un épithélium germinatif, où la gamétogenèse est centripète et une face opposée, orientée vers le manteau composée d'un épithélium cilié en contact avec la matrice acellulaire (Figure 5C). Ces tubules gonadiques forment les canaux évacuateurs des gamètes qui débouchent dans la cavité palléale par le gonoducte.

**A**



**B**





**Figure 5:** Aire gonadique de *Crassostrea gigas* (Photos AS Martinez)

**A:** Coupes histologiques d'huîtres à divers stades de développement gonadique [stade 0 (a), stade I (b), stade II (c), stade III (d)] mettant en évidence la surface de l'aire gonadique. Ag: aire gonadique; E: estomac; Gd: glande digestive.

**B:** Dessin de l'aire gonadique de l'huître formée par du tissu de réserve, des tubules gonadiques, des canaux collecteurs et un gonoducte. Le carré noir correspond aux canaux collecteurs illustrés en histologie en C.

**C:** Canaux collecteurs limités d'un côté par un épithélium cilié et contenant des cellules germinales à divers stades de maturation, chez des individus matures en stade III mâle (a et b) et femelle (c et d). Cc: canal collecteur; Ec: epithelium cilié; n: noyau; Og: ovogonie; Opv: ovocyte en pré-vitellogenèse; Ov: ovocyte en vitellogenèse; Spg: spermatogonie; Spc: spermatocyte; Sptr: spermatide ronde; Sptm: spermatide mature; Tr: tissu de réserve. Barres d'échelle: 10  $\mu$ m (a et c), 5  $\mu$ m (b et d).

Le cycle de reproduction annuel de l'huître peut être défini en quatre stades principaux selon la classification établie par Lubet (1959) chez *Mytilus edulis* et reprise pour l'huître par Berthelin *et al.* (2000b) et qui sont les suivants (Figure 6) :

**-Stade 0 :** ce stade dit de repos sexuel se déroule en automne et jusqu'au début de l'hiver. Les tubules gonadiques sont alors peu volumineux et ne présentent que quelques cellules germinales souches. Durant cette phase le sexe n'est pas identifiable et le tissu conjonctif vésiculeux est très développé.

**-Stade I :** lors de ce stade qui se déroule de l'hiver jusqu'au début du printemps, les cellules germinales souches prolifèrent et se différencient en spermatogonies ou en ovogonies. Chez les mâles deux types de spermatogonies sont distinguables, les spermatogonies de type I, avec un noyau central clair de grande taille ( $5,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ), et les spermatogonies de type II, présentant un noyau plus sombre et plus petit ( $4,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) (Franco *et al.*, 2008). Chez les femelles, les ovogonies présentent un noyau de grande taille et un nucléole bien visible. Les tubules gonadiques commencent à se développer mais demeurent de petite taille. Le tissu conjonctif vésiculeux est encore largement développé.

**-Stade II :** le rythme de la gamétogenèse s'accélère. Lors de ce stade qui se déroule au printemps, les tubules gonadiques se développent fortement, les cellules germinales sont en maturation et le tissu conjonctif vésiculeux est en régression. Chez le mâle, les différents types cellulaires de la spermatogenèse sont observables : les spermatozoïdes primaires au stade pachytène présentant un noyau d'un diamètre de  $3,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , les spermatozoïdes primaires au stade diplotène ( $3,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ), les spermatozoïdes secondaires ainsi que les jeunes spermatides ( $1,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ) (Franco *et al.*, 2008). Des spermatozoïdes matures sont également observées à ce stade. Chez la femelle, les ovogonies se sont différenciées en ovocytes primaires qui restent bloqués en prophase I de méiose. Ces ovocytes entrent ensuite en vitellogenèse, ce qui se traduit par une augmentation du volume de leur cytoplasme dû à l'accumulation de protéines, de lipides et d'ARN (Li *et al.*, 2000 ; Heude-Berthelin *et al.*, 2001) d'où l'observation de différentes tailles d'ovocytes ( $12-41 \mu\text{m}$ ) (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Leur maturation serait soutenue par les réserves du tissu conjonctif vésiculeux et les cellules folliculaires, lieu probable de synthèse de la vitellogénine (Matsumoto *et al.*, 2003).

**-Stade III :** ce stade est divisé en 3 phases.

Le stade IIIA correspond à la période de maturité sexuelle atteinte à la fin du printemps-début de l'été. La gonade présente alors son volume maximal. Les tubules gonadiques sont constitués presque exclusivement de cellules germinales matures à savoir des spermatozoïdes chez le mâle et des ovocytes matures pédonculés en forme de poire (vitellogéniques) chez la

femelle. Des spermatogonies ou des ovogonies sont cependant encore présentes. Le tissu conjonctif vésiculeux a régressé.

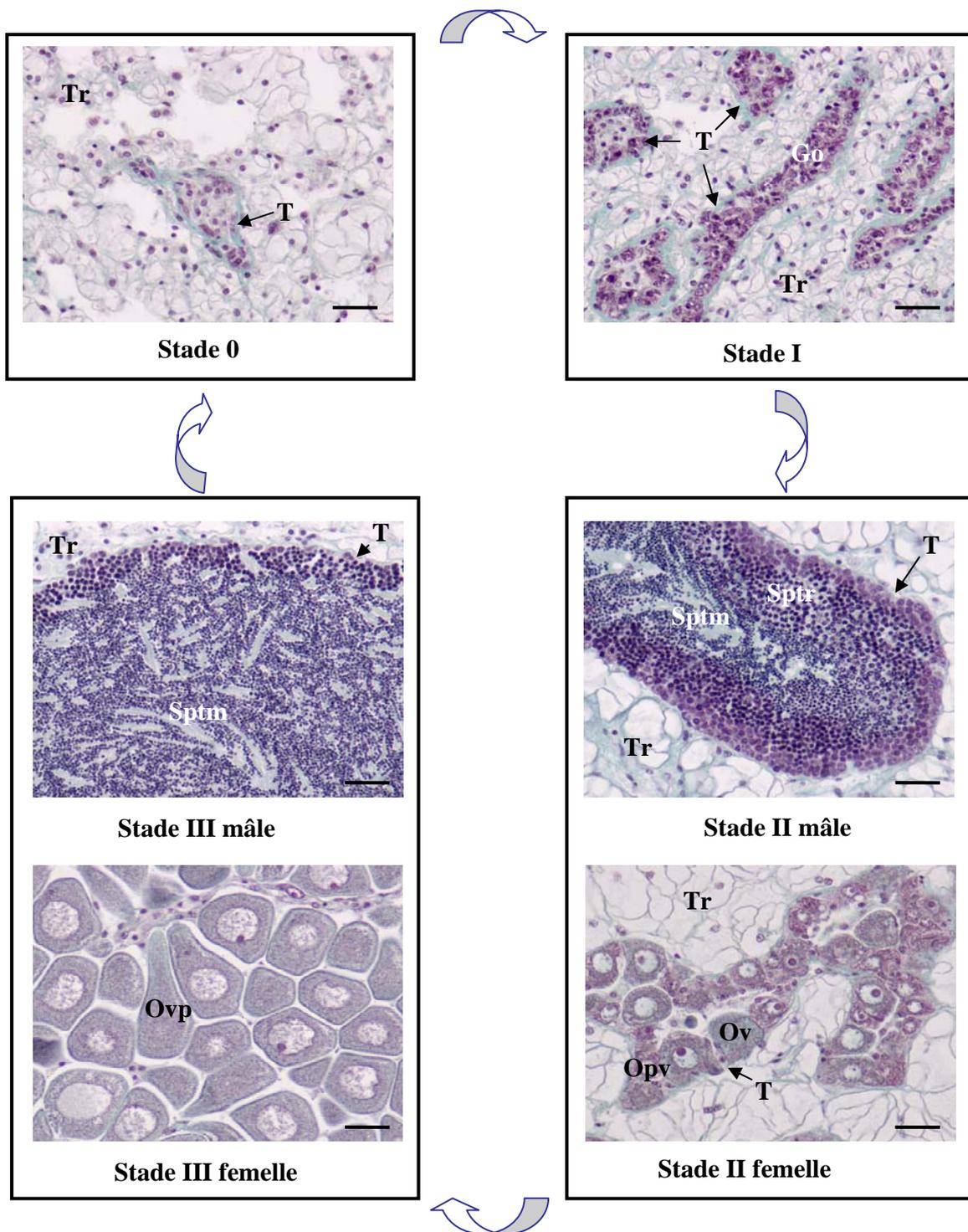
Le stade IIIB est le stade de ponte qui peut être partielle ou complète. Il se déroule lors de la saison estivale.

Le stade IIIC est défini pour les animaux qui ré-initient une nouvelle gamétogenèse aboutissant à une nouvelle émission de gamètes.

Le stade IIID est observable lorsque la ponte est partielle. Ainsi, les gamètes résiduels sont lysés par des hémocytes qui envahissent alors la gonade. L'énergie issue de cette résorption des gamètes pourrait être réinvestie dans le métabolisme de base de l'huître.

Une nouvelle période de repos sexuel (stade 0) permettra la reconstitution des réserves énergétiques nécessaires au déroulement du prochain cycle de reproduction.

La chronologie de ces phases et les performances de reproduction de *C. gigas* seraient influencées par les paramètres environnementaux trophiques tels que les efflorescences phytoplanctoniques saisonnières, la température et la photopériode. Ainsi les huîtres élevées dans différentes stations géographiques ne présentent pas la même proportion d'ovocytes matures que ce soit au début ou à la fin du cycle de reproduction (Lango-Reynoso *et al.*, 2000 ; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b). Le conditionnement d'huîtres à différentes températures montre une accélération du cycle gamétogénétique aux températures élevées avec l'obtention d'ovocytes matures après 27 jours à 16°C, 23 jours à 19°C et 19 jours à 22°C (Chavez-Villalba *et al.*, 2002b). Le même résultat est obtenu en accélérant le cycle annuel de température et de photopériode. En effet, un transfert d'huîtres des conditions hivernales (8,5°C et 8 heures de luminosité) en octobre à des conditions printanières (17,5°C et 16 heures de luminosité) dès janvier a permis l'obtention d'un pourcentage significativement plus élevé d'ovocytes en développement et matures que chez des huîtres restées en conditions naturelles (Chavez-Villalba *et al.*, 2002a). Ainsi durant le stade I hivernal, la gamétogenèse et plus particulièrement la maturation des ovocytes est stimulée grâce au retour de conditions environnementales propices au développement gonadique tel que des températures élevées. Par contre, le pré-conditionnement des huîtres à des basses températures permettrait la reprise des mitoses goniales et par conséquent, une accélération de la gamétogenèse (Chavez-Villalba *et al.*, 2002a et b ; Fabioux *et al.*, 2005).



**Figure 6: Cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* adulte** (Photos AS Martinez).

Stade 0 de repos sexuel; Stade I de prolifération des gonies; Stade II de différenciation des gamètes et Stade III de maturité sexuelle.

Ovp: ovocyte en pré-vitellogenèse; Ov: ovocyte en vitellogenèse; Ovp: ovocyte vitellogénique pédonculé; Sptr: spermatozoaire rond; Sptm: spermatozoaire mature; T: tubule gonadique; Tr: tissu de réserve. Barre d'échelle: 20  $\mu$ m.

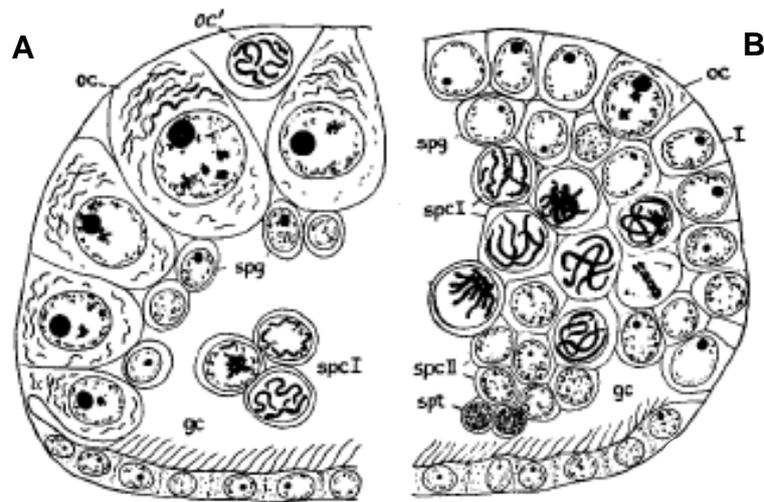
## II. Déterminisme du sexe chez l'huître et données génétiques

Plusieurs espèces d'huîtres du genre *Ostrea* et *Crassostrea* sont des hermaphrodites successifs protandres, passant généralement du sexe mâle à femelle. Certaines, comme *O. edulis* et *O. lurida*, présentent, au cours de leur vie et parfois même lors d'un même cycle annuel, une succession de plusieurs phases mâles et femelles suivant un rythme défini (Galtsoff, 1964). Un hermaphrodisme simultané avec une fréquence relativement faible de 2,9% pour *O. cucullata*, 0,8% pour *C. gigas* et 1% pour *C. virginica* est parfois également observé (Galtsoff, 1964, Steele et Mulcahy, 1999). Cependant chez cette dernière, la gonade aux premiers stades de développement à l'âge de 12 à 16 semaines est bisexuelle, présentant dans les mêmes follicules des ovogonies et des spermatogonies avec une prédominance des cellules germinales mâles ou femelles (Figure 7). Chez cette espèce, la protandrie est plus marquée; la gonade se développe essentiellement dans le sens mâle sauf si la spermatogenèse est inhibée induisant alors une formation d'ovocytes dès les premiers stades (Galtsoff, 1964).

*C. gigas* est une espèce hermaphrodite successive de type protandre irrégulière (Guo *et al.*, 1998); elle est majoritairement mâle lors de la première saison de reproduction puis change de sexe de façon irrégulière. Les facteurs environnementaux et génétiques qui déterminent la première différenciation sexuelle, chez les juvéniles, et ceux impliqués dans les changements sexuels de l'adulte restent inconnus. L'absence d'hétérochromosomes différenciables et la variation du *sexe-ratio* au cours des cycles de reproduction sont des handicaps à la compréhension du déterminisme sexuel. Cependant, des études de croisements contrôlés ont montré que le *sexe-ratio* serait déterminé par le père (Guo *et al.*, 1998), ce qui suggère un contrôle génétique du sexe chez l'huître. L'hypothèse présentée par Guo *et al.* (1998) (Figure 8) est basée sur un déterminisme à un locus avec un allèle mâle dominant (M) et un allèle femelle protandrique (F). Il existerait deux populations de mâles : de vrais mâles (MF) ne changeant pas de sexe et des mâles (FF) pouvant évoluer en femelles sous le contrôle de gènes secondaires ou de facteurs environnementaux. Par ailleurs, un déterminisme sexuel multigénique pourrait également être supposé. En effet, un *sexe-ratio* de 25-30% et de 27-44% de femelle est observé respectivement pour les huîtres triploïdes chimiques et naturelles alors que la redondance du matériel génétique provient soit de la mère soit du père selon la technique utilisée (Eudeline, 2004). De même les huîtres tétraploïdes présentent un *sexe-ratio* proche de 1.1 (Guo et Allen, 1997). Ces résultats sont différents de ceux observés chez d'autres Mollusques comme par exemple pour la mye (*Mya arenaria*) dont les triploïdes sont

femelles (77% ayant un développement femelle complet, 16% ayant un développement femelle partiel et 6% sans différenciation sexuelle), ce qui suggère que chez cette espèce le déterminisme du sexe dépendrait du rapport entre les chromosomes X et les autosomes (Allen *et al.*, 1986). Chez le Bivalve *Mulinia lateralis* le *sexe-ratio* est équilibré chez les diploïdes et chez les triploïdes (Danton, 1996). Ces résultats sont également constatés par Guo et Allen (1994) qui montrent que les populations gynogénétiques diploïdes de cette espèce sont strictement femelles et qui proposent un déterminisme génétique du sexe sur le modèle XX (femelle) et XY (mâle). Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis*, dont les triploïdes sont presque 100% mâles, un modèle de déterminisme ZW ou ZO a été proposé (Kiyomoto *et al.*, 1996 ; Brake *et al.*, 2004). Cependant, l'absence de marqueurs génétiques identifiés et le manque d'informations sur la période précise du déterminisme ne permettent pas d'évaluer l'influence des facteurs environnementaux sur la différenciation sexuelle chez les Mollusques. Le développement récent de la cartographie des gènes, par *AFLP*, chez *C. virginica* et *C. gigas* (Yu et Guo, 2003, 2004; Li et Guo, 2004) devrait néanmoins contribuer à l'identification de marqueurs chromosomiques nécessaires à la mise en évidence du sexe génétique. L'avancée du séquençage du génome de l'huître (0,91 pg ou 842,51 Mb) (González-Tizón *et al.*, 2000) permet également de mettre en évidence des gènes spécifiques de la reproduction avec des différences d'expression selon le sexe (Boutet *et al.*, 2008).

Néanmoins, trois facteurs qui interviendraient lors de l'ovogenèse chez *C. gigas* ont été identifiés : l'œstradiol-17 $\beta$ , la vitellogénine et un récepteur aux œstrogènes. L'œstradiol-17 $\beta$  qui régule l'expression de la vitellogénine a été détecté au niveau des ovaires. Sa concentration augmente avec le développement gonadique et diminue lors de la ponte (Matsumoto *et al.*, 1997). Le gène de la vitellogénine montre une expression spécifique dans les cellules folliculaires des ovaires (Matsumoto *et al.*, 2003), comme c'est le cas pour le récepteur nucléaire aux oestrogènes également présent dans les ovocytes (Matsumoto *et al.*, 2007).



**Figure 7 : Schéma de deux portions de follicules bisexuels chez *C. virginica* de 4 mois d'âge.**

A : prédominance femelle et B : prédominance mâle. gc : canal génital tapissé par des cellules ciliées ; oc : ovocyte ; oc' : jeune ovocyte ; spcI : spermatocytes primaires ; spcII : spermatocytes secondaires ; spt : spermatozoïdes (Galtsoff, 1964).

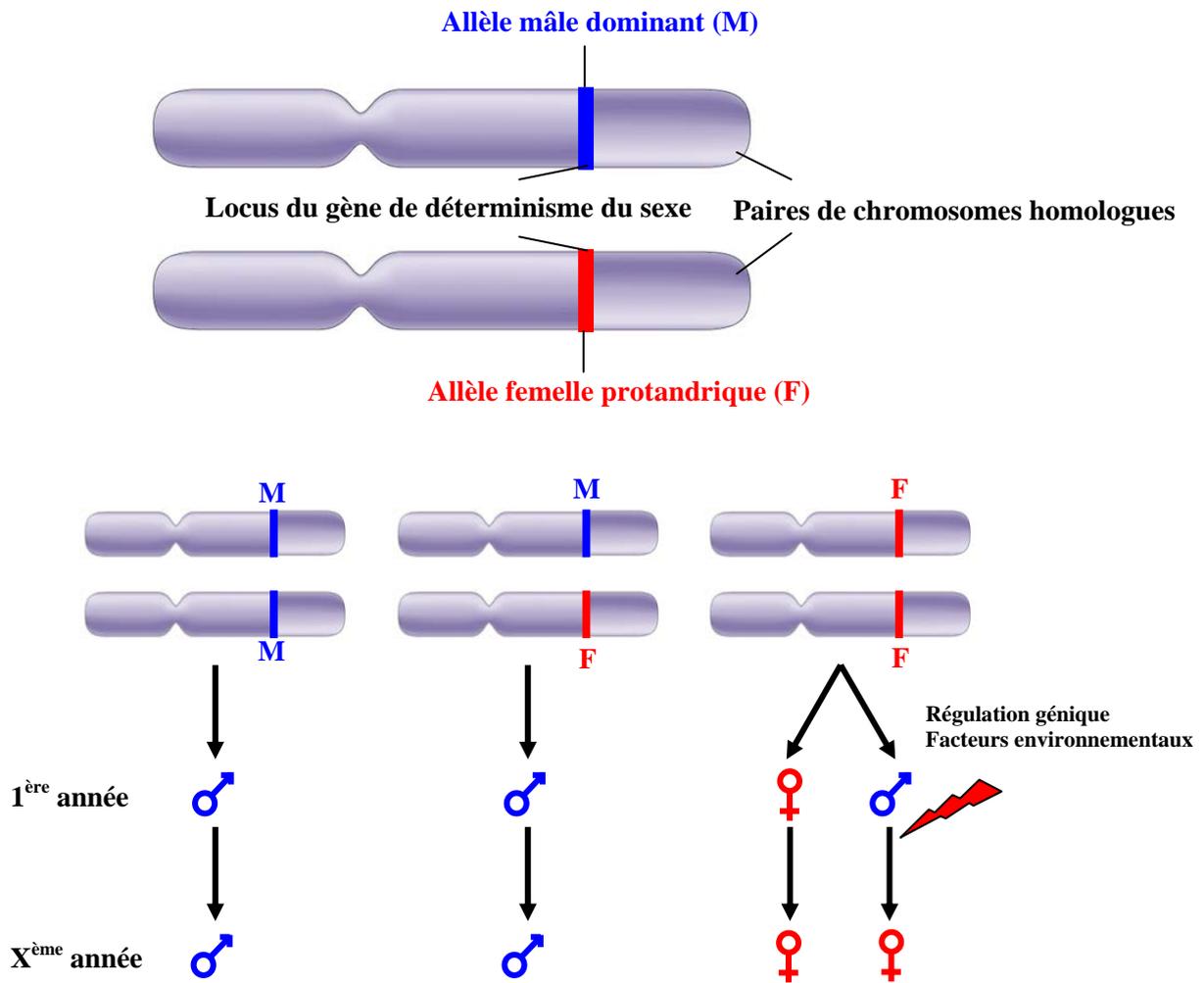


Figure 8 : Hypothèse de déterminisme sexuel chez l’huître creuse *C. gigas* d’après les travaux de Guo *et al.*, 1998.

### III. Les différents modes de déterminisme sexuel dans le règne animal

Le déterminisme du sexe correspond à la période critique où l'expression d'un facteur moléculaire (déterminant moléculaire) provoque la différenciation de la gonade indifférenciée dans le sens mâle ou femelle. Elle précède la différenciation sexuelle qui comprend l'ensemble des processus contribuant à la mise en place de l'appareil génital et à l'établissement de son dimorphisme sexuel. Les mécanismes du déterminisme du sexe, ou différenciation gonadique, diffèrent non seulement selon les phyla mais aussi au niveau d'un même phylum. Cela pourrait être lié à une évolution rapide des gènes impliqués dans le déterminisme sexuel (Matsushita *et al.*, 2007).

Les Métazoaires présentent deux mécanismes fondamentaux du déterminisme du sexe : le déterminisme génétique et le déterminisme environnemental. Le déterminisme génétique peut être subdivisé de la façon suivante : i) le déterminisme chromosomique lié à la présence d'hétérochromosomes avec par exemples une hétérogamétie femelle chez les Oiseaux et mâle chez les Mammifères ; ii) le déterminisme « dose-dépendant » en fonction du rapport du nombre de chromosomes X sur le nombre d'autosomes par exemple chez la drosophile et le nématode ; iii) le déterminisme à un locus complémentaire retrouvé chez les Hyménoptères. Le déterminisme environnemental serait majoritairement sous action de la température comme c'est le cas chez certains reptiles ou poissons.

Les limites entre le déterminisme génétique et le déterminisme environnemental du sexe ne sont pas toujours très franches. En effet, certaines espèces présentent un déterminisme génétique du sexe avec un effet environnemental de la température qui induit une mortalité différentielle, une résorption, un avortement ou un changement de sexe des embryons, et donc un changement du *sexe-ratio* initialement établi après la fécondation (Valenzuela *et al.*, 2003).

Quel que soit le type de déterminisme sexuel, une cascade moléculaire d'activation ou d'inhibition de gènes est mise en jeu comprenant des facteurs de maturation d'ARNm et des facteurs transcriptionnels. Selon leur activation ou répression, les gènes situés en aval de cette cascade orientent la différenciation gonadique dans le sens mâle ou femelle.

## 1. Le déterminisme chromosomique du sexe

Le déterminisme chromosomique du sexe (CSD) est basé sur l'existence de gènes portés par les chromosomes sexuels et qui déterminent le sexe de l'individu. Chez les Mammifères, le système est appelé XX/XY et est basé sur une hétérogamétie des mâles alors que chez les Oiseaux le système est appelé ZZ/ZW et est basé sur une hétérogamétie des femelles.

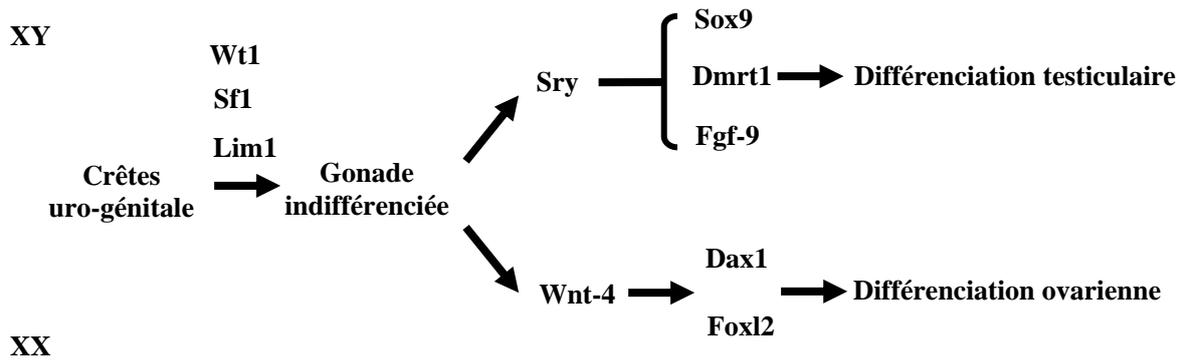
### 1.1 L'hétérogamétie mâle

#### 1.1.1 Cas des Mammifères

Le déterminisme du sexe chez les Mammifères dépend de l'expression du gène *Sry* (*sex-determining region on Y chromosome*) porté par le chromosome Y (Figure 9) (Koopman *et al.*, 1991). *Sry* est le premier facteur identifié de la famille SOX dont les membres présentent un domaine HMG conservé avec 71 à 97% d'identité (Waters *et al.*, 2007). Une délétion ou des mutations de *Sry* entraînent une différenciation femelle de mâles génétiques (Sinclair *et al.*, 1990). L'expression transgénique de *Sry* chez des souris génétiquement femelles induit un développement testiculaire (Koopman *et al.*, 1991). *Sry* est exprimé transitoirement entre 10,5 et 12,5 jpc au niveau des cellules pré-sertoliennes. Ces cellules qui seraient issues de l'épithélium coelomique, prolifèrent et migrent vers les crêtes génitales au moment où la future gonade commence à exprimer *Sry*. La surexpression de ce facteur à 11,5 jpc induit également la migration des cellules précurseurs des cellules myoïdes, endothéliales et interstitielles vers la gonade à partir du mésonéphros. Les cellules germinales quant à elles, migrent vers la gonade indépendamment de l'expression de *Sry* et n'interviennent pas lors de la formation testiculaire. A 12,5 jpc, le testicule présente une morphologie bien distincte avec la formation des cordons testiculaires (McClive *et al.*, 2003). Un autre facteur de cette famille intervenant lors de différenciation testiculaire est *Sox9* (*SRY-like HMG box 9*). Les individus XY présentant une mutation de *Sox9* ont une différenciation sexuelle femelle et l'expression transgénique de ce facteur est suffisante pour permettre une différenciation mâle de femelles génétiques (Kanai *et al.*, 2005). L'un des gènes cibles de *Sox9* est celui codant l'*Amh* (*hormone anti-müllérienne*), responsable de la régression du canal de Müller. Un autre déterminant important de la différenciation testiculaire régulé par *Sry* est le facteur de

croissance *Fgf9* (*fibroblast growth factor 9*) qui stimule la prolifération mésenchymateuse, la migration cellulaire et la différenciation des cellules de Sertoli (Kim *et al.*, 2006). L'expression de *Sry* chez le mâle permet l'activation d'une cascade moléculaire mettant en jeu différents acteurs moléculaires tels que *Wt1* (*Wilms tumour 1*), *Sf1* (*steroidogenic factor 1*), *Gata4*, *Dhh* (*desert hedgehog*), *Sox9* et *Dmrt1* (Ferguson-Smith, 2007).

Chez la femelle, aucun facteur du déterminisme n'a été identifié. Trois critères sont essentiels pour définir ce facteur : i) une expression spatio-temporelle en accord avec la différenciation ovarienne ; ii) les expériences de gains de fonction doivent induire une différenciation sexuelle femelle des individus XY ; iii) les expériences de pertes de fonction doivent induire la différenciation sexuelle mâle des individus XX. D'après certaines données génétiques et selon leurs profils d'expression, plusieurs gènes candidats ont été désignés tels que *FoxL2* (*forkhead box L2*), *Dax1* (*dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital-critical region of the X chromosome gene 1*) et *Wnt4* (*wingless-related MMTV integration site 4*) (Wilhelm, 2007). L'expression de *Wnt4* et de *Dax1* réprime l'expression des gènes de la différenciation mâle d'où une différenciation femelle avec notamment une augmentation de l'expression du gène de l'aromatase *Cyp19*.



**Figure 9 : Cascade simplifiée du déterminisme du sexe chez les Mammifères.** [modifiée d'après Cotinot *et al.* (2002), Pannetier *et al.* (2004), Bratus et Slota (2006)].

### 1.1.2 Autres exemples

Chez les autres Vertébrés, le facteur Sry n'est pas retrouvé mais d'autres facteurs se trouvant plus en aval dans la cascade du déterminisme du sexe, comme Sox9 ou Dmrt1, apparaissent conservés avec une expression différentielle selon le sexe (Marin et Baker, 1998 ; Raymond *et al.*, 1998 ; Schartl, 2004b).

Chez les Amphibiens, un déterminisme génétique du sexe est retrouvé chez toutes les espèces étudiées. *Dmrt1*, identifié chez *Rana rugosa* comme étant un gène autosomal, est exprimé tardivement au cours de la différenciation testiculaire au niveau des cellules de Sertoli et des cellules interstitielles du têtard avant la métamorphose. Chez l'adulte, l'expression de *Dmrt1* est retrouvée au niveau du testicule, à la fois au niveau des cellules somatiques et germinales, et est absente au niveau de l'ovaire. Cependant, *Dmrt1* est exprimé dans les gonades des individus XX lors de la réversion sexuelle induite par la testostérone (Shibata *et al.*, 2002 ; Schartl, 2004b ; Matsushita *et al.*, 2007). L'expression tardive de *Dmrt1* suggère un rôle lors de la différenciation testiculaire mais pas nécessairement lors du déterminisme testiculaire. Le facteur Dax1, également identifié chez *Rana rugosa*, est plus exprimé au niveau du testicule que de l'ovaire au cours du développement embryonnaire. Deux mois après la métamorphose, lorsque des cellules post-méiotiques sont observables dans les tubules séminifères, Dax1 présente une expression exclusivement mâle. Lors de la réversion sexuelle des têtards femelles par la testostérone, les transcrits Dax1 diminuent puis augmentent rapidement. Deux autres facteurs intervenant lors de la cascade du déterminisme du sexe chez les Vertébrés, Wt1 et Fgf9 ont été identifiés chez *R. rugosa* et présentent une expression dans les gonades indifférenciées et qui persiste après le déterminisme du sexe mais sans différences entre les mâles et les femelles. Ceci n'exclut pas un rôle de ces facteurs lors de l'initiation de la différenciation ovarienne et/ou testiculaire chez cette espèce (Yamamura *et al.*, 2005). Lors des expériences de réversions sexuelles induites par la testostérone, il est également observé une diminution rapide de l'expression de Cyp19 (P450 aromatasase) sans variation de l'expression de Sf1 (Sugita *et al.*, 2001 ; Kato *et al.*, 2004).

Les poissons présentent une grande diversité des modes de différenciation sexuelle et seuls 10% des Actinoptérygiens possèderaient des chromosomes sexuels. Les poissons dont les génomes sont séquencés, comme le poisson zèbre *Danio rerio*, le poisson-globe *Takifugu rubripes* et le tétraodon *Tetraodon nigroviridis*, ne présentent pas de chromosomes sexuels reconnaissables ni de marqueurs moléculaires du déterminisme du sexe (Schartl, 2004a). Par

contre, chez le medaka *Oryzias latipes*, dont les mâles sont XY, un gène majeur du déterminisme mâle, *Dmrt1bY* (*DMY*), est associé au chromosome Y et correspond à la duplication de *Dmrt1*. *Dmrt1bY* est le premier gène du déterminisme sexuel identifié chez un Vertébré non Mammalien et des mutations de celui-ci conduisent à une différenciation des individus XY en femelles (Matsuda *et al.*, 2002 ; Nanda *et al.*, 2002). La duplication génique qui a conduit à la formation de *Dmrt1bY* est récente au cours de l'évolution et s'est produite il y a approximativement 10 millions d'années. Par conséquent, *Dmrt1bY* est présent seulement chez certaines espèces du genre *Oryzias* et il ne constitue donc pas le gène majeur du déterminisme sexuel chez les poissons (Schultheis *et al.*, 2006).

Chez la mouche domestique, *Musca domestica*, un facteur du déterminisme mâle, le facteur M, est porté par le chromosome Y (Schutt et Nöthiger, 2000). Chez certaines populations, les deux sexes sont XX et les mâles sont hétérozygotes pour le gène masculinisant M qui est dans ce cas porté par un autosome. Chez d'autres populations, les deux sexes sont homozygotes pour M et l'unisexualité est évitée grâce à la présence d'un gène du déterminisme femelle dominant, le facteur F, qui supprime l'effet masculinisant du facteur M (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 1994). Cette apparente diversité des modes du déterminisme sexuel chez une même espèce serait liée à des mutations touchant des gènes de la cascade moléculaire du déterminisme dont les facteurs avals seraient semblables à ceux de la cascade de la drosophile (Hediger *et al.*, 2004). Chez le Diptère *Chrysomya rufifacies*, le sexe est déterminé par la mère et il y a deux types de femelles, celles qui produisent uniquement des femelles et celles qui ne produisent que des mâles. Chez les moustiques du genre *Culex*, *Anopheles* et *Aedes*, un facteur du déterminisme mâle est toujours retrouvé. Ce mécanisme du déterminisme du sexe est largement retrouvé chez d'autres Diptères, suggérant qu'il s'agit d'un type de déterminisme ancestral (Marin et Baker, 1998 ; Saccone *et al.*, 2002).

## 1.2 L'hétérogamétie femelle

### 1.2.1 Cas des Oiseaux

Le deuxième type de déterminisme génétique du sexe est le système hétérogamétique femelle (ZZ/ZW) retrouvé par exemple chez les Oiseaux où le mâle est ZZ et la femelle ZW. Il n'est cependant pas actuellement établi que le gène responsable de la différenciation gonadique soit porté par le chromosome W (déterminisme femelle dominant) ou par le

chromosome Z (déterminisme mâle dosage-dépendant) (Smith et Sinclair, 2004). Le premier gène candidat est *WPKCI* (*W-linked protein kinase C inhibitor*), connu aussi sous les noms de *HINTW* (*histidine triad nucleotide binding protein W-linked*) ou de *ASW* (*Avian Sex-specific W-linked*), qui code une protéine similaire à l'inhibiteur des protéines kinase C. *WPKCI* présente plusieurs copies au niveau du chromosome W et il est fortement exprimé au niveau des ovaires des embryons ZW. Un homologue de ce gène est présent en une seule copie au niveau du chromosome Z (*ZPKCI*) et il est faiblement exprimé dans les embryons des deux sexes. *WPKCI* induirait le développement ovarien en réprimant l'action de *ZPKCI* (Smith et Sinclair, 2001 ; Scharl, 2004a ; Ferguson-Smith, 2007).

Le deuxième candidat est *FET1* (*Female-Expressed Transcript 1*) dont le gène est présent seulement au niveau du chromosome W et qui pourrait donc potentiellement être un déterminant ovarien. *FET1* est fortement exprimé au niveau du système urogénital des femelles avant la différenciation gonadique. Cette expression est plus élevée au niveau de la gonade gauche qui, chez la femelle, se développe en ovaire alors que la gonade droite régresse. La séquence prédite en acides aminés de *FET1* ne correspond à aucun domaine connu qui pourrait induire une fonction. Ces deux facteurs *WPKCI* et *FET1* ne sont présents que chez les Oiseaux (Smith et Sinclair, 2004).

Un troisième candidat qui serait plutôt impliqué dans un déterminisme mâle dosage-dépendant est le gène *Dmrt1* porté par le chromosome Z (Nanda *et al.*, 1999). Un double dosage de *Dmrt1* serait associé au développement testiculaire et un simple dosage au développement ovarien (Ferguson-Smith, 2007).

### 1.2.2 Autres exemples

D'autres espèces telles que tous les serpents étudiés, certains lézards, Amphibiens, poissons et Lépidoptères, présentent une hétérogamétie femelle. *Rana rugosa*, présente selon sa position géographique au Japon, soit une hétérogamétie mâle XY à l'ouest, soit une hétérogamétie femelle ZW au nord-est. Chez cette dernière population, comme pour *Bufo vulgaris* et *Xenopus laevis*, une réversion sexuelle des individus ZZ peut être induite par injection d'estrogènes (Nishioka *et al.*, 1993 ; Iwade *et al.*, 2008). L'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*, qui présente une hétérogamétie femelle ZW, montre également une différenciation sexuelle dépendante de la température puisque des larves femelles ZW

incubées à 32°C se différencient en mâles fonctionnels (Kuntz *et al.*, 2003, 2004). Dans ce cas, la température serait un déterminant secondaire et non primaire.

### 1.3 Le cas de trois chromosomes sexuels

D'autres espèces, exclusivement parmi les Actinoptérygiens, présentent un déterminisme sexuel à trois hétérochromosomes. C'est le cas de l'épinoche *Gasterosteus aculeatus*, du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus*, de plusieurs espèces de salmonidés et de quelques populations naturelles de guppy *Xiphophorus maculatus*. Chez ce dernier, les hétérochromosomes sont X, W et Y. Les femelles présentent les génotypes WY, WX et XX alors que les mâles sont YY ou XY (Veith *et al.*, 2003). *X. maculatus* présente une courte région du chromosome X et Y (Kondo *et al.*, 2002 ; El-Mogharbel *et al.*, 2007) portant des gènes du déterminisme du sexe et qui s'avère très instable, avec des duplications fréquentes, des délétions et des transpositions. Cette instabilité pourrait être liée à la grande variabilité génétique affectant le déterminisme du sexe et d'autres traits liés au sexe chez ce poisson.

## 2. Le déterminisme dose-dépendant

Chez les Invertébrés, différents modes de déterminisme sexuel existent entre les espèces, voire au sein d'une même espèce (Saccone *et al.*, 2002). Chez les deux animaux modèles les mieux étudiés, *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, le déterminisme sexuel est commandé par le rapport du nombre de chromosomes X sur le nombre d'autosomes (*ratio* X/A) (Figures 10 et 11). Chez le nématode et la drosophile, les individus présentant un rapport X/A inférieur à 1 se développent en mâles, alors que le développement en hermaphrodites ou en femelles exige un rapport supérieur ou égal à 1. Selon ce rapport, l'expression ou l'absence d'expression d'un premier gène initie une cascade d'activation moléculaire orientant la différenciation gonadique dans le sens mâle ou femelle.

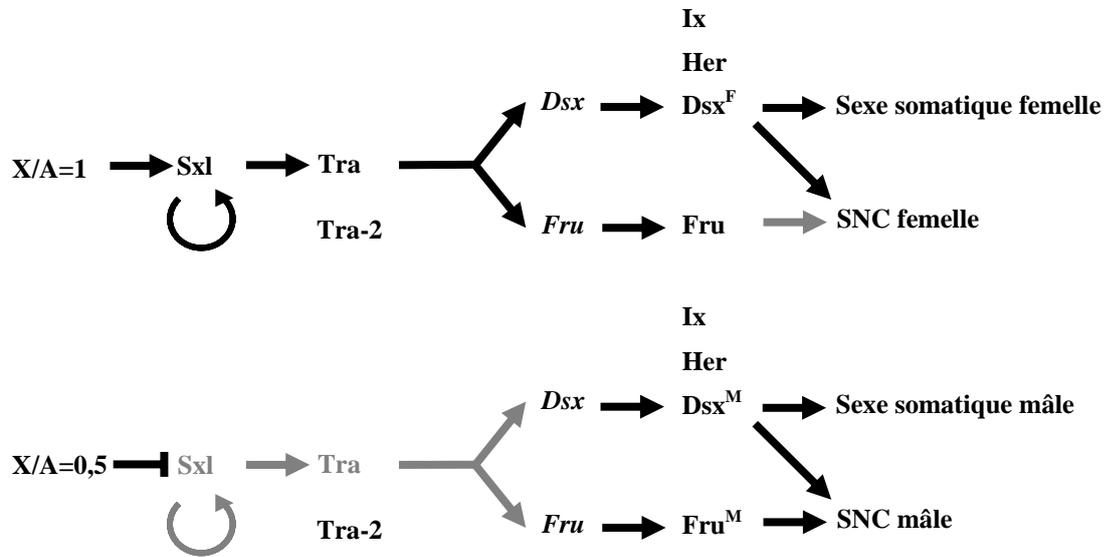
Chez *Drosophila melanogaster* (Figure 10), lorsque le *ratio* X/A est égal à 1, il y a une forte expression du gène *Sxl* (*Sex-Lethal*), qui code une protéine de liaison à l'ARN possédant deux domaines de type RNP (*Ribonucleoprotein*) reconnaissant les séquences riches en uridines. *Sxl* régule l'épissage de son propre transcrit. Le messenger spécifique de la femelle est dépourvu de l'exon 3 contrairement au messenger spécifique du mâle qui possède alors un codon stop prématuré empêchant la traduction d'une protéine *Sxl* active. Chez la femelle, la

protéine Sxl réprime la traduction de *Msl-2* qui est ainsi spécifiquement exprimé chez le mâle. Sxl contrôle également l'épissage de l'ARNpm *tra* (*transformer*) spécifique de la femelle qui code une protéine Tra avec un domaine riche en RS. La protéine de liaison à l'ARN codée par le gène *tra2*, exprimée de façon constitutive, possède un domaine de liaison à l'ARN de type RNP et deux domaines RS. Tra et Tra2 forment un hétérodimère et contrôlent deux voies parallèles du déterminisme du sexe. D'un côté, leur hétérodimère régule l'épissage du pré-messager codant la forme femelle de *dsx* ( $Dsx^F$  *Doublesexe*), d'un autre côté, ils régulent la maturation des pré-messagers codant *fru* (*fruitless*) en ARNm *fru* qui ne sont pas traduits en une protéine femelle spécifique.  $Dsx^F$  interagit avec Her (*hermaphrodite*) et Ix (*intersex*) afin d'activer la différenciation femelle finale et réprimer la différenciation mâle.  $Dsx^F$  régule la différenciation somatique femelle et quelques aspects de la différenciation sexuelle du système nerveux central. Dans le cas d'un rapport X/A égal à 0,5 il n'y a pas de protéine Sxl active d'où l'absence de répression de la traduction du messenger *Msl-2* et un épissage par défaut du pré-messager *Tra* incluant un codant stop dans sa séquence. En l'absence de la protéine Tra, les messagers *Dsx* et *Fru* sont épissés par défaut et codent la forme mâle de la protéine, respectivement  $Dsx^M$  et  $Fru^M$ . Les deux facteurs de transcription activent la différenciation mâle du système nerveux central alors que seul  $Dsx^M$  active la différenciation sexuelle mâle des cellules somatiques (Christiansen *et al.*, 2002 ; Garrett-Engel *et al.*, 2002 ; Lalli *et al.*, 2003 ; Siegal et Baker, 2005 ; Hempel et Oliver, 2007).

Le nématode *C. elegans* (Figure 11) présente deux sexes, des hermaphrodites et des mâles. Les hermaphrodites sont en fait des femelles produisant quelques gamètes mâles durant le stade larvaire et des ovocytes durant la vie adulte alors que les mâles ne produisent que des gamètes mâles. Le déterminisme du sexe chez cette espèce est régulé par une cascade d'inhibition de gènes qui contrôle les niveaux d'expression des gènes liés au chromosome X appelé compensation dosage dépendant tels que Sex-1 (*signal element on X*) qui réprime l'expression de Xol-1 (*Xo lethal*) (Goodwin et Ellis, 2002). Un rapport X/A égal à 1 entraîne une faible production de la protéine Xol-1 et, en fin de cascade, une expression de *Tra-1* qui inhibe le facteur à domaine DM *mab-3*, d'où une différenciation hermaphrodite de l'animal. Dans le cas d'un rapport X/A égal à 0,5, une production importante de la protéine Xol-1 active les gènes spécifiques du mâle via *Mab-3*.

La connaissance de la cascade moléculaire du déterminisme sexuel chez *C. elegans* est également intéressante pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'hermaphroditisme. En effet, les cascades décrites précédemment ont lieu dans le soma et le destin sexuel des cellules germinales chez les hermaphrodites, lors de la spermatogenèse durant les stades

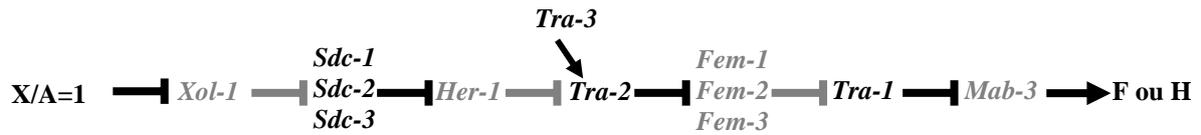
larvaires et l'ovogenèse durant la vie adulte, est contrôlé par les mêmes gènes que ceux qui régulent l'identité sexuelle femelle des cellules somatiques dans tout l'animal. De plus la différenciation des cellules germinales dans le sens mâle ou femelle se fait à partir d'un même pool de cellules. Ainsi, afin de permettre, chez les hermaphrodites, une spermatogenèse précédant l'ovogenèse, la cascade du déterminisme sexuel germinale présente des spécificités (Figure 11). Ainsi, premièrement, *Tra-1* n'est pas le régulateur terminal du destin sexuel des cellules germinales. Chez les mâles et les hermaphrodites, la spermatogenèse est activée par les facteurs *Fog-1*, *Fog-3*, *Fem1*, *Fem2* et *Fem3*. La mutation de l'un de ces gènes induit une différenciation des cellules germinales en ovocytes. Deuxièmement, les trois gènes *fem* agissent avec les gènes cibles de *Tra-1* au niveau des cellules germinales afin d'activer la spermatogenèse, chose qui ne se produit pas dans les cellules somatiques. L'action des protéines Fem passerait par une activation directe de *Fog-1* ou *Fog-3*, ou par une régulation d'un autre facteur non identifié à l'heure actuelle. Troisièmement, une répression post-transcriptionnelle de *Tra-2* est essentielle pour la spermatogenèse chez les hermaphrodites. Elle se ferait grâce à l'interaction de deux facteurs, *Gld-1* et *Fog-2* qui interagiraient avec les séquences 3'UTR des transcrits *Tra-2*. Certaines études suggèrent *Laf-1* comme autre régulateur de la traduction des messagers *tra-2* (Goodwin *et al.*, 1997 ; Ellis et Schedl, 2007). La spermatogenèse chez les hermaphrodites est aussi activée par l'interaction des deux protéines *Tra-2/Tra-1* (Lum *et al.*, 2000). Quatrièmement, l'ovogenèse chez les hermaphrodites exige une répression de la traduction des transcrits *Fem-3*. En effet, ces individus ne sont fertiles que s'ils arrêtent la spermatogenèse et commencent à produire des ovocytes. Cette régulation négative de *Fem-3* se fait sous l'action de *Fbf-1*, *Fbf-2* et *Nos-3* ainsi que des six facteurs *Mog 1-6* (Kuwabara et Perry, 2001 ; Ellis et Schedl, 2007 ; Kelleher *et al.*, 2008). Bien que cette cascade du déterminisme du sexe ainsi que les facteurs contrôlant la différenciation mâles puis femelles des cellules germinales soient bien caractérisés chez *C. elegans*, les mécanismes régulant une spermatogenèse précoce chez les hermaphrodites puis une ovogenèse durant les stades suivant ainsi que ceux induisant ce changement dans le devenir des cellules germinales restent inconnus.

*Drosophila melanogaster*

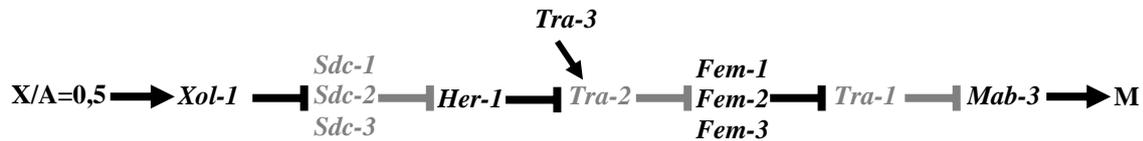
**Figure 10 : Cascade de déterminisme du sexe chez *Drosophila melanogaster*** [modifiée d'après Garrett-Engel *et al.* (2002) ; Siegal et Baket (2005)].

Les voies actives sont en noir alors que celles inactives ou non-fonctionnelles sont en gris.

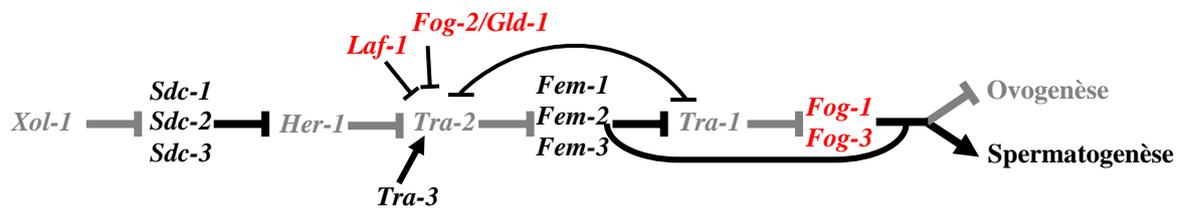
## a. Cellules Somatiques (Hermaphrodites)



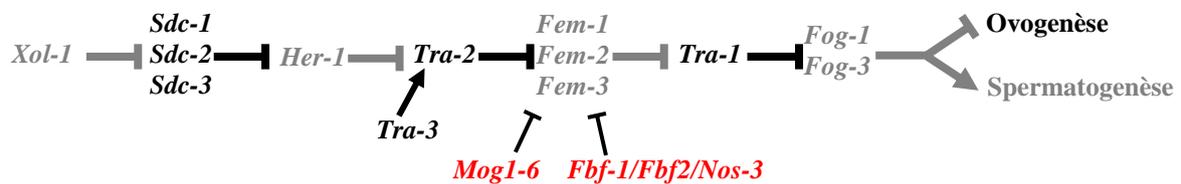
## b. Cellules Somatiques (Mâles)



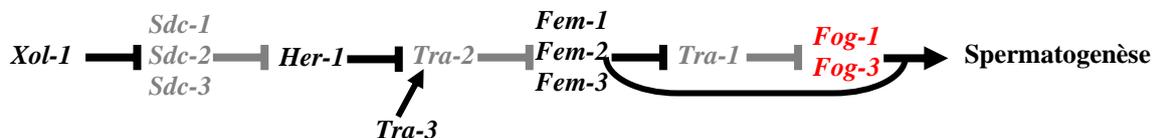
## c. Cellules germinales (Spermatogenèse chez les hermaphrodites)



## d. Cellules germinales (Ovogenèse chez les hermaphrodites)



## e. Cellules germinales (Spermatogenèse chez les mâles)

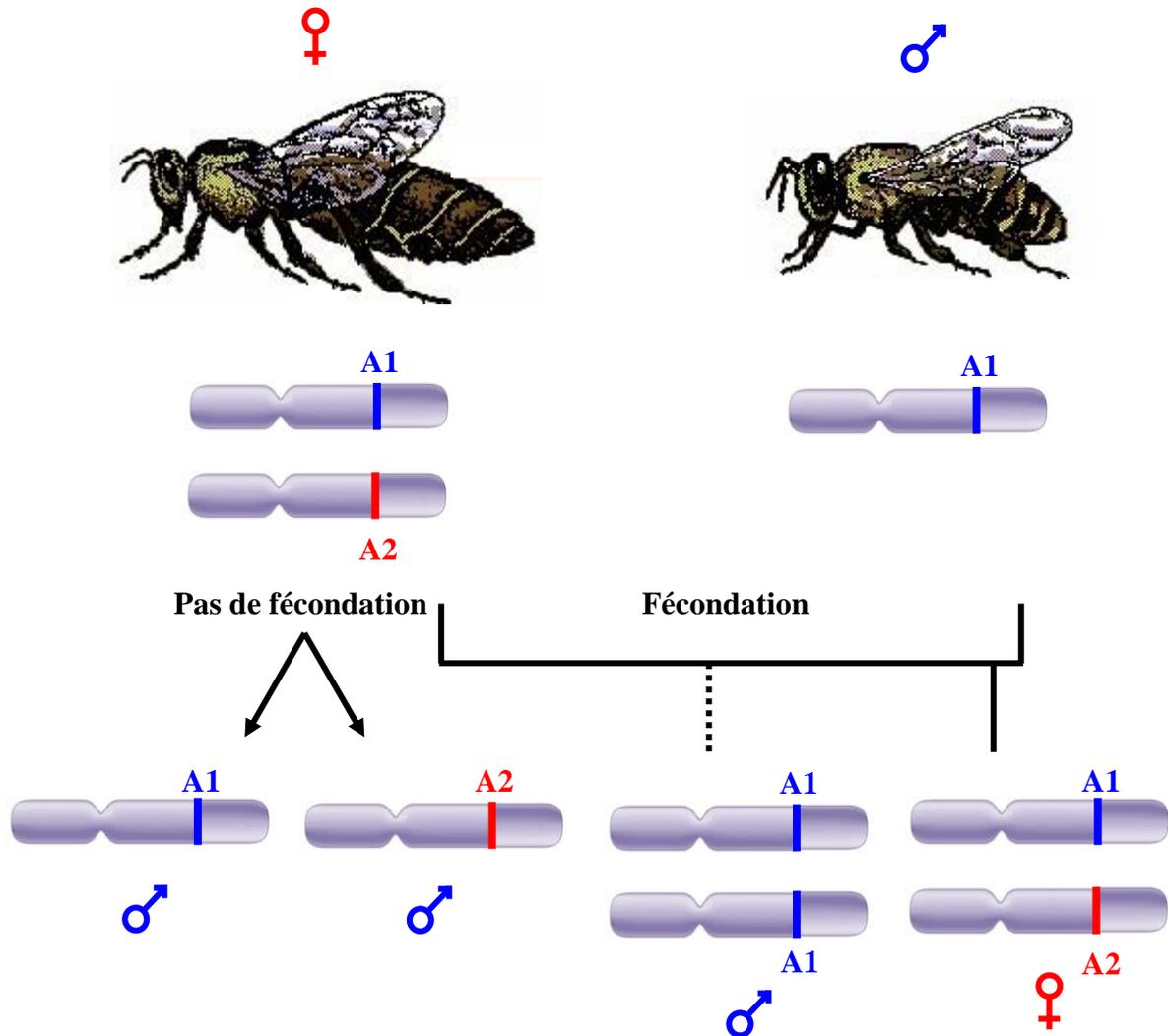


**Figure 11 : Cascades du déterminisme du sexe chez *C. elegans*** [modifiée d'après Ellis et Schedl (2007) ; Kelleher *et al.* (2008)].

Les cascades a et b représentent le déterminisme sexuel somatique chez les hermaphrodites et les mâles respectivement alors que les cascades c, d et e montrent les modifications survenues au niveau des cellules germinales, chez les hermaphrodites (c, d) afin de produire des spermatozoïdes et des ovules et chez les mâles (e). Les facteurs inactivés dans la cascade sont en gris. Les gènes spécifiques du déterminisme du sexe des cellules germinales sont en rouge.

### 3. Le déterminisme à un seul locus complémentaire (Cas des Hyménoptères)

Un des modes importants de déterminisme génétique du sexe chez les Métazoaires est le mode haplo-diploïde présent chez presque 20% des espèces animales incluant plus de 20000 espèces de l'ordre des Hyménoptères. Chez ces derniers, le déterminisme du sexe suit le mode de parthénogenèse arrhénotoque où les œufs, fécondés ou non, peuvent se développer (Heimpel et De Boer, 2008). Ainsi chez les abeilles, les femelles sont diploïdes et se développent à partir d'œufs fécondés, alors que les mâles haploïdes proviennent d'œufs non fécondés. Ce type de déterminisme du sexe, appelé déterminisme à un seul locus complémentaire, dépend de la présence d'un ou de deux allèles du gène *Csd* (*complementary sex determination*) (Figure 12) (Cho *et al.*, 2006 ; Manolakou *et al.*, 2006 ; Hasselman *et al.*, 2008a, b). Les abeilles hétérozygotes pour *Csd* (A1A2) se développent en femelles avec un épissage par défaut vers la forme femelle de *Dsx* (Cho *et al.*, 2007), alors que les homozygotes A1A1 ou hémizygotés A1 se développent en mâles avec l'épissage de la forme mâle de *Dsx*. Cependant, les mâles homozygotes sont stériles et sont mangés par les ouvrières. Quinze allèles différents du gène *Csd* ont été identifiés chez les populations d'abeilles, mais les mécanismes exacts de leurs interactions demeurent inconnus. Le gène *Csd* montre un grand degré de polymorphisme intraspécifique. En effet, l'étude de sa séquence protéique chez trois espèces d'abeilles, *Apis mellifera*, *A. cerana* et *A. dorsata*, montre trois régions hypervariables qui pourraient être associées à des mécanismes différents en fonction de la spécificité de séquence des ces allèles (Cho *et al.*, 2006).



**Figure 12 : Déterminisme du sexe à un seul locus complémentaire lors de la reproduction haplo-diploïde chez les Hyménoptères.**

A1 et A2 représentent deux allèles du gène *Csd* (*complementary sex determination*). Les œufs non fécondés donnent des mâles haploïdes alors que les femelles diploïdes hétérozygotes pour *Csd* (A1A2) se développent à partir d'œufs fécondés. Les mâles homozygotes sont stériles et non viables.

#### 4. Le déterminisme environnemental du sexe

Selon les espèces, le sexe peut être déterminé par plusieurs facteurs environnementaux tels la température. Certains animaux comme le lézard *Amphibolurus muricatus* ou le diptère du genre *Heteropeza* présentent un déterminisme environnemental du sexe dépendant de la température mais aussi de l'état nutritionnel des mères (Saccone *et al.*, 2002 ; Warner *et al.*, 2007). Ainsi, chez le lézard, le conditionnement des femelles soumises à un régime pauvre en nourriture affecte le *sexe-ratio* en produisant plus de mâles (Warner *et al.*, 2007).

On retrouve chez les Insectes un déterminisme environnemental du sexe, comme chez l'espèce subarctique *Aedes stimulans* chez qui les individus génétiquement mâles se développent en femelles aux hautes températures et en mâles aux basses températures (Saccone *et al.*, 2002 ; Graham *et al.*, 2004).

Chez certains Crocodiliens et Chéloniens, la température d'incubation des œufs à des stades précis du développement entraîne une variation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation gonadique; on parle alors de déterminisme du sexe sensible à l'environnement ou à la température (TSD) (Elf, 2003 ; Pieau et Dorriszi, 2004). La différenciation gonadique est en faveur des mâles à température élevée chez les crocodiles alors qu'elle est en faveur des femelles chez les tortues (Dournon *et al.*, 1990 ; Scharl, 2004a).

Alors que plusieurs espèces de tortues présentent un déterminisme génétique du sexe avec une hétérogamétie mâle ou femelle, la tortue olivâtre *Lepidochelys olivacea* et celle de Floride *Trachemys scripta*, dépourvues d'hétérochromosomes, montrent un déterminisme du sexe sensible à la température. Ainsi, la température qui favorise les mâles (MPT) entraîne une augmentation ou une persistance de l'expression de plusieurs gènes de la cascade moléculaire de la différenciation gonadique mâle comme *Sf1*, *Sox9*, *Wt1* et *Dmrt1* (Kettlewell *et al.*, 2000 ; Flemming et Crews, 2001 ; Torres-Maldonado *et al.*, 2002 ). A l'inverse, la température qui favorise les femelles (FPT) diminue l'expression des gènes précédents et augmente l'expression de *Foxl2* et de *Cyp19* codant l'aromatase.

Si plusieurs gènes de la cascade moléculaire du déterminisme sexuel des Vertébrés sont retrouvés chez *L. olivacea* et *T. scripta*, leurs profils d'expression peuvent présenter des différences. Ainsi chez *L. olivacea*, *Sox9* est exprimé précocement dès le stade de la gonade indifférenciée et persiste durant la période thermosensible du déterminisme du sexe (stades 21 à 26) à la température favorisant les mâles alors qu'il diminue à la température favorisant les

femelles au stade 26 (Torres Maldonado *et al.*, 2002). De même une augmentation exponentielle de l'activité de l'aromatase est détectée précocement durant la période thermosensible du déterminisme du sexe aux températures favorisant les femelles (Pieau et Dorrizzi, 2004). Le profil d'expression des gènes *Dax1*, *Dmrt1* et *Sox9* a été établi au niveau des gonades d'embryons de *L. olivacea* incubés à des températures favorisant les mâles et à des températures favorisant les femelles (Figure 13). *Dax1* maintient un niveau d'expression similaire aux deux températures au cours de la période thermosensible puis diminue significativement dans le testicule au stade 27 en comparaison avec l'ovaire une fois la différenciation morphologique testiculaire déjà établie. *Dmrt1* présente une expression plus élevée à la température favorisant les mâles à tous les stades thermosensibles, alors que *Sox9* a une expression similaire aux deux températures des stades 23 à 25 puis diminue à la température favorisant les femelles. Par conséquent, les régulations positive de *Dmrt1* dont l'expression augmente chez les mâles et négative de *Sox9* avec une diminution de ces transcrits chez les femelles pourraient jouer un rôle dans le déterminisme du sexe mâle et femelle respectivement (Torres Maldonado *et al.*, 2002). Chez la tortue *Trachemys scripta*, une température d'incubation des œufs à 31°C au cours des stades sensibles 16 à 20 induit une différenciation ovarienne, alors qu'une différenciation testiculaire est induite à 26°C et entraîne une expression de *Dmrt1* au niveau des crêtes génitales (Wibbels *et al.*, 1991a et b ; Kettlewell *et al.*, 2000 ; Yao *et al.*, 2004).

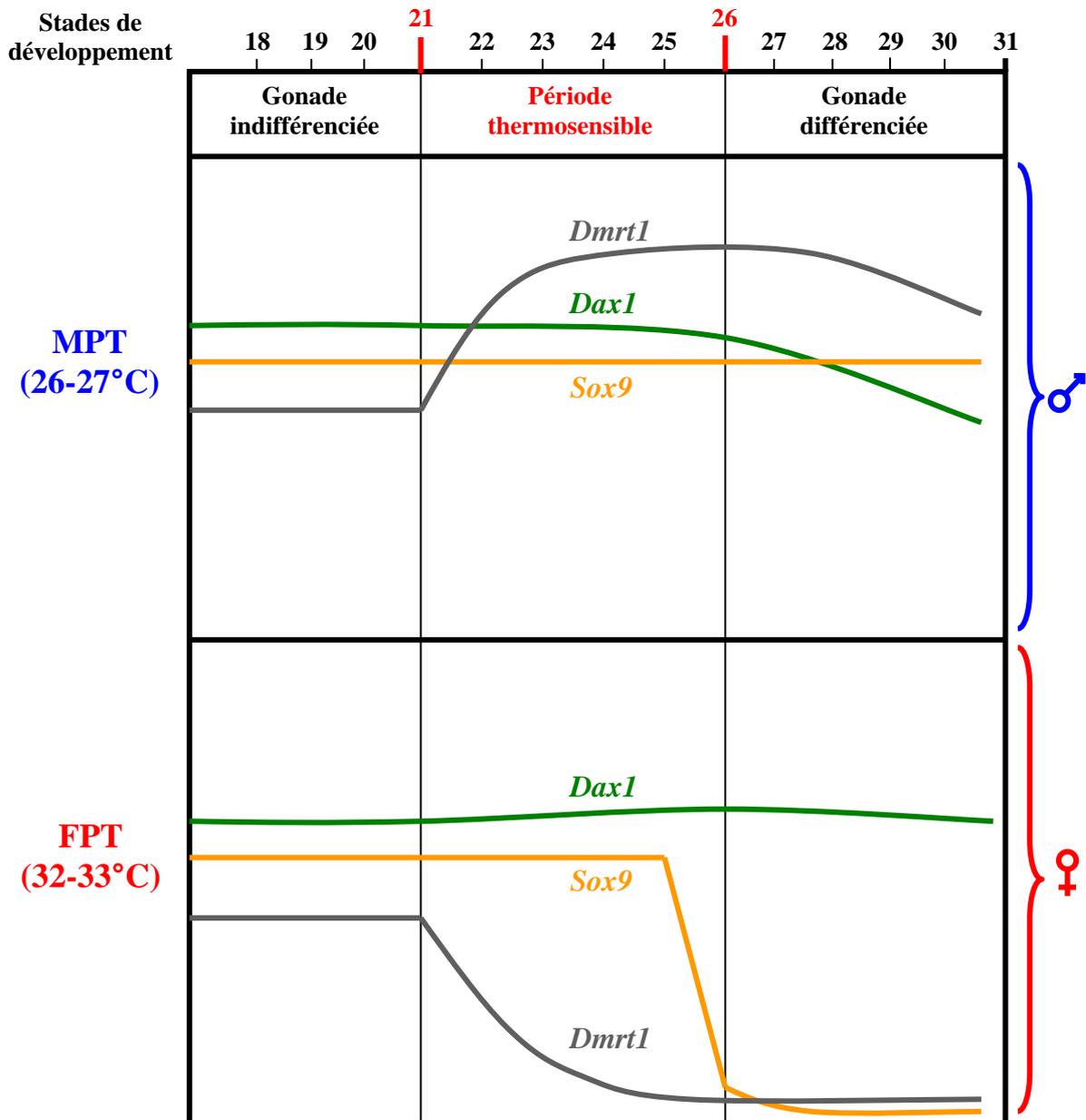


Figure 13 : Profils d'expression de *Dmrt1*, *Sox9* et *Dax1* dans les gonades au cours du développement chez la tortue olivâtre *Lepidochelys olivacea*, une espèce présentant un déterminisme du sexe dépendant de la température.

Les températures favorisant le développement mâle et femelle sont respectivement MPT (26-27°C) et FPT (32-33°C).

#### IV. Le cas de l'hermaphrodisme

Deux types d'hermaphrodisme sont présents dans le monde animal. L'hermaphrodisme simultané, caractérisé par la présence de gamètes mâles et femelles chez un même individu, existe à l'état naturel chez certains animaux comme certaines cochenilles, coquilles Saint-Jacques ou chez le poisson des mangroves *Rivulus marmoratus* (Paz *et al.*, 2005 ; Orlando *et al.*, 2006). Bien que les fécondations soient alors généralement croisées, des cas d'autofécondation peuvent être rencontrés, comme c'est le cas pour *R. marmoratus*. Ce phénomène reste cependant plutôt rare car défavorable au brassage génétique (Orlando *et al.*, 2006). L'hermaphrodisme successif concerne les animaux présentant, au cours de leur vie, un changement de sexe. Ce changement se fait le plus fréquemment de mâle à femelle, comme par exemple chez la crépidule *Crepidula fornicata* (Proestou *et al.*, 2008) et chez l'huître *Crassostrea gigas* (Guo et Allen, 1997); on parle alors d'hermaphrodisme protandre. Lorsque le changement de sexe s'effectue de la femelle vers le mâle, on parle de protogynie, un cas plus rare rencontré notamment chez le mérou à tâches oranges *Epinephelus coioides* (Xia *et al.*, 2007).

Certaines espèces de poissons, du fait de leur hermaphrodisme, présentent un intérêt pour l'étude des mécanismes du déterminisme du sexe et de la différenciation gonadique. Ainsi, chez l'hermaphrodite protogyne *E. coioides*, l'expression gonadique de *Dmrt1* est d'abord faible dans la gonade femelle puis elle augmente lors de la transition de l'ovaire en testicule à la réversion sexuelle (Xia *et al.*, 2007). Des analyses en hybridation *in situ* et en immunohistochimie montrent une expression de *Dmrt1* dans les spermatogonies et les spermatocytes primaires et secondaires alors que *Sox9* est exprimé spécifiquement par les cellules de Sertoli (Xia *et al.*, 2007). L'expression de *Dmrt1* dans les cellules germinales mâles du mérou n'est pas sans rappeler le schéma décrit précédemment pour *C. elegans* où l'activation des "gènes mâles" dans les cellules germinales permet la mise en place de la spermatogenèse chez les hermaphrodites. L'expression sertolienne de *Sox9* pourrait induire une expression d'*Amh* ce qui inhiberait par conséquent l'expression de l'aromatase (Xia *et al.*, 2007). Chez une deuxième espèce de mérou, *Epinephelus merra*, présentant aussi un hermaphrodisme protogyne, une diminution du taux d'œstradiol 17 $\beta$  (E2), naturelle ou induite par un inhibiteur, déclenche un changement de sexe de femelle en mâle avec une augmentation des concentrations de testostérone et de 11-kétotestostérone (11KT) corrélée avec une progression de la spermatogenèse (Bhandari *et al.*, 2006). Un traitement de 75 jours

avec la 11KT induit 100% de masculinisation des femelles suggérant un rôle important lors du changement de sexe chez ce poisson (Bhandari *et al.*, 2006). Les mécanismes impliquant la 11KT lors de la protogynie demeurent cependant inconnus; ils pourraient être dus à une stimulation directe de la spermatogenèse au niveau des ovaires ou à une inhibition de la synthèse d'œstrogènes.

Le pagre à tête noire ou *black porgy Acanthopagrus schlegeli*, est un exemple de poisson hermaphrodite protandre. Il se développe en mâle durant les deux premières années de sa vie puis commence progressivement à changer de sexe en femelle après la troisième année. Dans la gonade bisexuelle, les tissus testiculaires et ovariens sont alors séparés par un tissu conjonctif (Wu *et al.*, 2005). L'œstradiol, l'aromatase et les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle important dans le changement de sexe chez ce poisson. Par exemple, l'expression du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  est plus élevée dans les ovaires vitellogéniques que dans les ovaires bisexuels (Lee *et al.*, 2001). De même, des concentrations élevées en œstradiol sont détectées durant la saison de pré-ponte et de ponte chez des animaux changeant de sexe en femelle (Lee *et al.*, 2001). De plus, un changement de sexe induit par des hormones peut être observé. Ainsi, des poissons âgés de 1 à 2 ans, traités à l'œstradiol exogène pendant 5 à 6 mois, montrent une stimulation de l'activité de l'aromatase dans les gonades et une augmentation du taux de l'hormone lutéinisante (LH) dans le plasma. A l'inverse, l'administration d'inhibiteur d'aromatase pendant 1 année inhibe le changement de sexe naturel des poissons âgés de 3 ans qui restent alors des mâles fonctionnels (Lee *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2005). Les transcrits *Dmrt1* sont spécifiquement détectés dans le testicule et les vésicules séminales chez les individus âgés de 2 ans et ils sont présents à un niveau plus élevé dans le testicule bisexuel que dans l'ovaire bisexuel. Ce niveau d'expression de *Dmrt1* diminue lors du changement de sexe de mâle en femelle ce qui suggère, comme pour *E. merra*, une relation étroite entre ce gène et le changement de sexe chez *A. schlegeli* (He *et al.*, 2003a). L'expression du gène *Dax1* est également corrélée à la différenciation gonadique mâle et une expression ovarienne de *Sfl* augmente parallèlement aux transcrits de l'aromatase durant la phase de changement de sexe naturel (Liu *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2005). Des travaux concernant les récepteurs aux œstrogènes *ER $\alpha$*  et *ER $\beta$*  et le récepteur aux androgènes *AR* montrent une augmentation de l'expression des premiers dans la partie ovarienne de la gonade bisexuelle et du second dans sa partie testiculaire. Ceci suggère une sensibilité différentielle des tissus bisexuels testiculaire et ovarien qui pourrait expliquer les changements de sexe chez le *black porgy* (He *et al.*, 2003b).

D'après l'ensemble de ces études, certains facteurs déjà identifiés comme intervenant dans les différentes cascades du déterminisme sexuel, comme par exemple *Dmrt1*, seraient également impliqués dans les changements sexuels lors de l'hermaphrodisme.

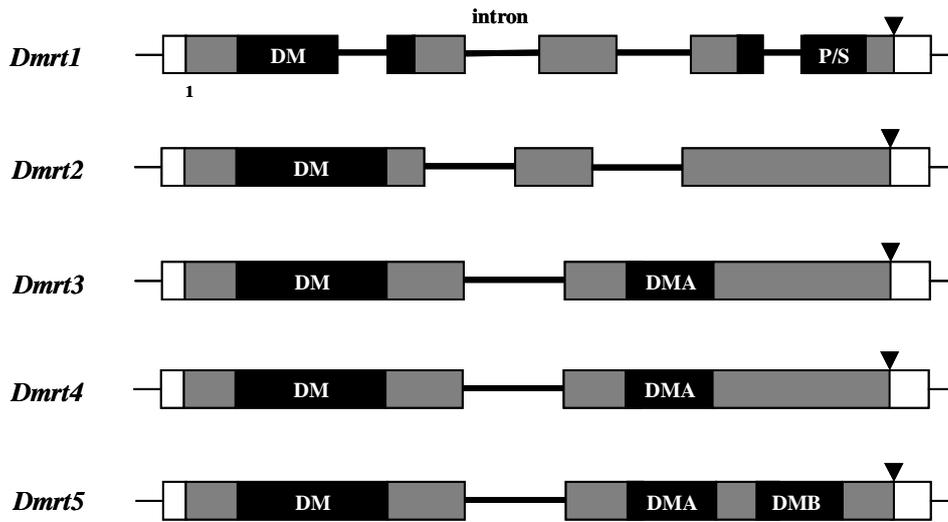
## V. Les facteurs à domaine DM et la différenciation gonadique

L'étude comparée de la cascade du déterminisme du sexe a permis la mise en évidence des facteurs *dsx* (*doublesex*) et *mab-3* impliqués dans la différenciation gonadique respectivement chez *Drosophila melanogaster* (Erdman et Burtis, 1993) et *Caenorhabditis elegans* (Shen et Hodgkin, 1988). Ces facteurs ont définis la famille des gènes *Dmrt* (*doublesex and mab-3-related transcription factor*) codant des facteurs de transcription à doigt de zinc caractérisés par un motif de liaison à l'ADN, le domaine DM et qui sont très conservés des Invertébrés aux Vertébrés (Raymond *et al.*, 1998 ; Yi et Zarkower, 1999).

### 1. Structure des facteurs à domaine DM

Les facteurs *Dmrt* sont caractérisés par leur domaine DM très conservé. En dehors de ce domaine, il existe une grande diversité de séquences, issues ou non d'épissages différentiels, qui permettent de distinguer plusieurs membres dans cette famille. Le premier facteur à domaine DM identifié est *Dsx* chez la drosophile (Burtis et Baker, 1989 ; Erdman et Burtis, 1993). *Dsx* a également été identifié chez le ver à soie *Bombyx mori*, l'abeille *Apis mellifera*, la mouche de l'olivier *Bactrocera oleae*, la mouche domestique *Musca domestica* et d'autres Insectes (Suzuki *et al.*, 2001 ; Hediger *et al.*, 2004 ; Lagos *et al.*, 2005 ; Cristino *et al.*, 2006). Les facteurs *Dsx* présentent tous un épissage différentiel donnant lieu à deux formes, la première spécifique des femelles ( $Dsx^F$ ) et la seconde spécifique des mâles ( $Dsx^M$ ). Chez la drosophile, le transcrit  $Dsx^F$  de 3631 nucléotides résulte des exons 1, 2, 3 et 4 et code une protéine de 427 acides aminés alors que la forme mâle de 4010 nucléotides est composée des exons 1, 2, 3, 5 et 6 et code une protéine de 549aa (Hediger *et al.*, 2004 ; Lagos *et al.*, 2005). Les deux facteurs  $Dsx^F$  et  $Dsx^M$  présentent respectivement des séquences spécifiques femelle et mâle du côté C-terminal mais possèdent en commun le domaine DM et un domaine riche en proline et sérine (P/S). Certaines études montrent la présence de deux domaines de dimérisation communs aux deux formes, le premier OD1 (oligomerization domain 1) du côté N-terminal (acides aminés 39 à 104) et le second OD2 du côté C-terminal (acides aminés 350 à 412 pour  $Dsx^F$  et 350 à 427 pour  $Dsx^M$ ) incluant partiellement les domaines spécifiques mâle et femelle (An *et al.*, 1996). La dimérisation des facteurs *Dsx* jouerait un rôle critique lors de leur fonction *in vivo* (Erdman *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2006). Des caractéristiques similaires de dimérisation ont été observées pour les facteurs *Dmrt* des

Vertébrés avec la formation d'homodimères ou d'hétérodimères qui montreraient des différences de spécificité de liaison à l'ADN (Murphy *et al.*, 2007) mais pas d'épissage spécifique de la femelle ou du mâle. Cependant, des épissages différentiels ont été observés pour Dmrt1 chez l'Homme, la souris, le poulet et le poisson zèbre et ils conduisent à différents isoformes (de 3 à 6) du côté C-terminal (Guo *et al.*, 2005 ; Cheng *et al.*, 2006 ; Lu *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2007). Chez les Vertébrés, certains membres de la famille Dmrt présentent, en plus du domaine DM conservé du côté N-terminal, un domaine riche en proline, sérine et dans certains cas en tyrosine du côté C-terminal. D'autres membres de la famille Dmrt présentent un domaine DMA comme Dmrt 3, 4 et 5 et un domaine DMB qui est spécifique aux Dmrt5 (Yamaguchi *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2008). La structure du gène et notamment le nombre d'introns présents, permet également de différencier les différents membres de la famille Dmrt (Figure 14). Ainsi, chez les Vertébrés, le gène Dmrt1 présentent 4 introns, le gène Dmrt2 2 introns, les gènes Dmrt 3, 4 et 5 présentent 1 seul intron, le gène Dmrt7 8 introns et le gène Dmrt8 7 introns (Brunner *et al.*, 2001 ; Kondo *et al.*, 2002 ; Veith *et al.*, 2006).



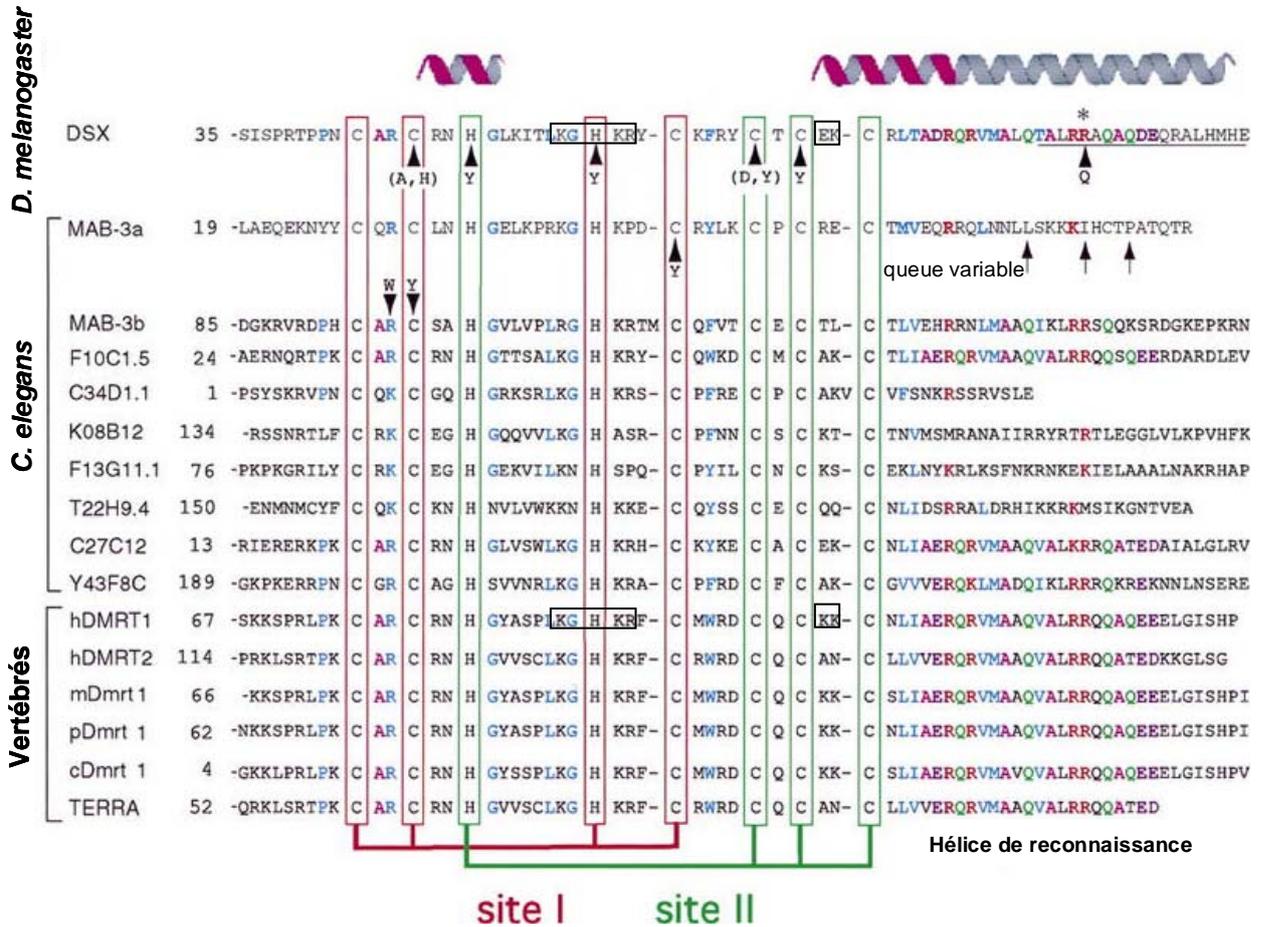
**Figure 14 : Représentation schématique des différents facteurs Dmrt chez les Vertébrés.**

Les domaines conservés (DM, DMA, DMB et le domaine riche en proline et sérine) sont représentés en noir. Les triangles noirs indiquent les codons stop.

## 2. Structure du domaine DM

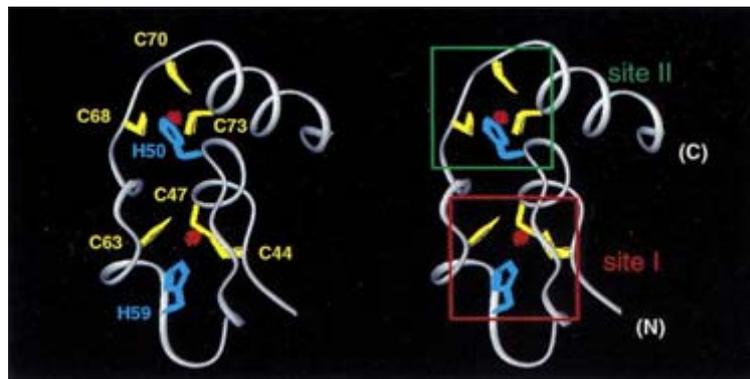
Le domaine DM (Figures 15), initialement identifié chez *Drosophila melanogaster* (Figure 16) possède une structure en doigt de zinc (Volf *et al.*, 2003) caractérisée par la présence du côté N-terminal de 6 cystéines et 2 histidines conservées constituant deux sites entrelacés de liaison aux atomes de zinc ( $Zn^{2+}$ ), le site I (CCHC) et le site II (HCCC)). Ces sites sont regroupés en un domaine globulaire comprenant une courte hélice  $\alpha$  conservée composée de 5 acides aminés (R<sub>46</sub>-H<sub>50</sub> pour Dsx), et des acides aminés (K<sub>72</sub>-R<sub>79</sub> pour Dsx) d'une hélice plus longue qui s'étend du site II jusqu'à la queue C-terminale, site de reconnaissance pour la liaison spécifique à l'ADN (Zhu *et al.*, 2000 ; Ying *et al.*, 2007).

A l'intérieur de ce domaine DM, il est également retrouvé une séquence de localisation nucléaire NLS (*nuclear localization signal*) fonctionnelle composée de deux groupes d'acides aminés basiques hautement conservés : K<sub>89</sub>GHKR<sub>93</sub> et K<sub>103</sub>K<sub>104</sub> pour Dmrt1 humain et K<sub>57</sub>GHKR<sub>61</sub> et E<sub>71</sub>K<sub>72</sub> pour Dsx. La présence de ce site de localisation nucléaire est en accord avec la localisation nucléaire observée en immunohistochimie du Dmrt1 humain au niveau des cellules de Sertoli, des spermatogonies et des spermatocytes du testicule adulte (Ying *et al.*, 2007). Le résidu H91 du NLS de Dmrt1, qui correspond au H59 de Dsx est le résidu de liaison au zinc appartenant au site I. Les résidus K<sub>92</sub> et R<sub>93</sub> de Dmrt1, correspondant à K<sub>60</sub> et R<sub>61</sub> de Dsx, se trouvent au niveau de la chaîne de connexion des deux sites I et II. Des mutations de ces deux acides aminés entraînent une localisation cytoplasmique du Dmrt1 humain confirmant la fonctionnalité de ce NLS (Narendra *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2006). Les caractéristiques de ce domaine sont aussi retrouvées chez le nématode, la souris, le poulet et le poisson zèbre ce qui suggère que sa structure et sa fonction auraient été conservées entre les membres de la famille à domaine DM au cours de l'évolution (Zhu *et al.*, 2000).



**Figure 15 : Alignement des domaines DM des facteurs Dmrt chez les Métazoaires.**

Les cystéines et les histidines qui coordonnent les atomes de  $Zn^{2+}$  sont alignées en deux sites de liaison entrelacés : le site I (rouge) et le site II (vert). Les acides aminés dans le module à doigt de zinc sont en bleu ; les résidus conservés de la queue sont colorés (R, rouge ; Q, vert ; A, magenta, D/E, violet ; L/V/T/M, bleu). Les éléments stables de l'hélice  $\alpha$  sont surlignés par un ruban magenta au dessus de la séquence DSX. L'hélice  $\alpha$  C-terminale est indiquée par l'extension grise ; Les séquences NLS du Dmrt1 humain et de Dsx sont indiquées par les boîtes noires ; les flèches indiquent les sites de mutations de *dsx* ou *mab-3* associées à un développement intersex (Zhu *et al.*, 2000). Les numéros d'accèsion de haut en bas sont : DSX, [M25292](#) ; MAB-3a et MAB-3b, [Z99278](#) ; F10C1.5, [U49831](#) ; C34D1.1, [Z78060](#) ; K08B12, [U97001](#) ; F13G11, [Z83317](#) ; T22H9.4, [AF101315](#) ; C27C12, [Z69883](#) ; Y43F8C, [AL032637.1](#) ; DMRT1 humain, [AF130728](#) ; DMRT2 humain, [AF130729](#) ; mDmrt1 de souris, [AF202778](#) ; pDmrt1 porcin, [AF216651](#) ; cDmrt1 de poulet, [AF123456](#) ; TERRA du poisson zèbre, [AF080622](#).



**Figure 16 : Représentation en 3D de la structure du domaine DM de Dsx entre les résidus 41-81.**

Les cystéines (en jaune) et les histidines (en bleu) conservées ainsi que deux atomes de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (en rouge) sont représentés. Les deux sites entrelacés de liaison du zinc sont désignés, site I et site II (encadrés). Les résidus de liaison au ligand sont C44, C47, H59, C63 et H50, C68, C70, C73 (Zhu *et al.*, 2000).

### 3. Phylogénie et nomenclature des gènes à domaine DM

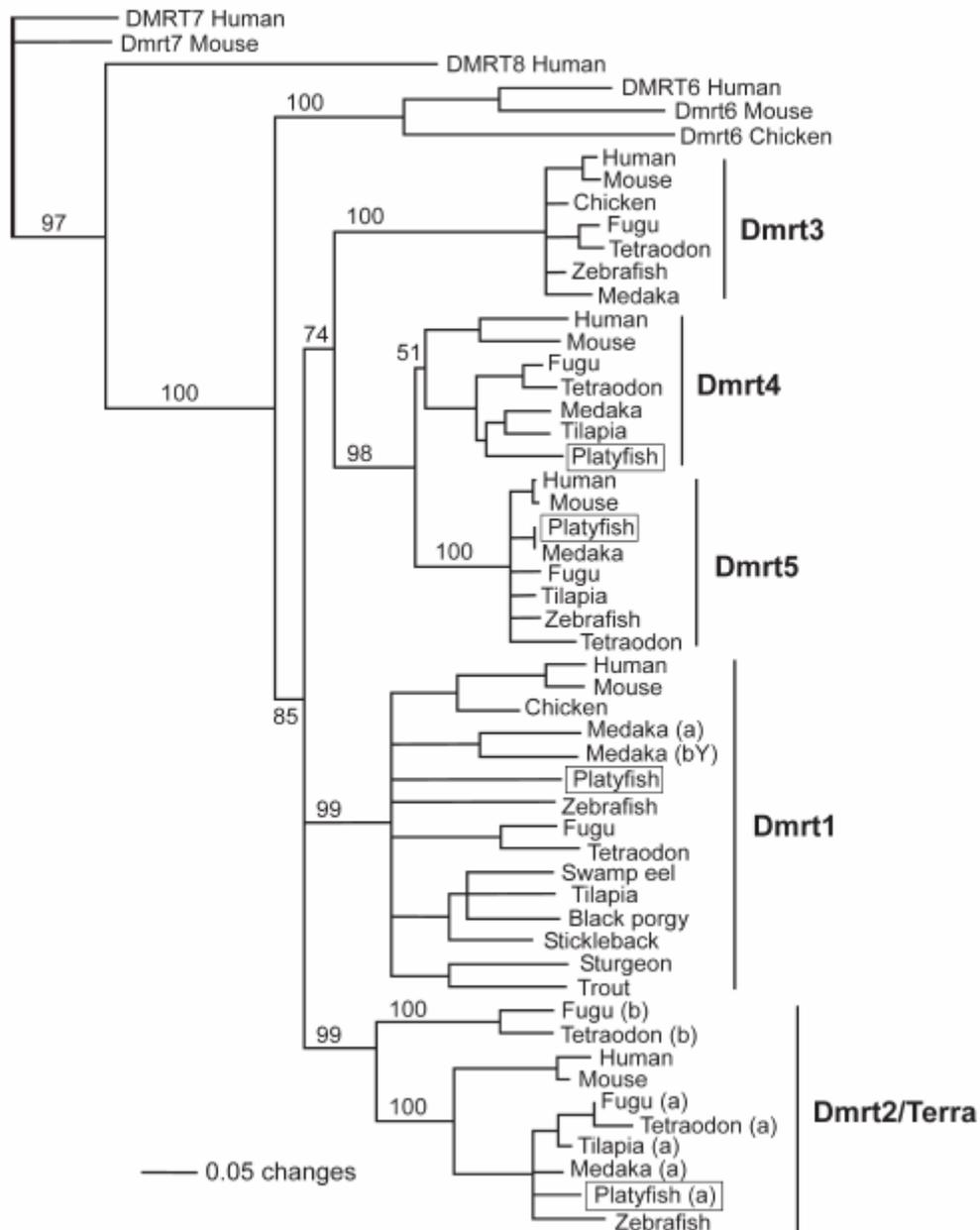
A ce jour, plusieurs facteurs à domaine DM ont été identifiés chez les Invertébrés et les Vertébrés étudiés : 4 chez la drosophile, 11 chez *C. elegans*, 6 chez les poissons et 8 chez l'Homme (Brunner *et al.*, 2001 ; Ottolenghi *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2003).

Une analyse phylogénétique basée uniquement sur le domaine DM serait trop restrictive pour considérer la famille dans son ensemble. Une analyse structurale et phylogénétique combinée pourrait être plus représentative. Dans un but d'homogénéité, on gardera la nomenclature de ces gènes chez l'Homme (*Dmrt1-8*), qui n'est pas basée sur l'hypothèse d'une relation structurale ou phylogénétique entre les différents membres de cette famille (Volf *et al.*, 2003).

L'établissement de relations phylogénétiques entre les différents gènes *Dmrt* (Figure 17) n'est pas très simple du fait de la grande variabilité des séquences hors domaine DM chez les différents phyla. Une première classification des huit *Dmrt* humains (*Dmrt1-8*) en plusieurs sous-familles est basée principalement sur les structures exon-intron conservées et les différents domaines protéiques (Ottolenghi *et al.*, 2002). Ainsi, les gènes *Dmrt3*, *Dmrt4* et *Dmrt5* présentent deux exons codants et la protéine traduite présente un motif conservé, en plus du domaine DM, qui a été nommé DmrtA ou domaine DMA. Des analyses phylogénétiques montrent une relation plus étroite entre *Dmrt4* et *Dmrt5*, alors que *Dmrt3* est plus distant (Ottolenghi *et al.*, 2002). *Dmrt3* est d'ailleurs regroupé dans la même région chromosomique que *Dmrt1* et *Dmrt2* chez l'Homme et chez les poissons *Fugu rubripes*, *Oryzias latipes* et *Ornithorhynchus anatinus* (Brunner *et al.*, 2001 ; El-Mogharbel *et al.*, 2007). Par ailleurs, des similarités observées en comparant les séquences protéiques de *Dmrt7* et de *Dmrt8* ont été confirmées phylogénétiquement. Par contre, aucune similarité n'a été retrouvée pour *Dmrt2* et *Dmrt6* (Volf *et al.*, 2003 ; Veith *et al.*, 2006).

L'établissement d'une nomenclature basée uniquement sur des caractéristiques structurales nécessite de connaître la structure ancestrale. L'identification chez le corail *Acropora millepora* d'un facteur *Dmrt* (AmDMI) à domaine DMA suggère que la forme ancestrale posséderait ce domaine, conservé chez les facteurs DmrtA (Miller *et al.*, 2003). Ceci est conforté par l'identification chez une espèce de crustacé, la daphnie *Daphnia magna*, de trois facteurs à domaine DM apparentés aux facteurs Dmrt11E, Dmrt93B et Dmrt99B de *D. melanogaster*, les deux derniers présentant un domaine DMA (Kato *et al.*, 2008). Chez la cione, *Ciona intestinalis*, un urochordé, trois facteurs à domaine DM ont également été

identifiés, le premier, apparenté à Dmrt2, le deuxième, aux facteurs Dmrt4 et Dmrt5 et le dernier, divergeant des Dmrt de Vertébrés. De plus, l'analyse phylogénétique des séquences protéiques Dmrt entre les Vertébrés et la drosophile montre une relation entre Dmrt11E et Dmrt2, ainsi qu'entre Dmrt99B et les facteurs Dmrt 4 et Dmrt5, ces trois derniers possédant le domaine DMA. Ceci suggère que les groupes dmrt2 et Dmrt4/Dmrt5 sont très anciens et auraient divergés il y a 600 millions d'années (Volf *et al.*, 2003).



**Figure 17 : Phylogénie moléculaire des protéines Dmrt chez les Vertébrés.**

L'analyse phylogénétique est réalisée avec la méthode du plus proche voisin (bootstrap de 100 répétitions) avec l'alignement de 114 aa contenant le domaine DM (Veith *et al.*, 2006).

## 4. Rôle des facteurs à domaine DM

Avec la découverte des facteurs Dmrt chez les Vertébrés et les Invertébrés, plusieurs hypothèses ont été émises concernant leur rôle dans un mécanisme universel du déterminisme du sexe chez tous les phyla (Zarkower, 2001 ; Volff *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2007). En effet, plusieurs membres de la famille Dmrt présentent une expression au niveau des gonades en développement ce qui est cohérent avec un rôle potentiel dans le développement gonadique. Par conséquent, les premières études réalisées sur cette famille de facteurs de transcriptions ont été orientées vers le développement sexuel, au cours duquel ils semblent plus impliqués dans la différenciation sexuelle que le déterminisme du sexe. Des études récentes montrent que les membres de la famille Dmrt sont aussi exprimés en dehors des gonades, suggérant qu'ils contrôlent un éventail plus large de fonctions biologiques.

Chez différentes espèces, plusieurs facteurs à domaine DM auraient un rôle dans le développement sexuel. Ainsi le nématode *C. elegans* présente, en plus de mab-3, le facteur mab-23 qui est également situé en aval de la cascade moléculaire de la régulation du développement sexuel (Lints et Emmons, 2002). De même chez les Mammifères, d'autres facteurs que Dmrt1 (les Dmrt3, Dmrt4, Dmrt5, et Dmrt7), montrent aussi une expression au début du développement gonadique, suggérant qu'ils seraient impliqués lors du développement sexuel (Kim *et al.*, 2003).

D'autres facteurs DM ne sont pas impliqués dans le développement sexuel, comme par exemple Dmrt2 qui n'est pas exprimé ou très faiblement au cours de la période du développement gonadique chez la souris et dont l'inactivation du gène n'entraîne pas d'anomalies du développement sexuel (Kim *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2007). Chez le poisson zèbre, l'orthologue de Dmrt2, terra, serait impliqué dans le développement des somites (Volff *et al.*, 2003).

### 4.1 DMRT1, facteurs du déterminisme et/ou de la différenciation sexuelle

Dmrt1, premier facteur caractérisé chez les Vertébrés, a été largement étudié en raison de sa participation dans la différenciation gonadique. Chez l'Homme, la délétion de la région chromosomique 9p, contenant *Dmrt1*, provoque une dysgénésie gonadique des individus XY (Raymond *et al.*, 1999a). Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé au niveau des cordons

testiculaires chez l'embryon puis uniquement au niveau du testicule chez l'adulte. L'invalidation de ce gène entraîne l'absence de survie des cellules germinales et de maturation des cellules de Sertoli (Raymond *et al.*, 2000). Chez le poulet, *Dmrt1* porté par le chromosome Z, est exprimé fortement dans gonades embryonnaires au niveau des crêtes urogénitales, avec une plus forte expression chez les mâles ZZ que les femelles ZW, avant et durant la période critique de la différenciation gonadique, suggérant son implication dans la différenciation testiculaire chez les Oiseaux (Raymond *et al.*, 1999b ; Smith *et al.*, 1999). Chez les embryons mâles, les transcrits *Dmrt1* sont localisés dans les cordons testiculaires de la gonade en développement, suggérant un rôle organisationnel lors de la formation testiculaire. Ce profil d'expression suggère que la fonction de *Dmrt1* est conservée des Mammifères aux Oiseaux. Cependant, chez le poulet, une expression de *Dmrt1* après le déterminisme sexuel suggère que d'autres facteurs sont aussi nécessaires en amont pour l'initiation de la formation testiculaire (Smith et Sinclair, 2001 ; Ferguson-Smith, 2007). Chez la tortue *Lepidochelys olivacea*, *Dmrt1* est exprimé dans les gonades indifférenciées aux stades de développement 23 à 25 (stades sensibles à l'influence de la température) et, aux stades suivants, son expression est maintenue élevée uniquement chez les mâles (Kettlewell *et al.*, 2000; Torres Maldonado *et al.*, 2002). Chez les Amphibiens et le poisson médaka, *Dmrt1* est exprimé uniquement au niveau des testicules (Nanda *et al.*, 2002 ; Shibata *et al.*, 2002). Chez le médaka, il existe une copie additionnelle du *Dmrt1* autosomal sur le chromosome Y (*Dmrt1Y*) dont l'expression est également spécifique du testicule. Il est détecté avant la différenciation gonadique et chez l'adulte et présente une expression exclusivement dans les cellules de Sertoli (Matsuda *et al.*, 2002 ; Nanda *et al.*, 2002). Cependant, *Dmrt1Y* n'a pas été identifié chez d'autres Poissons (Kondo *et al.*, 2003 ; Yoshimoto *et al.*, 2006). Chez la truite arc-en-ciel, l'expression de *Dmrt1* précède le développement testiculaire et se maintient ensuite uniquement dans les testicules (Marchand *et al.*, 2000). L'étude de l'expression de *Dmrt1* chez un poisson protandre, le *black porgy* (*Acanthopagrus schlegelii*), donne des résultats contradictoires. En effet, les travaux de He *et al.* (2003b) montrent, par PCR en temps réel, une variation de l'expression gonadique de *Dmrt1* au cours du changement de sexe alors que Liu *et al.* (2004) n'observent pas, par RT-PCR, de variation.

## 4.2. Les autres facteurs de la famille Dmrt

La famille des gènes à domaine DM présente plusieurs membres chez les Invertébrés et les Vertébrés avec différents profils d'expression (Tableau 1). Parmi les huit gènes Dmrt identifiés chez les Vertébrés, cinq présentent une expression dans d'autres tissus que les gonades. Le premier facteur, Terra/Dmrt2, de poisson zèbre, de medaka, de poulet et de souris présente une expression au niveau du mésoderme présomitique et des somites nouvellement formées d'où un rôle potentiel dans le développement musculaire (Meng *et al.*, 1999 ; Winkler *et al.*, 2004 ; Hong *et al.*, 2007). Chez le poulet, Terra/Dmrt2 présente aussi une expression du côté droit du nœud de Hensen, ce qui suggère un rôle dans la détermination de la symétrie bilatérale. Par contre cette fonction ne serait pas conservée au cours de l'évolution puisqu'aucun défaut de la symétrie bilatérale n'a été observé chez des embryons de souris ayant subi une perte de fonction de Dmrt2 (Seo *et al.*, 2006). Chez *Rana rugosa*, Dmrt2 est fortement exprimé au niveau des gonades embryonnaires mâles et femelles puis il est exprimé plus faiblement au niveau du testicule adulte uniquement. Une expression faible de Dmrt2 est également retrouvée au niveau du rein et du cerveau de la grenouille adulte. Ce profil d'expression suggère un rôle de Dmrt2 dans la différenciation gonadique précoce chez *R. rugosa* avant d'assurer exclusivement la spermatogenèse aux stades plus tardifs (Matsushita *et al.*, 2007). De même chez la souris adulte, Dmrt2 est davantage exprimé dans le testicule que dans l'ovaire (Kim *et al.*, 2003). Une deuxième copie de Dmrt2 spécifique aux poissons et nommée Dmrt2b, a été identifiée chez le poisson zèbre. Dmrt2b présente une expression qui augmente au cours de l'embryogenèse jusqu'à l'éclosion, et pourrait être impliquée dans le développement de l'arc branchial (Veith *et al.*, 2006 ; Yamaguchi *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2008).

Dmrt3 est exprimé chez l'embryon de souris à 14,5 jpc au niveau des cellules interstitielles du testicule, du poumon, de l'estomac, du placode nasal, du télencéphale, du tube neural et de la moelle épinière mais pas au niveau de l'ovaire (Smith *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2003). Chez le poulet, en plus de son expression dans ces tissus, Dmrt3 est présent dans le mésoderme présomitique puis au niveau des somites, et plus tard au niveau des canaux de Müller et du système urogénital (Smith *et al.*, 2002). Chez le poisson medaka, Dmrt3 est exprimé au niveau de la moelle épinière et au niveau du testicule chez les adultes. Il présente aussi une expression au cours des trois premiers jours de l'embryogenèse qui décline ensuite jusqu'à l'éclosion (Brunner *et al.*, 2001 ; Winkler *et al.*, 2004). Cependant, le rôle de Dmrt3

chez ces organismes n'est pas encore connu (Huang *et al.*, 2005b). Chez les poissons *Xiphophorus maculatus* et *Takifugu rubripes*, Dmrt3 présente une expression testiculaire spécifique durant le développement gonadique d'où son rôle possible dans la différenciation sexuelle chez ces espèces (Yamaguchi *et al.*, 2006 ; El-Mogharbel *et al.*, 2007). Chez l'Homme, Dmrt3 possède deux isoformes, la première est exprimée au niveau du cerveau comme pour *Rana rugosa* et du poumon alors que la deuxième est abondante au niveau du testicule adulte (Ottolenghi et McElreavey, 2000 ; Ottolenghi *et al.*, 2002).

Chez la souris, Dmrt4 présente une expression ubiquiste. Les souris Dmrt4 mutantes sont fertiles chez les deux sexes, ce qui suggère que Dmrt4 n'est pas essentiel au développement gonadique. Cependant, les ovaires des femelles mutées présentent des follicules polyovulaires, suggérant un rôle de Dmrt4 dans la régulation de la folliculogénèse (Kim *et al.*, 2003 ; Balciuniene *et al.*, 2006). Chez le xénope, le poisson medaka et *Xiphophorus maculatus*, l'expression de Dmrt4 suggère un rôle dans le développement et la neurogénèse du système olfactif (Kondo *et al.*, 2002 ; Winkler *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2005b ; Veith *et al.*, 2006). Chez le poisson tilapia *Oreochromis niloticus*, Dmrt4 présente une expression ovarienne spécifique, par contre il n'y a pas de donnée d'expression dans les yeux et les branchies (Kondo *et al.*, 2002). Chez *Oreochromis aurea*, en plus d'une expression de Dmrt4 dans l'ovaire, les transcrits Dmrt4 sont détectés au niveau du télencéphale, de l'hypothalamus et de l'hypophyse chez les mâles et les femelles ce qui suggère une implication dans la neurogénèse du système olfactif et du système neuroendocrinien (Cao *et al.*, 2007). Chez *Takifugu rubripes*, Dmrt4 est exprimé au niveau des branchies, des gonades des deux sexes ainsi qu'au niveau de la rate d'où une implication possible dans le système immunitaire (Yamaguchi *et al.*, 2006). D'après ces études même si l'on retrouve des différences dans les profils d'expression selon les espèces, il semblerait que Dmrt4 soit impliqué au moins dans la neurogénèse du système olfactif et du système neuroendocrinien.

L'expression du Dmrt5 humain a été seulement détectée au niveau du testicule adulte (Ottolenghi *et al.*, 2002). Chez la souris, Dmrt5 présente, en plus d'une expression dans le cerveau, une expression au niveau des gonades embryonnaires de 12,5 à 15,5 jpc avec un taux plus élevé dans l'ovaire que dans le testicule. Dmrt5 est également exprimé au niveau des reins, du cœur, des poumons et de l'estomac chez la souris adulte ou embryonnaire (Kim *et al.*, 2003). Un profil d'expression similaire est retrouvé chez *Rana rugosa* où Dmrt5 est détecté dans tous les tissus adultes ; par contre aucun dimorphisme sexuel n'est observé dans les gonades embryonnaires (Matsushita *et al.*, 2007). Chez le poisson zèbre, Dmrt5 présente un pic d'expression au cours de la gastrulation puis il est exprimé essentiellement au niveau

du mésencéphale en développement, du cerveau adulte et des cellules germinales mâles et femelles adultes. Ces profils d'expression suggèrent un rôle de *Dmrt5* dans la mise en place de l'axe endocrinien et dans la gaméto-genèse du poisson zèbre (Guo *et al.*, 2004). Chez *Takifugu rubripes* et *Xiphophorus maculatus*, *Dmrt5* est exprimé au niveau du cerveau et des yeux mais pas au niveau des gonades chez les adultes. Au cours de l'embryogenèse, *Dmrt5* montre une expression au niveau du placode olfactif, du cerveau antérieur et moyen ainsi qu'au niveau du cristallin suggérant, comme pour *Dmrt4*, un rôle dans le développement du système olfactif (Veith *et al.*, 2006). Une expression au niveau de la rate chez *T. rubripes* suggère aussi une implication dans le système immunitaire (Yamaguchi *et al.*, 2006). Il semblerait donc que *Dmrt4* et *Dmrt5*, qui sont d'ailleurs proches au niveau structural et phylogénétique, aient des profils d'expression assez semblables.

Chez la souris, *Dmrt6* est exprimé au niveau du cerveau embryonnaire et adulte (Kim *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2007) comme c'est également le cas pour le xénope, différents poissons ainsi que le poulet (Hong *et al.*, 2007). Bien qu'il n'y ait pas d'analyse exhaustive de l'expression tissulaire de *Dmrt6* chez la souris adulte, une expression est cependant retrouvée au niveau des testicules (Kim *et al.*, 2003). Chez l'Homme, *Dmrt6* est exprimé au niveau des testicules et plus faiblement au niveau des ovaires et du pancréas (Ottolenghi *et al.*, 2002).

*Dmrt7* est exprimé au niveau de l'ovaire en développement chez la souris ainsi qu'au niveau du testicule à un taux plus faible (Kim *et al.*, 2003 ; Winkler *et al.*, 2004). Cette expression dans l'ovaire est indépendante de la lignée germinale puisqu'elle reste inchangée chez des souris *c-kit* <sup>-/-</sup> dépourvues de cellules germinales. Par contre, chez les mâles *c-kit* <sup>-/-</sup> l'expression de *Dmrt7* serait dépendante de la lignée germinale (Kim *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2007). Après la naissance, *Dmrt7* est exprimé uniquement au niveau de la gonade mâle (Kawamata et Nishimori, 2006 ; Kim *et al.*, 2007a). Des souris présentant une perte de fonction de *Dmrt7* sont viables, les femelles étant alors fertiles alors que les mâles présentent un arrêt de la spermatogenèse au stade pachytène avec une organisation aberrante des cellules de Sertoli. Lorsque l'inactivation de *Dmrt7* est ciblée au niveau des cellules de Sertoli, une spermatogenèse normale est observée ce qui suggère une fonction exclusive de *Dmrt7* dans les cellules germinales mâles et que l'organisation aberrante des cellules de Sertoli chez les animaux ayant une perte de fonction de *Dmrt7* est une conséquence indirecte de l'absence d'expression de ce gène au niveau des cellules germinales (Kawamata et Nishimori, 2006 ; Hong *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007a). Chez l'Homme, *Dmrt7* (*DmrtC2*) présente une expression seulement au niveau des testicules et du pancréas chez les adultes (Ottolenghi *et al.*, 2002).

Le dernier facteur à domaine DM identifié est Dmrt8 localisé sur le chromosome X. Avec Dmrt7, il n'est présent que chez les Mammifères (Veith *et al.*, 2006). Ces derniers présentent pour la plupart une seule copie de Dmrt8, sauf la souris, le rat et le lapin qui en présentent trois. Malgré la perte du domaine DM, le gène Dmrt8 a été maintenu chez les Mammifères suggérant une fonction indépendante du domaine DM. Chez l'Homme, Dmrt8 (DmrtC1) est exprimé au niveau du testicule, de l'ovaire, du pancréas, des reins et faiblement au niveau des poumons et du cerveau (Ottolenghi *et al.*, 2002). Chez la souris, Dmrt8.1 est exprimé exclusivement au niveau des testicules adultes où il a été détecté au niveau des cellules de Sertoli. Par contre, il présente une expression faible au niveau de tous les tissus testés au cours de l'embryogenèse sans différence apparente entre les mâles et les femelles. Dmrt8.2 présente une expression exclusivement au niveau des gonades embryonnaires mâles et femelles suggérant une implication lors du développement sexuel (Veith *et al.*, 2006).

**Tableau 1 : Expression des différents facteurs Dmrt chez les Vertébrés.**

Gènes	Espèces	Localisation	Références
Dmrt2	Poisson zèbre	Mésoderme présomitique, somites nouvellement formées	Meng <i>et al.</i> , 1999
	Poulet	Somites, nœud de Hensen, yeux, vésicule otique	Seo <i>et al.</i> , 2006 ; Hong <i>et al.</i> , 2007
	Medaka	Somites, région antérieure du mésoderme présomptif, tête en développement	Winkler <i>et al.</i> , 2004
	<i>Rana rugosa</i>	Reins, testicule, cerveau et gonades embryonnaires mâles et femelles	Kim <i>et al.</i> , 2003 ; Matsushita <i>et al.</i> , 2007
Dmrt3	Homme Souris	Cerveau, poumon, testicule Placode nasal, télencéphale, tube neural, moelle épinière, cellules interstitielles du testicule, poumon, estomac, cerveau	Ottolenghi <i>et al.</i> , 2002 Smith <i>et al.</i> , 2002 ; Kim <i>et al.</i> , 2003
	Poulet	Placode nasal, télencéphale, tube neural, moelle épinière, mésoderme présomitique, somites, canaux de Müller, système urogénital	Smith <i>et al.</i> , 2002
	Medaka <i>X. maculatus</i> et <i>T. rubripes</i>	Moelle épinière, testicule Gonade mâle en développement	Winkler <i>et al.</i> , 2004 El-Mogharbel <i>et al.</i> , 2007 ; Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
Dmrt4	Souris	Expression ubiquiste	Balciuniene <i>et al.</i> , 2006 ; Kim <i>et al.</i> , 2003
	Xénope	Placode présomptif olfactif, télencéphale, intestin antérieur, vésicule biliaire	
	Medaka	Placode nasal, télencéphale, placode optique, arc branchial	Winkler <i>et al.</i> , 2004
	Tilapia <i>X. maculatus</i>	Cerveau, yeux, branchies, reins, testicule, ovaire Ovaire Placode nasal, cerveau antérieur, arc branchial	Kondo <i>et al.</i> , 2002 Huang <i>et al.</i> , 2005b ; Veith <i>et al.</i> , 2006 ; Winkler <i>et al.</i> , 2004 Cao <i>et al.</i> , 2007
	<i>O. aurea</i> <i>T. rubripes</i>	Ovaire, télencéphale, hypothalamus, glande pituitaire chez les mâles et les femelles Branchies, gonades des deux sexes, rate	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
Dmrt5	Homme Souris et <i>Rana rugosa</i> Poisson zèbre	Testicule Cerveau, reins, cœur, poumons, estomac, ovaire, testicule Gastrula, SNC en développement Adulte : cerveau, cellules germinales en développement, spermatogonies, spermatocytes, spermatides, spermatozoïdes, ovocytes en développement	Ottolenghi <i>et al.</i> , 2002 Kim <i>et al.</i> , 2003 ; Matsushita <i>et al.</i> , 2007 Guo <i>et al.</i> , 2004
	<i>X. maculatus</i> et <i>T. rubripes</i>	Placode olfactif, cerveau antérieur et moyen, cristallin, cerveau, yeux, rate	Veith <i>et al.</i> , 2006 ; Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
Dmrt6	Homme Souris Souris, poulet, xénope, poissons	Testicule, ovaire, pancréas Cerveau embryonnaire, testicule Système nerveux central	Ottolenghi <i>et al.</i> , 2002 Kim <i>et al.</i> , 2003 Hong <i>et al.</i> , 2007
Dmrt7	Homme Souris	Testicule, pancréas Ovaire et testicule en développement	Ottolenghi <i>et al.</i> , 2002 Winkler <i>et al.</i> , 2004 ; Kim <i>et al.</i> , 2003
Dmrt8	Homme Souris	Testicule, ovaire, pancréas, reins, poumon, cerveau Dmrt 8.1 : Testicule, faible dans tous les tissus embryonnaire testés Dmrt8.2 : gonades embryonnaires mâles et femelles	Ottolenghi <i>et al.</i> , 2002 Veith <i>et al.</i> , 2006

## VI. Forkhead box-L2 (Foxl2) et la différenciation ovarienne

### 1. Découverte et classification des facteurs Fox

De plus en plus d'études chez les Mammifères et les poissons montrent que l'organogenèse ovarienne n'est pas un processus passif établi par défaut en l'absence de la voie de différenciation testiculaire (Guigon *et al.*, 2005 ; Hung et Yao, 2005 ; Ottolenghi *et al.*, 2007a, b). Des interactions entre les cellules somatiques et les cellules germinales femelles sont mises en jeu, créant ainsi un microenvironnement permettant la formation des follicules ovariens. L'identification et l'étude fonctionnelle de plusieurs facteurs de régulation du développement femelle comme Dax1, Figa (*factor in germ line a*), Foxl2, la follistatine, la P450-aromatase et Wnt4 révèlent la complexité de l'organisation précoce ovarienne (Hung et Yao, 2005).

En 1990, la caractérisation d'un domaine de liaison à l'ADN de 110 acides aminés, très conservé entre les facteurs *FORKHEAD* et les facteurs de transcription *HNF-3* des Mammifères, a permis de définir une nouvelle famille de facteurs de transcriptions, *Forkhead box (FOX)* (Weigel et Jackle, 1990). L'identification d'une centaine de gènes *Fox* différents des levures jusqu'à l'Homme montre que leurs séquences, leurs profils d'expression et leurs fonctions sont très conservés chez les Métazoaires. Ils sont classés en 18 sous-classes (A à Q incluant deux sous-classe L1 et L2) selon leurs séquences en acides aminés et leur domaine de liaison à l'ADN et regroupés en deux classes (Figure 18) (Kaestner *et al.*, 2000 ; Adell et Müller, 2004). La première comprend les facteurs Fox A-G, I-L et Q qui sont caractérisés par une région basique C-terminale du domaine *Forkhead*; la deuxième classe est constituée des membres H et M-P. Chez les organismes dont le génome a été totalement ou partiellement séquencé, il y a une corrélation entre la complexité anatomique et le nombre de gènes *forkhead*: 4 gènes chez les levures, 15 gènes chez le nématode, 20 gènes chez la drosophile et 45 gènes chez l'Homme (Adell et Müller, 2004 ; Katoh et Katoh, 2004). Les protéines Fox montrent une remarquable diversité fonctionnelle et elles ont des rôles clés dans des processus de développement précoces au cours de l'organogenèse et aussi au niveau fonctionnel de la majorité des organes et des tissus chez l'adulte (Carlsson et Mahlapuu, 2002 ; Tu *et al.*, 2006).

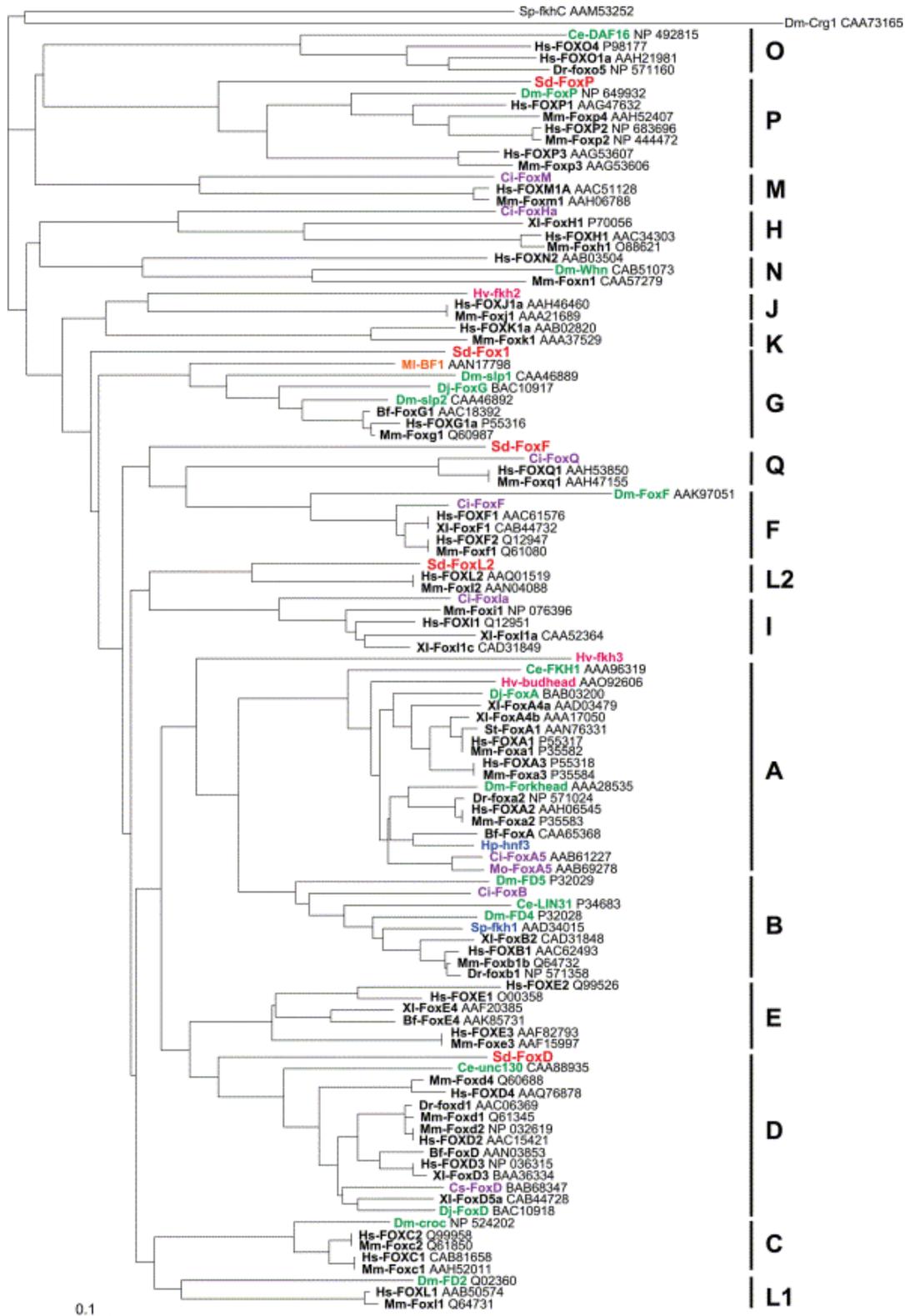


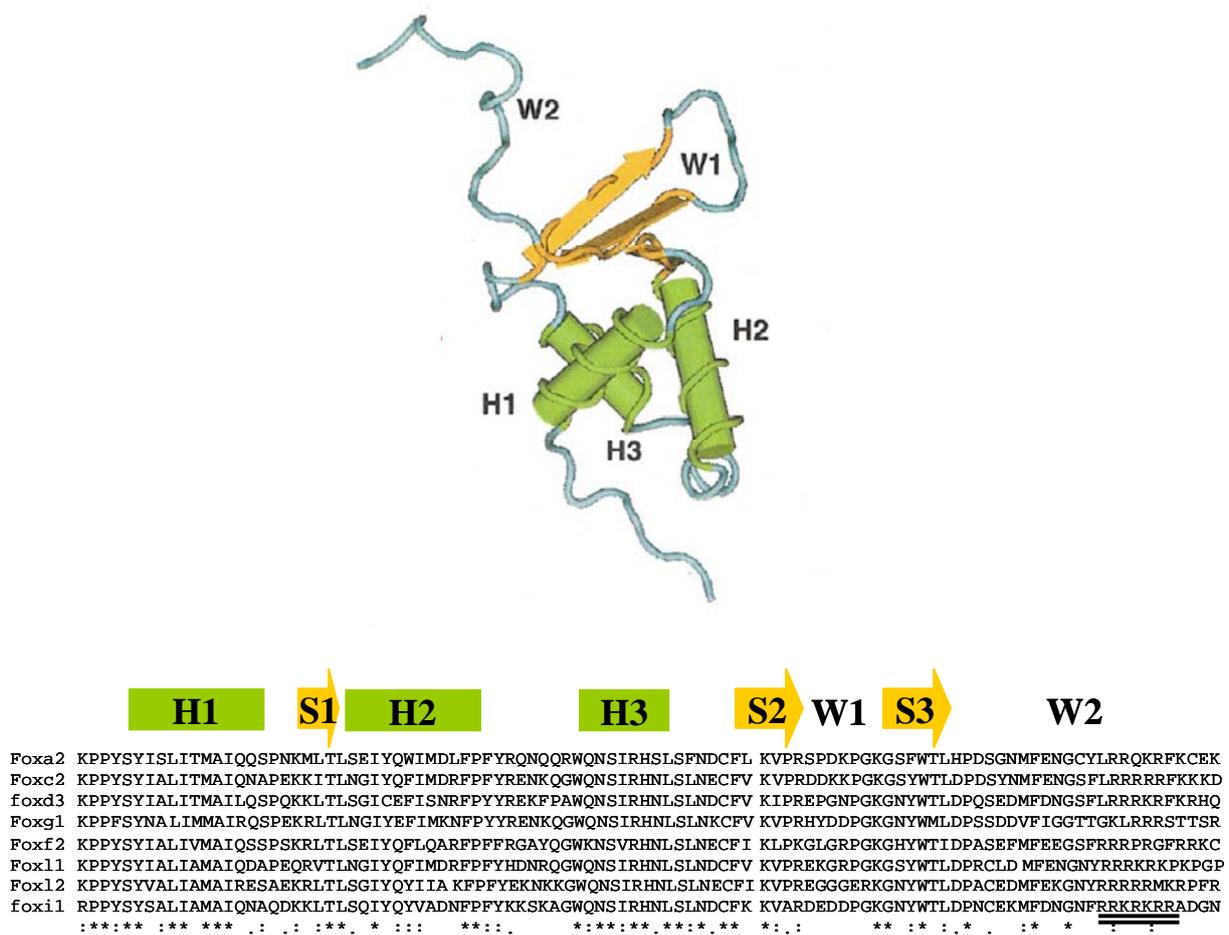
Figure 18 : Analyse phylogénétique des protéines Fox basée sur la séquence en acides aminés du domaine *Forkhead* (d'après Adell et Müller, 2004).

## 2. Structure des facteurs Fox

La famille de gènes *Fox* constitue un sous-groupe de la classe des facteurs de transcription ayant un domaine de liaison à l'ADN du type hélice-boucle-hélice. La structure tridimensionnelle de ce domaine a été décrite en cristallographie et inclut trois hélices  $\alpha$  (H1, H2 et H3), deux boucles (W1 et W2) et trois brins  $\beta$  (S1, S2 et S3) arrangés selon l'ordre H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (Figure 19) (Gajiwala et Burley, 2000; Carlsson et Mahlapuu, 2002). Son interaction avec l'ADN se fait entre la troisième hélice et un grand sillon de l'ADN ainsi qu'entre la deuxième boucle et un petit sillon de l'ADN (Lakhal *et al.*, 2008). Des séquences responsables de la localisation nucléaire (NLS) des facteurs Fox ont été identifiées dans le domaine *Forkhead* au niveau amino- et carboxy-terminal, ce dernier présentant un groupement d'acides aminés basiques caractéristiques des motifs NLS (Carlsson et Mahlapuu, 2002). Outre le domaine de liaison à l'ADN, d'autres régions effectrices de trans-activation ou de trans-répression ont été identifiées chez les membres de la famille Fox et sont peu conservées entre les différents facteurs. L'activation transcriptionnelle a été mise en évidence pour FoxA2, -F1, -F2 et -N1, alors que la trans-répression a été identifiée au niveau des facteurs FoxC2, -D2, -D3 et -G1 (Carlsson et Mahlapuu, 2002 ; Lakhal *et al.*, 2008).

Un des facteurs Fox, Foxl2, est le marqueur le plus précoce de la différenciation ovarienne identifié à ce jour chez les Mammifères (Cocquet *et al.*, 2002). Foxl2 appartient à la première classe des facteurs Fox. Il présente un seul exon et possède des régions conservées en plus du domaine *Forkhead*, l'une riche en alanine et l'autre en proline du côté C-terminal (Baron *et al.*, 2004 ; Uhlenhaut et Treier, 2006) et deux riches en glycine du côté N- et C-terminal (Cocquet *et al.*, 2003 ; Govoroun *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004 ; Alam *et al.*, 2008). La comparaison des séquences protéiques de Foxl2 montre qu'elles sont très conservées avec cependant trois différences observées chez les animaux non mammaliens par rapport aux Mammifères: (i) une diversité de séquence du côté N-terminal; (ii) l'absence d'une région riche en alanine; (iii) l'absence des régions riches en glycine et proline (Cocquet *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007). Ainsi, seuls le domaine *Forkhead* et le côté C-terminal auraient conservé leurs fonctions au cours de l'évolution. Le rôle des régions de répétitions en alanine, proline et glycine n'est encore identifié, mais les régions riches en alanine sont souvent associées à la répression transcriptionnelle. La présence de ces régions dans plus de 300 gènes

chez l'Homme, dont plusieurs facteurs de transcriptions, suggère un rôle dans le contrôle transcriptionnel (Brown et Brown, 2004 ; Uhlenhaut et Treier, 2006).



**Figure 19 : Structure tridimensionnelle et alignement des séquences en acides aminés du domaine *Forkhead* de liaison à l'ADN de différentes protéines Fox.**

La structure en 3D représente le facteur Foxc2 défini à partir de données en RMN (Van Dongen *et al.*, 2000) et montre le motif hélice-boucle-hélice avec les hélices H1, H2 et H3 (en vert), les boucles W1 et W2 et les brins  $\beta$  antiparallèle (en orange). L'alignement des séquences des domaines *Forkhead* montre les régions conservées des différentes structures secondaires et les séquences responsables de la localisation nucléaire (séquences NLS soulignées). Les acides aminés conservés entre toutes les séquences sont indiqués par des étoiles [modifiée d'après Carlsson et Mahlapuu (2002)].

### 3. Expression de *Foxl2* et rôle dans la différenciation ovarienne

Le facteur *Foxl2* est détecté précocement dans l'ovaire aux alentours de la période du déterminisme sexuel chez la souris, le poulet et la tortue, trois espèces ayant différents types de déterminisme sexuel (Cocquet *et al.*, 2002, 2005 ; Loffler *et al.*, 2003). Chez la souris, les transcrits de *Foxl2* sont exprimés initialement dans les cellules mésenchymateuses précurseurs des cellules folliculaires autour de 12,5 jpc, c'est-à-dire juste après la période du déterminisme sexuel qui a lieu à 11,5 jpc, puis leur expression est maintenue dans les cellules de la granulosa et diminue aux derniers stades de la folliculogénèse (Schmidt *et al.*, 2004). Des transcrits *Foxl2* sont également détectés dans les cellules germinales et somatiques des ovaires en développement et matures mais dans ce cas ils ne sont traduits que dans les cellules somatiques (Cocquet *et al.*, 2002; Loffler *et al.*, 2003). Des souris transgéniques qui ont une mutation homozygote de *Foxl2* montrent une malformation craniofaciale et une infertilité femelle (Schmidt *et al.*, 2004 ; Uhlenhaut et Treier, 2006). L'analyse des phénotypes murins correspondants révèle que *Foxl2* est essentiel à la différenciation des cellules de la granulosa (Schmidt *et al.*, 2004). Des souris femelles XX transgéniques ayant une invalidation de *Foxl2* par délétion entière de sa région codante ne forment pas de follicules ovariens et montrent une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la différenciation mâle tels que *Sox9*, *Fgf9*, *Dhh*, *Wt1*, *Sf1*, *Gata4* et *Dmrt1*. *Foxl2* jouerait donc le rôle d'un répresseur de la cascade de la différenciation testiculaire (Ottolenghi *et al.*, 2005). L'invalidation simultanée des deux facteurs ovariens *Foxl2* et *Wnt4* chez des souris génétiquement femelles conduit à la formation chez les nouveaux nés de tubules testiculaires contenant des spermatogonies (Ottolenghi *et al.*, 2007b). Ces deux gènes interviendraient donc dans le déterminisme sexuel femelle chez les Mammifères.

Chez l'humain, le profil d'expression de *Foxl2* diffère de celui observé chez la souris avec une expression au niveau des crêtes génitales des individus génétiquement femelle avant la période du déterminisme du sexe. Cette expression persiste au niveau de l'ovaire fœtal puis adulte aussi bien dans les cellules folliculaires que dans les cellules du stroma ovarien (Cocquet *et al.*, 2002). Ce profil d'expression suggère, comme chez la souris, un rôle de *Foxl2* dans la différenciation des cellules folliculaires au cours du développement et dans leur maintien durant la vie adulte (Loffler *et al.*, 2003 ; Cocquet *et al.*, 2005). Chez l'Homme et la souris, en plus de l'expression ovarienne, *Foxl2* est détecté au niveau des paupières en développement (Crisponi *et al.*, 2001 ; Adel et Müller, 2004). Des mutations dans la région

codante du gène *Foxl2* chez l'Homme entraînent le syndrome BPES (*Blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome*) qui est une maladie autosomique dominante associée à une malformation des paupières et à un dysfonctionnement ovarien précoce (Crisponi *et al.*, 2001 ; De Baere *et al.*, 2001 ; Prueitt et Zinn, 2001). Des mutations dans la partie 5' non codante de *Foxl2* entraînent le même syndrome, d'où l'existence d'éléments distants régulateurs qui seraient nécessaires à l'expression du gène lui-même. Lorsque ces mêmes régions régulatrices sont délétées chez la chèvre, il y a une diminution de l'expression de *Foxl2* responsable du syndrome PIS (*polled intersex syndrome*) caractérisé par l'absence de cornes et une inversion sexuelle des individus XX (Uhlenhaut et Treier, 2006).

Plusieurs études réalisées chez les Vertébrés non-mammaliens, Oiseaux, poissons Téléostéen, Chéloniens et Amphibiens montrent une forte expression de *Foxl2* dans les gonades femelles comme c'est le cas chez les Mammifères (Cocquet *et al.*, 2002; Loffler *et al.*, 2003). Chez le poulet, *Gallus domesticus*, *Foxl2* est exprimé entre 4,7 et 14 jours d'incubation des œufs, c'est à dire aux alentours de la période de la différenciation sexuelle, au niveau de la medula de l'ovaire (Govoroun *et al.*, 2004). Après l'éclosion, la protéine Foxl2 est détectée dans les cellules folliculaires non différenciées des follicules primordiaux. Dans l'ovaire adulte, la protéine est également détectée dans les cellules de la thèque interne mais à une concentration plus faible que pour les cellules de la granulosa. Des transcrits *Foxl2* sont également détectés dans les ovocytes en maturation et matures. Ces résultats suggèrent, chez les Oiseaux, l'implication de Foxl2 dans la régulation précoce du développement ovarien et dans la maturation des ovocytes chez les adultes (Govoroun *et al.*, 2004).

Chez le poisson tilapia *Oreochromis niloticus* et le mérou *Epinephelus merra*, *Foxl2* est exprimé au niveau du cerveau, de l'hypophyse, des branchies et des gonades, avec un taux d'expression plus élevé dans les ovaires par rapport aux testicules et aux autres tissus (Wang *et al.*, 2004). L'expression ovarienne de *Foxl2* chez le tilapia comme chez le medaka *Oryzias latipes* est observée très tôt au cours de la différenciation gonadique dans les cellules somatiques entourant les cellules germinales et elle persiste chez l'adulte (Wang *et al.*, 2004; Nakamoto *et al.*, 2006). Dans l'ovaire adulte, les transcrits *Foxl2* sont détectés dans les cellules de la granulosa dans les follicules en prévitellogenèse et en vitellogenèse mais pas au niveau des follicules matures. Le mérou, poisson protogyne, présente lors du changement de sexe, une diminution de l'expression de *Foxl2* facilitant ainsi la dégénérescence des follicules (Alam *et al.*, 2008). Tout ceci suggère que *Foxl2* interviendrait lors de la différenciation des cellules de la granulosa chez ces poissons (Nakamoto *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Le cardeau hirame, *Paralichthys olivaceus* présente un déterminisme chromosomique du sexe de type XY influençable par la température. Chez celui-ci, comme chez la tortue marine, *Trachemys scripta*, qui présente un déterminisme du sexe dépendant de la température, *Foxl2* est détecté dans les cellules interstitielles des gonades génétiquement femelles incubées à des températures favorisant le développement femelle mais pas aux températures favorisant le développement mâle (Loffler *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2007). Ceci suggère un rôle du facteur Foxl2 durant la différenciation gonadique femelle chez les espèces présentant un déterminisme du sexe dépendant de la température (Yamaguchi *et al.*, 2007).

L'importance du facteur Foxl2 au cours du développement est également observée chez le xénope, *Xenopus laevis*, qui présente un taux élevé des transcrits *xlFoxl2* maternels. Ceux-ci diminuent rapidement aux premiers stades de clivage puis la transcription zygotique se met en place au cours de la neurogenèse et l'expression de *Foxl2* reste localisée dans la partie dorsale des placodes épibranchiales (Pohl *et al.*, 2004). Chez la grenouille *Rana rugosa*, *Foxl2* présente, comme chez les autres Vertébrés, une expression plus forte dans les ovaires par rapport aux autres tissus, au cours du développement et à l'âge adulte. Cette expression gonadique est localisée au niveau des cellules somatiques entourant les ovocytes (Oshima *et al.*, 2008).

Chez les différentes espèces étudiées, il a été démontré une co-localisation cellulaire de Foxl2 et de l'aromatase ainsi qu'une corrélation entre leurs expressions (Govoroun *et al.*, 2004 ; Pannetier *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007). Des expériences de transfections transitoires et de retard sur gel montrent que Foxl2 active la transcription *in vitro* de l'aromatase en se liant directement à son promoteur au niveau d'un élément de réponse forkhead (Pannetier *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007 ; Oshima *et al.*, 2008). Il y aurait donc une régulation de l'expression du gène de l'aromatase par le facteur Foxl2 durant la différenciation ovarienne. L'injection d'un inhibiteur de l'aromatase, le fadrozole, avant la période du déterminisme sexuel chez le poulet induit une diminution de l'expression de *Foxl2* mettant aussi en évidence une boucle de régulation entre Foxl2 et l'aromatase (Hudson *et al.*, 2005). Cette diminution pourrait être liée directement à l'inhibition de l'aromatase due à l'arrêt de la boucle de régulation positive par l'aromatase et les estrogènes, soit indirectement par l'influence des facteurs testiculaires comme Sox9 et Dmrt1 au niveau de la gonade masculinisée. Chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, il existe deux paralogues de Foxl2, Foxl2a et Foxl2b (Baron *et al.*, 2004). Chez cette espèce, un traitement féminisant à base d'œstrogènes induit une augmentation de l'expression de

*Foxl2a* et *b* chez des animaux génétiquement mâles et inversement, comme chez le poulet, un traitement aux androgènes ou avec un inhibiteur de l'aromatase, l'androstentrione, régule négativement la transcription des deux paralogues *Foxl2* chez les femelles. Il semble donc exister une relation étroite entre l'expression de *Foxl2*, de l'aromatase et des œstrogènes chez les poissons (Baron *et al.*, 2004). Une autre cible du facteur Fox, le gène *StAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*), a été étudiée chez l'Homme (Pisarska *et al.*, 2004 ; Uhlenhaut et treier, 2006). Il a été montré par co-transfection que *Foxl2* réprimerait par sa région C-terminale riche en alanine et proline la transcription de ce gène en interagissant directement avec le promoteur de celui-ci (Pisarska *et al.*, 2004). La protéine *StAR* est un marqueur de la différenciation des cellules de la granulosa et régule la translocation du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie, où par la suite, il est transformé en prégnénolone (Lakhal *et al.*, 2008). Chez les Vertébrés, *Foxl2* semble donc être un régulateur de la stéroïdogénèse en activant l'expression de l'aromatase et en réprimant celle de *StAR* (Pisarska *et al.*, 2004; Lakhal *et al.*, 2008). Chez la souris, une autre cible du facteur *Foxl2* au niveau d'un autre tissu, l'hypophyse, est le récepteur au GnRH (*GnRHR* pour *gonadotropin releasing hormone receptor*). Dans ce cas *Foxl2*, contrairement à l'effet sur *StAR*, active la transcription de *GnRHR* via sa région régulatrice GRAS (*GnRH-receptor activating sequence*) (Ellsworth *et al.*, 2003).

Des orthologues de *Foxl2* ont également été mis en évidence chez des Invertébrés. Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, *SpFoxl2* est fortement exprimé durant les 72 premières heures de développement (Tu *et al.*, 2006). Chez l'éponge *Suberites domuncula*, cinq membres de la famille Fox ont été identifiés dont *Sd-Foxl2* exprimé dans les noyaux de tous les types cellulaires étudiés. Ceci suggère que, malgré un grand degré d'homologie avec le gène *Foxl2* humain et la spécificité d'expression de ce dernier chez les Vertébrés, *Sd-Foxl2* présente une fonction ubiquiste chez l'éponge (Adell et Müller, 2004).

## VII. Problématique de l'étude et objectifs

Ce travail s'inscrit dans l'une des thématiques générales de l'UMR qui est la physiologie de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Cependant, c'est la première thèse développée sur la recherche de facteurs moléculaires associés à la différenciation gonadique de l'huître.

L'huître creuse connaît un élevage intensif nécessitant un approvisionnement important en juvéniles issus d'un captage naturel ou d'un élevage en écloserie. La production en conditions contrôlées nécessite une connaissance accrue de la physiologie de la reproduction de cette espèce afin, par exemple, d'éviter des déséquilibres de *sexe-ratio* des géniteurs. L'huître est un hermaphrodite successif protandre irrégulier avec une majorité des juvéniles qui mûre en mâles, lesquels peuvent, au cours de leur vie adulte, donner ensuite des femelles. Cependant, ces changements sont très aléatoires; en effet, certains mâles resteront des mâles et certaines femelles pourront redonner des mâles. Les mécanismes qui contrôlent la première différenciation gonadique et les réversions sexuelles chez l'adulte restent inconnus. Cette absence d'information est en partie liée aux particularités de l'huître creuse telles que l'absence de chromosomes sexuels différenciables et de dimorphisme sexuel, des gonades diffuses et invaginées dans le tissu de réserve, un cycle de reproduction annuel qui implique des animaux sexuellement différenciables uniquement à partir d'un stade avancé de la gamétogenèse par des méthodes parfois invasives.

Un déterminisme génétique du sexe ayant été mentionné par Guo *et al.* (1998), l'objectif de ce travail de thèse consiste en l'identification de facteurs moléculaires de la différenciation gonadique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours de son cycle gamétogénétique adulte et au cours de son développement.

La mise en évidence par Raymond *et al.* (1998) d'une conservation, chez les Invertébrés et les Vertébrés étudiés, de facteurs situés en aval des cascades moléculaires du déterminisme sexuel, nous a conduit à rechercher un facteur homologue à *Dmrt1* chez l'huître. Le premier chapitre de cette thèse présente la caractérisation d'un facteur apparenté à la famille DM, nommé *Cg-DMI*, et l'étude de son expression par RT-PCR en temps réel, par hybridation *in situ* au cours du développement et du cycle adulte de l'huître. L'expression protéique a également été analysée en immunohistochimie et Western Blotting.

Dans le but de poursuivre la caractérisation de facteurs qui permettraient la mise en évidence d'un dimorphisme sexuel précoce, nous avons également ciblé notre recherche sur un facteur apparenté à *Foxl2* en tant que marqueur précoce de la différenciation ovarienne, conservés des Cnidaires au Mammifères (Nakamoto *et al.*, 2006). Le deuxième chapitre de cette thèse présente la caractérisation d'un tel facteur, qui a été nommé *Cg-Foxl2*, et l'étude de son expression au cours du développement et du cycle adulte de l'huître.

La recherche de tels facteurs chez l'huître présente de nombreux intérêts, tant sur le plan fondamental qu'appliqué. Cela permettra d'une part de déterminer, à un stade précoce du développement ou du cycle gamétogénétique, le sexe de l'animal et de prévoir, ou de maîtriser, son évolution au cours des années afin de répondre à une demande des professionnels. D'autre part, cela enrichira nos connaissances sur la biologie de la reproduction intégrée pour l'ensemble des Bilatériens grâce à l'acquisition de données moléculaires chez les mollusques qui appartiennent au clade évolutif des Prostomiens Lophotrochozoaires dépourvus de réel organisme modèle.

## I. Matériel biologique

### 1. Animaux

Les huîtres *Crassostrea gigas* adultes et à divers stades de développement proviennent de l'écloserie SATMAR (Société Atlantique de Mariculture) de Barfleur (50), à l'exception de celles utilisées pour les expériences de Western Blotting qui sont issues de l'entreprise le GAEC de Tatihou localisée à Saint Vaast-la-Hougue (50). Des rats et souris matures, respectivement âgés de 4 mois et 1,5 ans, et issus respectivement d'un élevage à l'IUT de Caen et de Rennes ont été utilisés comme contrôles positifs en Western Blotting et immunohistochimie.

Les huîtres adultes sont issues de familles de géniteurs contrôlées (nommées 01-3, 02-Sé1 et 02-Sé2). Les huîtres du lot 01-3 nées en 2001 ont été élevées en stabulation à l'écloserie et celles des lots 02-Sé1 et 02-Sé2 nées en 2002, sur le parc de Saint Vaast-la-Hougue «Le Cul de Loup». Un sexage et suivi du *sexe-ratio* des trois familles ont été réalisés à l'écloserie (familles 01-03 et 02-Sé1 en 2004 et 2005 et famille 02-Sé2 en 2004) ou au laboratoire (famille 02-Sé2 en 2005). La détermination du sexe des animaux a été effectuée (i) à l'écloserie par observation au microscope photonique de frottis de biopsies de gonades matures ou par prélèvement des gamètes émis lors des pontes et (ii) au laboratoire par analyse histologique des gonades matures après sacrifice des animaux. L'évolution du *sexe-ratio* de chaque famille entre 2004 et 2005 est illustrée dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Evolution du *sexe-ratio* des familles de géniteurs adultes 01-3, 02-Sé1 et 02-Sé2 entre 2004 et 2005.**

Lot	<i>Sexe-ratio</i> (% de femelles)	
	2004	2005
<b>01-3 (dominance femelle)</b>	80	63
<b>02-Sé1 (dominance mâle)</b>	14	32
<b>02-Sé2 (dominance mâle)</b>	0	20

Les divers stades de développement de *C. gigas*, à savoir des larves véligères (7j), pédivéligères (14j), métamorphosées (21j) et du naissain (1 – 1,5 – 2 – 3 – 3,5 – 4 mois), proviennent d'un croisement effectué entre des individus issus de deux familles sélectionnées

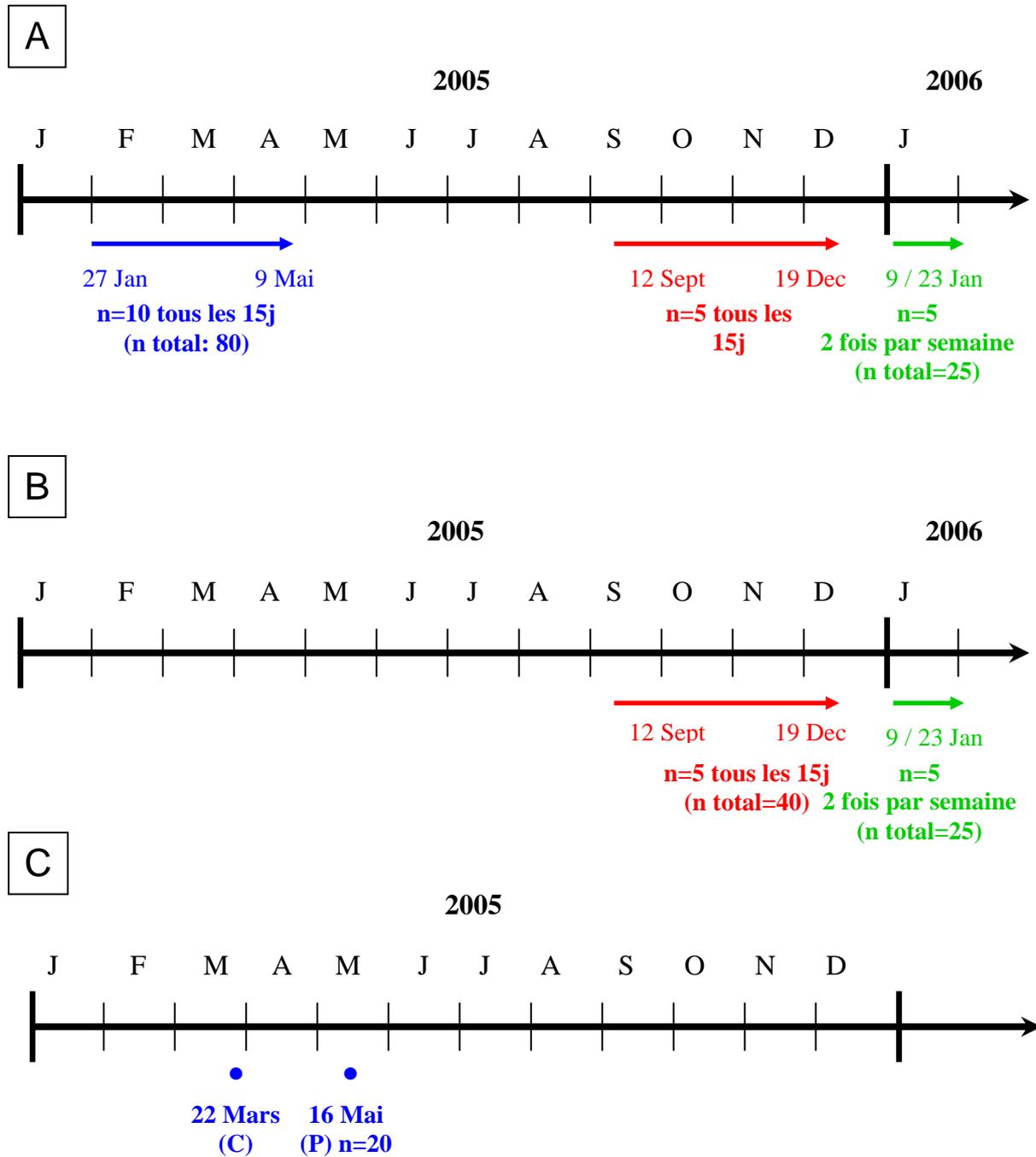
et présentant un déséquilibre de *sexe-ratio*, l'une en faveur des mâles (02-Sé1, mentionnée précédemment), l'autre en faveur des femelles (03 01/01, 57% de femelles en 2006). Chaque stade de développement a été déterminé à l'écloserie par examen au microscope optique après «filtration» sur un tamis de maillage adéquat. Ils ont été collectés entre Juin et Octobre 2007.

## 2. Prélèvement d'échantillons biologiques

Les prélèvements d'échantillons biologiques ont été réalisés pour les trois familles selon le calendrier suivant (Figure 20):

Pour le lot 01-3, en 2005, 10 individus ont été prélevés tous les 15 jours de la semaine 4 (27 Janvier) à la semaine 19 (9 Mai) soit un total de 80 individus. La même année, pour ce lot, comme pour le lot 02-Sé1, 5 individus ont été prélevés tous les 15 jours de la semaine 37 (12 Septembre) à la semaine 51 (19 Décembre) soit un total de 40 individus par famille. En 2006, pour ces deux lots, 5 individus ont été prélevés 2 fois par semaine de la semaine 2 (9 Janvier) à la semaine 4 (23 janvier), soit un total de 25 individus par famille. Pour le lot 02-Sé 2, 20 animaux ont été conditionnés en semaine 12 (22 Mars 2005) puis prélevés en semaine 20 (16 Mai 2005). Les dates de prélèvement de ces lots ont été définies dans le but d'obtenir des informations sur les réversions sexuelles lors de la transition « repos sexuel / reprise du cycle gamétogénétique ».

Les prélèvements ont été réalisés sur des animaux fraîchement ouverts. Pour les expériences de biologie moléculaire, les différents tissus adultes (gonades, branchies, glande digestive, manteau, muscle adducteur et palpes labiaux) ont été disséqués en conditions RNase free et immédiatement plongés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux ou de l'ADN génomique. Pour les analyses histologiques, en immunomarquage et en hybridation *in situ*, une zone d'environ 1cm d'épaisseur a été prélevée entre les branchies et les palpes labiaux en conditions RNase free.



**Figure 20 : Calendrier des prélèvements d'échantillons d'huîtres adultes des familles 01-03 à dominance femelle (A), 02-Sé1 (B) et 02-Sé2 (C) à dominance mâle.**

(C): conditionnement; j: jours; n: nombre d'individus échantillonnés; (P): prélèvement

## II. Techniques histologiques

Une analyse histologique a été réalisée sur les animaux des trois familles afin de mettre en évidence le stade gamétogénétique de chacun.

### 1. Préparation et coupe des échantillons biologiques

Les échantillons prélevés sont fixés dans une solution de Davidson (10% (v/v) de glycérol ; 20% (v/v) de formaldéhyde à 37% ; 30% (v/v) d'éthanol à 95% ; 30% (v/v) d'eau de mer filtrée et extemporanément 10% (v/v) d'acide acétique glacial) pendant 24 heures à 4°C. La déshydratation est ensuite réalisée dans des bains successifs d'éthanol 70, 90 et absolu de 48 heures chacun puis de butanol pendant une semaine. Les pièces sont enfin imprégnées 48 heures puis incluses dans de la paraffine à 60°C et conservées à 4°C dans un environnement RNase free.

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2135) puis sont montées sur lames non traitées pour la coloration histologique et l'immunohistochimie et traitées à l'aminosilane pour l'hybridation *in situ*.

### 2. Coloration au trichrome de Papanicolaou (Gabe, 1968)

Ce protocole a pour but de colorer les différents tissus. Les coupes sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique (Rotihistol®) (2x5 minutes) puis réhydratées dans des bains d'alcool successifs (100, 95 et 70%) puis d'eau distillée de 5 minutes chacun. Les lames sont ensuite colorées dans les bains suivants: Hématoxyline de Groat (coloration des noyaux) (1 minute), eau courante (5 minutes), Eosine Y à 1% (coloration des cytoplasmes) (8 minutes), Acide phosphomolybdique à 1% (1 minute), Vert lumière à 0,2% (coloration du muscle et du tissu conjonctif) (1 minute). Elles sont ensuite déshydratées par deux bains d'une minute d'éthanol absolu puis traitées dans 2 bains de 5 minutes de Rotihistol®. Les lames sont alors montées dans une résine (Rotihisto-kit®) entre lame et lamelle et séchées à l'étuve à 55°C pendant 24 heures.

### III. Techniques de biologie moléculaire

#### 1. Préparation des ARN

##### 1.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du KIT TRI REAGENT™ (Sigma®). Les tissus prélevés et congelés à -80°C sont broyés dans de l'azote liquide (100 mg / échantillon) et homogénéisés avec 1 volume de réactif TRI REAGENT (mélange de thiocyanate de guanidine et de phénol) et 0,2 volume de chloroforme. Après centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse est prélevée et les acides ribonucléiques sont précipités par 0,5 volume d'isopropanol par centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après rinçage à l'éthanol 75% et centrifugation à 7500g pendant 5 minutes à 4°C, le culot est séché puis repris dans 0,05 volume d'eau traitée au DEPC 0,02 % (DiEthylPyroCarbonate) (Sigma®).

##### 1.2. Traitement à la DNase

Les ARN totaux sont traités à la DNase I RQI (Déoxyribonucléase I RNA-Qualified I) (Promega) qui digère l'ADN génomique contaminant. Le mélange réactionnel (10 µL au total) contient 1 unité de DNase I (1 U/µL), 0,1 volume de tampon de réaction 10x (400 mM Tris-HCl pH 8 ; 100 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) et 1 µg d'ARN totaux. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la digestion est arrêtée par addition de 0,1 volume d'une solution de blocage (20 mM EGTA, pH 8) en chauffant 10 minutes à 70°C, puis les ARN totaux sont immédiatement placés dans la glace.

##### 1.3. Qualité et quantité des ARN

La qualité des ARN totaux est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (détails III. 8.). La quantité d'ARN est déterminée par mesure spectrophotométrique à 260 nm. Une unité d'absorption optique ( $A_{260\text{nm}}$ ) correspond à une concentration en ARN de 40µg/mL. Le degré de pureté des ARN est évalué par le rapport  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  avec une valeur optimale de 2.

#### 1.4. Purification des ARN polyadénylés à partir des ARN totaux

Les ARN polyadénylés sont purifiés à partir des ARN totaux par affinité à l'aide de billes magnétiques couplées de manière covalente à un oligonucléotide de 25 désoxythymidines (Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT<sup>™</sup> KIT). Après dénaturation des structures secondaires par chauffage à 70°C pendant 5 minutes, les ARN totaux sont hybridés avec les billes magnétiques oligo-(dT)<sub>25</sub> (5 mg/mL) dans le tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA pH 8; 1% LiDS; 5 mM DTT). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les ARN polyadénylés sont capturés à l'aide d'un support aimanté puis lavés trois fois dans un tampon de lavage A (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M LiCl ; 1 mM EDTA; 1 % LiDS) et une fois dans un tampon de lavage B (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA). Les ARN polyadénylés sont libérés des oligo-(dT)<sub>25</sub> par une baisse de la force ionique grâce à une incubation à 65°C de 2 minutes dans un tampon d'élution Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

## 2. Rétrotranscription des ARN polyadénylés en ADN<sub>c</sub>

Après une étape de dénaturation des ARN de 5 minutes à 65°C, 1 µg d'ARN polyadénylés sont rétrotranscrits dans un volume final réactionnel de 25 µL, en présence de 200U de transcriptase inverse M-MLV (Promega<sup>®</sup>), 40 unités de RNAsin (Ribonuclease inhibitor) (Promega<sup>®</sup>), 10 mM DTT, 0,5 µg d'amorce oligo-(dT)<sub>15</sub>, 0,5 mM de chaque désoxynucléotide (dNTP), 50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl et 3 mM MgCl<sub>2</sub> pendant 90 minutes à 37°C.

Le contrôle de la qualité des ADN<sub>c</sub> est effectué en PCR (détails III. 5.) par amplification de l'ADN<sub>c</sub> de l'actine (GenBank accession n° **AF026063**) ou du facteur d'élongation (GenBank accession n° **BQ426516**) de *C. gigas* qui sont ubiquistes à l'ensemble des tissus avec les amorces spécifiques ActF et ActR ou qfElongI et qrElongI (Tableau 3) respectivement. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (détails III.8.).

**Tableau 3 : Présentation des séquences des diverses amorces utilisées.**

Amorces	Séquences
DMRT1-s	5'-TGCCAAAGTGTGCCAGATGT(A/C)G(A/C/G/T)AA(C/T)CA(C/T)GG-3'
DMRT1-a	5'-GGATTCCCAGCTCCTCCTC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(C/T)TG-3'
T2S	5'-CGGGTGGTGTCCGGCCTTGAAAGGT-3'
T2SN	5'-CGGCCTTGAAAGGTCACAAACGGTACTG-3'
T2A	5'-GCGCACACACAGTCCCTCCATCTACAG-3'
T2AN1	5'-CCCTCCATCTACAGTACCGTTTGTGA-3'
T2AN2	5'-TTCAAGGCCGGACACCACCCGTGAT-3'
COM5	5'-CATGCGAGCATCCGATAGATAACCCACGC-3'
COM3AS	5'-GAATCGGCTGGTGAATGCGTCCTCT-3'
COM3S	5'-AGAGGACGCATTCACCAGCCGATTC-3'
SP312	5'-GTTACCTGCCAGAAGACCTTCCTCAAAG-3'
DMS	5'-CCATGGAGTGGTGTCCGC-3'
DMASB	5'-GTTGCCTTTCTGCTATCAGGG-3'
SPL52	5'-CCAACGAAATCGGCAAACACACA-3'
HDMSB	5'-GGGAAGTATGGGTGGAAGAGG-3'
HDMASB	5'-AAGGTTTGGCGCCATTTGA-3'
3UTRas	5'-TGACATATAAGGTCAGTGAAATAACC-3'
qfElongI	5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3'
qrElongI	5'-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3'
ActF	5'-CTATGTAGGAGACGAGGCC-3'
ActR	5'-GCCACTTGATGGCCAGAAGG-3'
Foxl2SN5	5'-AAGAA(C/T)A(A/G)(A/G)AA(A/G)GG(A/C/T)TGGCA(A/G)AA-3'
Foxl2AS3	5'-AGTT(C/G/T)CC(A/C/T)TT(C/T)TC(A/G)AACAT(A/G/T)TC-3'
Fox1S	5'-CAGTATTCGCCACAATTTGAGCTTAAA-3'
Fox1SN	5'-AAAGTTCCTCGTGAAGGTGGAGA-3'
Fox1AS	5'-CTCGAATGCCGGGTCCAGGGTCCAGAA-3'
Fox1ASN	5'-TCTCCACCTTCACGAGGAACTTT-3'
Cg-FoxL2S5	5'-CACGGACATTTTCGGTTCTCA-3'
Cg-FoxL2AS3	5'-TGTCTGTCAGTTCTTGGCGTCT-3'
qFoxl2S2	5'-AATATCAGGGATGGGCACAA-3'
qFoxl2AS1	5'-GTCCTTGGGTGCAGGA ACTA-3'

### 3. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADNg est effectuée à partir des branchies de *Crassostrea gigas*. Les tissus sont broyés dans de l'azote liquide, puis repris dans un volume du tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8; 100 mM de NaCl; 1% SDS; 0,7 µL/mL de β-mercaptoéthanol) et incubés à 65°C pendant 5 à 10 minutes. Les protéines sont ensuite extraites par ajout de 0,5 volume de phénol/chloroforme (v/v) pH 8, suivi d'une incubation de 5 minutes à température ambiante. Après addition d'acétate de potassium (concentration finale 5M) suivie de 10 minutes d'incubation dans de la glace et d'une centrifugation de 15000g de 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse est collectée et les acides nucléiques sont précipités par l'ajout de 0,75 volume d'isopropanol froid. Les fibres d'ADN sont alors prélevées par enroulement avec une tige de verre, lavées dans un volume d'éthanol 70%, séchées, reprises dans un volume de R40 [T<sub>10</sub>E<sub>10</sub> (10 mM Tris-HCl ; pH 8; 10 mM EDTA), 40 µg/mL RNase A], puis incubées 5 minutes à 94°C et 30 minutes à 37°C. L'ensemble est ensuite supplémenté en NaCl (concentration finale 0,5 M) et l'ADN est extrait par ajout de 0,5 volume de phénol/chlorophorme (v/v) pH 8, suivi d'une centrifugation à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est repris dans un volume de chloroforme et centrifugé à 500g pendant 5 minutes à 4°C. L'ADN est précipité par 1,5 volumes d'éthanol 75% et collecté par centrifugation à 1200g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est séché puis repris dans un volume de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA).

La qualité et quantité de l'ADN génomique sont déterminées par spectrophotométrie et par visualisation sur un gel d'agarose.

### 4. Choix des amorces

Les amorces dégénérées sont désignées selon deux stratégies, soit manuellement dans les régions conservées identifiées par alignement des séquences protéiques de Dmrt1 ou Foxl2 de Vertébrés et d'Invertébrés à l'aide du logiciel ClustlaW (Thompson *et al.*, 1994), soit par la stratégie de CODEHOP (Consensus-DEgenerated Hybrid Oligonucleotide Primers) (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) (Rose *et al.*, 1998). Les amorces sont alors déduites à partir de zones conservées et sont composées d'une partie 5' longue (18-25 pb) non dégénérée et d'une partie 3' courte (11-12 pb) dégénérée.

Les amorces spécifiques utilisées en RT-PCR sont désignées à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) selon une taille, température de fusion ( $T_m$ ) et pourcentage en oligonucléotides GC fixés, permettant l'amplification d'un fragment de la taille voulue.

Les amorces de PCR en temps réel utilisées ont été dessinées selon les recommandations générales fournies par Biorad® de façon à limiter la formation de dimères d'amorces pendant la réaction de polymérisation en chaîne, à savoir, un amplicon court de 75 à 150 pb, 30 à 70 % d'oligonucléotides GC, une température de fusion supérieure à 60°C, une taille d'amorces entre 18 et 20 pb, limiter les zones de structures secondaires ainsi que les successions d'un même nucléotide (3 au plus).

Le calcul de la  $T_m$  d'une amorce donnée est réalisé par le site internet <http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/PCRProg.html>.

## 5. Réactions de PCR

Les réactions d'amplifications géniques *in vitro* sont réalisées dans un volume total de 50  $\mu$ L. Le mélange réactionnel contient 100 ng d'ADNg ou de 10 à 20 ng d'ADNc, 200  $\mu$ M de chaque dNTP, 5  $\mu$ L de tampon de réaction (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100), 5 pmoles de chaque amorces oligonucleotidiques (Tableau 3), une unité de *Taq* ADN polymérase (Promega®) et de 2 à 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Quarante cycles comprenant chacun une étape de dénaturation (30 secondes à 95°C), une étape d'hybridation des amorces (1 minute à une température choisie en fonction de la  $T_m$  des amorces) et une étape d'élongation (60 à 90 secondes à 72°C) sont réalisés. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## 6. Extension de l'ADNc par RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends PCR)

Afin d'amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes des fragments d'ADNc caractérisés de gonade d'huître et de naissain, la technique de RACE-PCR, décrite originellement par Frohman *et al.* (1988), a été mise en œuvre à l'aide du kit GeneRacer™ Kit (Invitrogen®). Le principe de cette technique consiste à lier aux ARN totaux un adaptateur d'oligonucléotide de séquence connue au niveau des parties 5' et 3' puis à amplifier en PCR les fragments inconnus grâce à des amorces placées, d'une part sur l'oligonucléotide ajouté, et

d'autre part sur la séquence connue (Figure 21). Plusieurs étapes sont nécessaires, notamment afin de lier l'oligonucléotide en 5' des ARN.

### **6.1. Déphosphorylation des ARN**

Deux cent cinquante ng d'ARN polyadénylés sont déphosphorylés par ajout de 10 unités de phosphatase intestinale de veau (CIP) en présence de 40 unités de Rnase Out dans un volume réactionnel de 10  $\mu$ L. Après agitation, le mélange réactionnel est incubé 1 heure à 50°C.

Les ARN sont alors précipités afin d'éviter toute interférence avec l'enzyme et son tampon lors des étapes suivantes. Ainsi, le volume du mélange réactionnel est porté à 100  $\mu$ L avec de l'eau DEPC. Après ajout d'un volume de mélange phénol/chloroforme (v/v: 1:1) la solution est centrifugée à 10000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités par ajout de 20  $\mu$ g de glycogène de moule, 0,3 M d'acétate de sodium pH 5,2, et 2 volumes d'éthanol 95%. Après 10 minutes dans la glace, les ARN sont culottés par centrifugation (15000 g, 20 minutes, 4°C). Le culot est lavé à l'éthanol 70% et de nouveau centrifugé pendant 2 minutes à 4°C. Les ARN sont alors séchés à température ambiante pendant quelques minutes puis resuspendus dans 7  $\mu$ L d'eau DEPC.

### **6.2. Clivage de la coiffe**

Les ARN déphosphorylés sont mis en présence de 0,5 unité de pyrophosphatase acide provenant de plants de tabacs (TAP), 40 unités d'inhibiteur de ribonucléases et 1  $\mu$ L de tampon adéquat. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C. Les ARN sont ensuite à nouveau précipités.

### **6.3. Ligation de l'adaptateur oligoribonucléique**

Les 7  $\mu$ L d'ARN dépourvus de leur coiffe et 0,25  $\mu$ g d'oligoribonucléotides lyophilisés sont incubés 5 minutes à 70°C afin de supprimer les structures secondaires. Cinq unités de T4 ARN ligase ainsi que 40 unités de RnaseOut, 10 nmole d'ATP et 1  $\mu$ L de tampon sont ajoutés au mélange précédent. La réaction est réalisée à 37°C pendant 1 heure. Les ARN sont précipités et le culot est alors repris dans 11  $\mu$ L d'eau DEPC. Un  $\mu$ L est déposé sur gel d'agarose afin de vérifier l'intégrité des ARN.

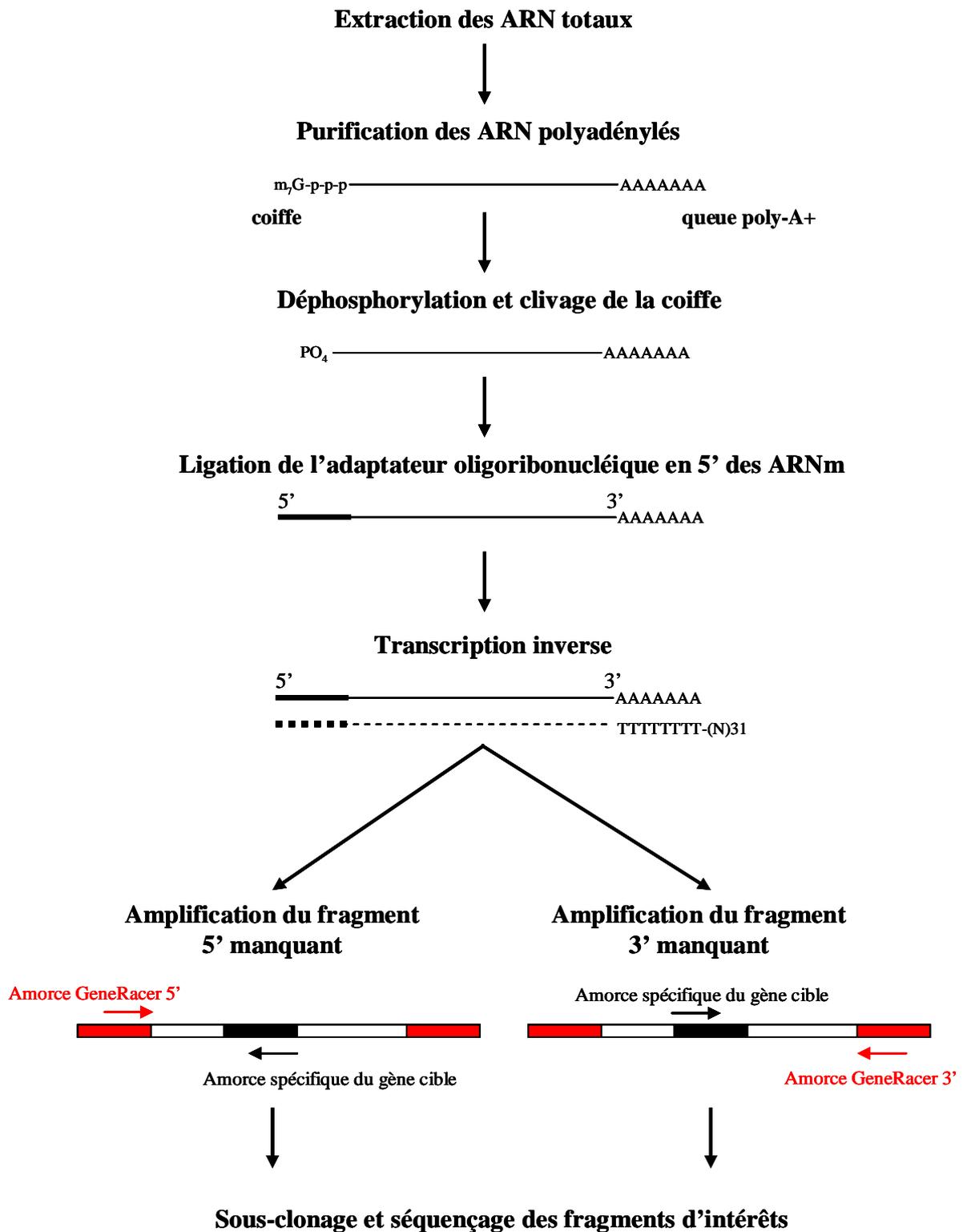


Figure 21 : Principe de la technique de RACE-PCR à l'aide du kit GeneRacer<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>).

#### 6.4. Transcription inverse

Les ARN obtenus sont alors rétrotranscrits en ADN complémentaires. Deux cent cinquante ng d'ARN polyadénylés sont incubés avec 0,5 mM de dNTPs et l'amorce oligo dT fournie (5'- GCTGTCAACGATACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub> -3') à une température de 65°C pendant 5 minutes. Dix mM de DTT, 40 unités de Rnase Out, 1 µL de tampon et 200 unités de la Reverse Transcriptase superscript II (Invitrogen®) sont ajoutés. La réaction est effectuée à 50°C pendant 1 heure. Après inactivation de la réaction, l'ARN est éliminé par ajout de ribonucléase H pendant 20 minutes à 37°C.

#### 6.5. Amplification par PCR

Les ADNc obtenus après rétrotranscription possèdent ainsi deux adaptateurs de séquence complémentaire aux amorces spécifiques du kit GeneRacer™. L'amplification de leurs extrémités 5' et 3' manquantes est réalisée en utilisant une amorce spécifique du transcrit (anti-sens pour la 5'-RACE ou sens pour la 3'-RACE) et une amorce GeneRacer™ 5' Primer (GR5'P) ou 3' Primer (GR3'P) pour la 5'- et 3'-RACE respectivement. La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 50 µL comprenant 2,5 µL d'ADNc dilué au 1/10<sup>ème</sup>, 200 µM de dNTPs, 5 µL de tampon (10x) de réaction de l'enzyme, 10 µM de GR5'P ou GR3'P, 10 µM d'amorce spécifique (T2S et T2A pour *Cg-DMI* ; Fox1S et Fox1AS pour *Cg-Foxl2*) (Tableau 3), 50 mM de MgSO<sub>4</sub> et 2,5 unités de Taq ADN polymérase (Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity, Invitrogen®). L'amplification a été réalisée selon le programme suivant : 1 cycle (96°C/1 minute); 5 cycles (96°C/10 seconde; 70°C/3 minutes); 5 cycles (96°C/10 secondes; 68°C/3 minutes); 35 cycles (96°C/30 secondes; 62°C/30 secondes; 68°C/3 minutes); 1 cycle (68°C/10 minutes). Pour la 5'- comme pour la 3'-RACE, une PCR nichée a été réalisée dans les mêmes conditions avec 1 µL de produit de PCR et des amorces internes anti-sens ou sens spécifiques de la séquence connue (T2SN, T2ASN1 et T2ASN2 pour *Cg-DMI* ; Fox1SN et Fox1ASN pour *Cg-Foxl2*) (Tableau 3). Les produits de RACE-PCR 5' et 3' ont été sous-clonés puis séquencés (détails III.7.).

## 7. Sous-clonage et séquençage

### 7.1. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose

Les fragments d'ADN amplifiés sont purifiés à partir du gel d'agarose à l'aide du kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega®). Après migration sur gel d'agarose contenant 0,1 mg/mL de bromure d'éthidium, chaque fragment d'intérêt est prélevé sous UV 70 % à l'aide d'un scalpel. Le fragment de gel est dissous à 65°C dans une solution composée de 4,5 M d'isothiocyanate de guanidine et 0,5 M d'acétate de potassium pH 5,0. L'ADN est ensuite purifié sur une phase de silice, lavé et enfin élué par de l'eau bidistillée stérile chauffée à 70°C. La quantité d'ADN ainsi récupérée est évaluée par migration d'un aliquot sur gel d'agarose à 1,5 % en présence de concentrations croissantes de marqueur de taille.

### 7.2. Sous-clonage des fragments d'ADN

Le sous-clonage de l'ADN purifié est réalisé dans le plasmide pCR II-TOPO (Invitrogen®) à l'aide du kit TOPO TA Cloning (Invitrogen®) selon les recommandations du fournisseur. Le principe du sous-clonage tient compte du fait que la Taq polymérase ajoute une désoxyadénosine surnuméraire en 3' des fragments d'ADN néosynthétisés et que le vecteur pCR II-TOPO possède au niveau des deux extrémités 5' du site de clonage ouvert une désoxythymidine.

Les fragments d'ADN purifiés sont insérés dans le plasmide vecteur linéarisé et couplé à une topoisomérase en respectant le *ratio* de 1 copie de vecteur pour 1 copie d'insert lors d'une incubation à température ambiante pendant 30 minutes en présence de 0,5 M NaCl et 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Le mélange de ligation, complété à 20 µL, est ensuite dessalé sur colonne (1% d'agarose; 100 mM glucose) pendant 45 minutes à 4°C selon la méthode décrite par Atrazhev et Elliot (1996) afin d'optimiser les conditions d'électroporation.

### 7.3. Transformation de bactéries électrocompétentes

Les bactéries *Escherichia coli* de la souche XL1 blue MRF' (Stratagene®) sont rendues compétentes à l'électroporation par des centrifugations successives à 0°C et dans des quantités décroissantes de glycérol 10% froid. La transformation est réalisée avec la totalité

du mélange de ligation dessalé pour 40 µL de bactéries hautement compétentes. Après 45 secondes dans la glace, le mélange ligation/bactéries est inséré dans une cuve à électroporation et est soumis à un choc électrique de 18 KVolts/cm. Les bactéries sont immédiatement remises en suspension dans 500 µL de milieu LB glucosé (10 g/L de peptone; 5 g/L d'extrait de levure; 5 g/L de NaCl; 1 mM de NaOH; 20 mM de glucose) et incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation douce. La totalité de la suspension bactérienne est ensuite étalée sur des boîtes de Pétri LB/agar 1%, ampicilline 50 µg/mL en présence de 20 µL d'IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactosidase, 200 mM) et 40 µL de X-Gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, 100mM). Après 15 heures de culture à 37°C, les clones positifs blancs (inactivation du gène de la β-galactosidase par ligation d'un insert) sont prélevés et remis en culture en milieu liquide (LB/ampicilline 50 µg/mL) pendant une nuit à 4°C.

L'analyse des clones recombinants est effectuée par PCR (94°C/1 minute ; 30 cycles : 94°C/1 minute, 55°C/1 minute, 72°C/1 minute ; 1 cycle 72°C/1 minute) directement sur 3 µL d'une solution bactérienne à l'aide de deux amorces spécifiques du plasmide, situées de part et d'autre du site d'insertion. Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose.

#### **7.4. Extraction de l'ADN plasmidique**

L'ADN plasmidique est extrait à partir d'une culture bactérienne à l'aide du kit Wizard<sup>®</sup> plus Miniprep DNA Purification System (Promega<sup>®</sup>). Les bactéries sont centrifugées pendant 2 minutes à 10000 g. Le culot bactérien est repris dans 250 µL de solution de suspension (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A) et les bactéries sont lysées après ajout de 250 µL d'une solution de lyse (0,2 M NaOH; 1% SDS) et de 10 µL de protéase alcaline. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 350 µL de solution de neutralisation (4,09 M hydrochlorure de guanidine; 0,759 M acétate de potassium; 2,12 M acide acétique glacial; pH 4,2) sont ajoutés et le lysat est centrifugé à 14000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est ensuite chargé dans les colonnes du kit Wizard<sup>®</sup> plus Miniprep (Promega<sup>®</sup>), puis lavé par 1 mL de solution de lavage (60 mM acétate de potassium; 8,3 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,04 mM EDTA pH 8; 60 % d'éthanol). L'élution de l'ADN plasmidique est effectuée dans 100 µL d'eau bidistillée.

## 7.5. Séquençage automatique

L'ADN plasmidique purifié est séquencé à l'aide du kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version 1,0 (PE Applied Biosystems®), d'après la technique des didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). Les didésoxynucléotides sont couplés à une structure composée d'une molécule de 6-carboxyfluoresceine et d'une molécule de dichlororhodamine, qui porte un radical variable selon le didésoxynucléotide et dont le spectre d'émission se situe à des longueurs d'ondes différentes (dichloro[R6G] pour ddATP; dichloro[ROX] pour ddCTP; dichloro[R110] pour ddGTP; dichloro[TAMRA] pour ddTTP).

La réaction de séquençage consiste à réaliser une synthèse de l'ADN inséré dans le plasmide, avec incorporation des ddNTPs fluorescents, à partir d'amorces situées de part et d'autre du site de multiclonage (universelle ou reverse). A l'ADN (jusqu'à 500 ng) sont ajoutés l'amorce (3,2 pmoles), et le BigDye comprenant de la Taq ADN polymérase (ADN polymérase AmpliTaq FS, Perkin Elmer®) et son tampon, du MgCl<sub>2</sub> et les ddNTPs. L'amplification est réalisée en 35 cycles : 96°C/30 secondes, 50°C/15 secondes, 60°C/4 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite précipité avec 0,1 volume de 3 M NaOAc pH 4,6 et 3 volumes d'éthanol 95% puis centrifugé pendant 20 minutes à température ambiante. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans un tampon de dépôt (formamide déionisé / EDTA 25 mM pH 8 (5 :1); 50 mg/mL bleu dextran) en vue d'être analysé sur gel de polyacrylamide 6%/ 7 M urée.

## 8. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont systématiquement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (de 1 à 2,5 % selon la taille des produits de PCR) dans un tampon TAE (40 mM Tris; 20 mM acide acétique; 2 mM EDTA, ajusté à pH 8,5) contenant 100 ng/mL de bromure d'éthidium. La taille des fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de taille 1 kb et *Smartladder SF* (Promega®).

## 9. Analyses informatiques des séquences

Les séquences nucléotidiques obtenues sont extraites par le logiciel « ChromasPro » version 1.34 et traduites dans les 6 cadres de lecture avec un logiciel de traduction (infobiogen: <http://bioinfo.hku.hk/services/menuserv.html>). Les séquences protéiques déduites sont alors comparées aux différentes banques de données (EMBL, Genbank, Swissprot) à l'aide du logiciel BLAST2. L'alignement et les degrés d'homologies résultants sont définis dans le programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques sont obtenus selon la méthode du plus proche voisin (Saitou et Nei, 1987) à l'aide du logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007).

## 10. RT-PCR quantitative en temps réel (real time qRT-PCR)

### 10.1. Principe

La qRT-PCR est une méthode *in vitro* qui permet la quantification relative du taux d'expression (ou transcription) d'un gène cible en temps réel par rapport à celui d'un gène de référence.

Après une étape de transcription inverse des ARN<sub>m</sub> en ADN<sub>c</sub>, une séquence nucléotidique spécifique est amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible en présence d'un excès de désoxynucléotides et d'une Taq ADN polymérase.

La technique de qRT-PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un traceur fluorescent : l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle d'amplification où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible.

Pour la détection des amplicons, le SYBR Green I (SYBR Green Supermix BioRad®) est utilisé. C'est un agent intercalent se fixant à l'ADN double brin montrant ainsi une augmentation de la fluorescence durant l'étape d'élongation (Morrison *et al.*, 1998) et n'occasionnant pas d'inhibition de la réaction PCR. L'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de

lecteur intégré à l'appareil PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000).

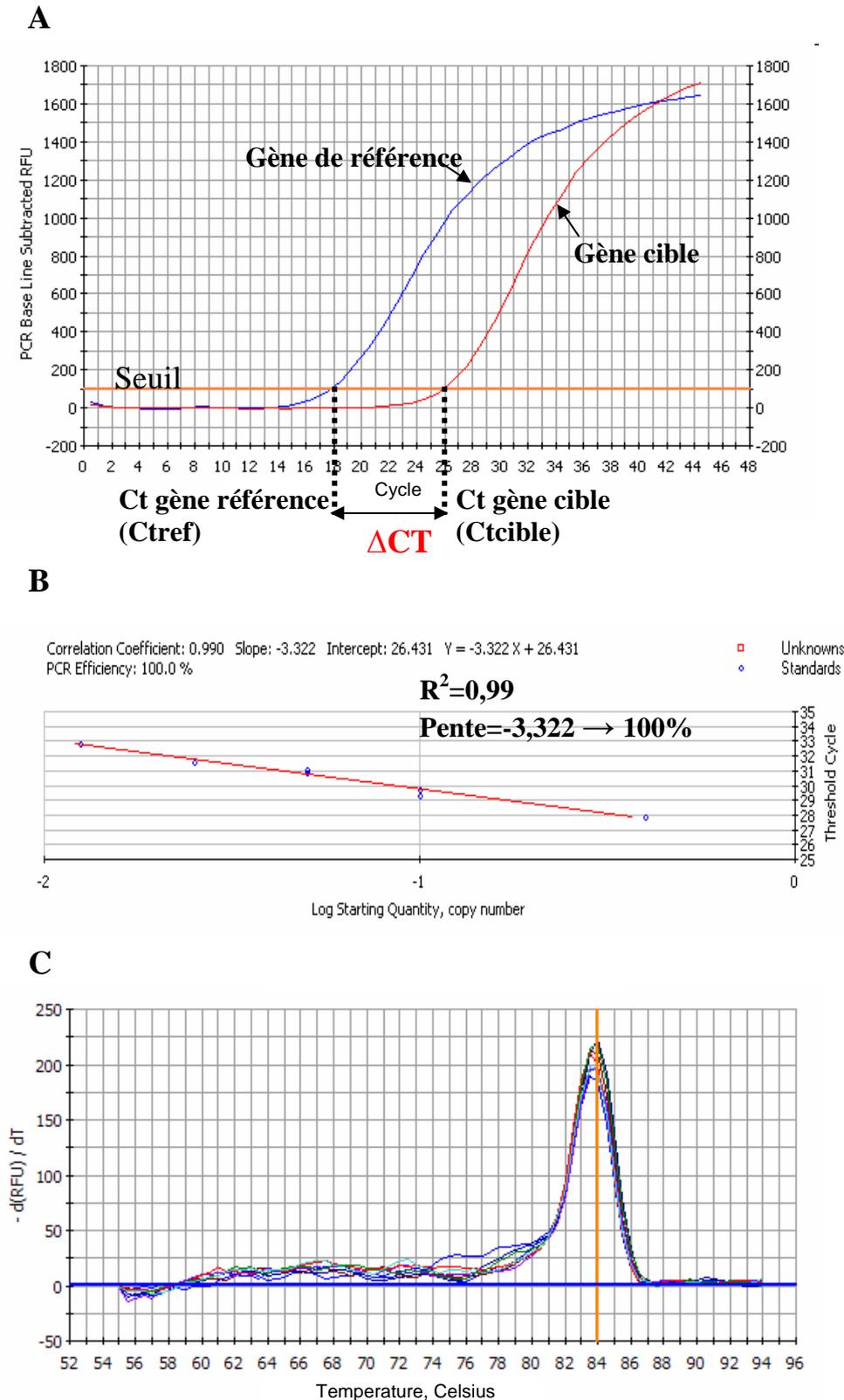
Afin de standardiser et normaliser les différentes analyses, la quantification d'un ARN<sub>m</sub> endogène ubiquitaire ( $\beta$ -actine ou facteur d'élongation I) est réalisé en parallèle de l'amplification du gène cible. Ce gène de référence permettra de s'affranchir des variations inter-expérimentales et de comparer l'expression de plusieurs gènes entre différents échantillons.

Une quantification précise et reproductible par les techniques fluorescentes en PCR fait intervenir le concept de cycle seuil (Ct) ou nombre de cycle requis pour atteindre un signal d'émission de fluorescence significativement plus élevée que le bruit de fond (Gibson *et al.*, 1996). Ce point apparaît toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification (Figure 22A).

Le calcul des quantités relatives (QR) entre le transcrite du gène cible et le transcrite du gène de référence est basé sur la comparaison des cycles seuils (Pfaffl, 2001 ; Pfaffl *et al.*, 2002). Il est donné par la formule  $N=100 \times 2^{(Ct \text{ référence} - Ct \text{ cible})}$  (Lelong *et al.*, 2007).

## 10.2. Validation et efficacité des couples d'amorces

La validité et l'efficacité des couples d'amorces spécifiques désignées (Tableau 3) sont déterminées expérimentalement. Pour cela, une réaction de PCR est effectuée à partir d'une série de dilution d'ADNc permettant de calculer la pente de la courbe d'efficacité (logarithme de la quantité initiale d'ADNc en fonction du cycle seuil) (Figure 22B). Les couples d'amorces affichant une pente correspondant à une efficacité de 100 %  $\pm$  2 % et un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 sont sélectionnés. Enfin, une courbe de fusion permet de vérifier l'absence de dimérisation des amorces (Figure 22C). Avant de procéder à la transcription inverse des ARN totaux et aux analyses pas PCR en temps réel, un traitement à la DNase I suivi d'une amplification par PCR de chaque échantillons sont effectués afin d'éviter toute trace de contamination à l'ADNg.



**Figure 22 : (A) Exemple de courbe d'amplification. (B) Courbe d'efficacité d'amplification par qRT-PCR. Un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) proche de 1 atteste de l'efficacité d'amplification. (C) Dérivée de la courbe de fusion des amplicons. Elle permet de vérifier s'il y a dimérisation des amorces.**

### 10.3. Rétrotranscription et amplification

La RT-PCR quantitative en temps réel est effectuée dans des plaques 96 puits à l'aide d'un appareil «iCycler iQ<sup>Tm</sup>» (Biorad®) à l'aide du kit Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen®). Chaque puit contient, dans un volume total de 15 µL, 5 µL d'une dilution d'ADNc (5 ng d'ADNc «équivalent ARN totaux») rétrotranscrits à partir de 500 ng d'ARN totaux traités à la DNase I, 0,33 µM d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de l'ADNc à quantifier (DMS, DMASB, HDMSB et HDMASB pour *Cg-DML*, qFoxl2S2 et qFoxl2AS1 pour *Cg-Foxl2* et VS-S9 et VS-AS9 pour *Oyvlg*) (Tableau 3) et 7,5 µL de mélange de PCR contenant la Taq ADN polymérase, des dNTPs, un tampon (Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7), du SYBR Green I et de la fluoresceine ROX.

Le protocole d'amplification comprend une phase d'activation de l'ADN polymérase de 15 minutes à 95°C, 45 cycles avec une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C puis les phases d'hybridation des amorces et d'élongation regroupées en une seule étape à 60°C pendant 1 minute et enfin une étape de décrémentation de température par pas de 0,5°C chaque 10 secondes (de 95°C à 55°C) qui permet l'établissement de courbe de fusion des produits obtenus après amplification afin de vérifier la nature des amplicons en la comparant avec la température de fusion expérimentale.

Lors des réactions de qRT-PCR, les ADNc sont déposés en triplicats pour le gène cible ainsi que pour le gène de référence choisi, le facteur d'élongation 1α (GenBank accession n° **BQ426516**), amplifié avec le même couple d'amorces que précédemment (Tableau 3). Différents témoins sont déposés dans la même plaque: l'équivalent de chaque échantillon traité à la DNase mais non rétro-transcrit afin de détecter une éventuelle contamination par de l'ADN génomique, un témoin négatif (eau) pour chaque couple d'amorce pour détecter une éventuelle contamination des réactifs ou la formation de dimères d'amorces. L'efficacité inter-PCR est validée par la mesure du Ct d'un même échantillon d'ADNc contrôle de gonade déposé sur chaque plaque de PCR.

## 11. Synthèse des sondes pour le criblage de la banque d'ADNg, le Northern blot et l'hybridation *in situ*

La synthèse des sondes ARN et ADN a été réalisée à l'aide des Kit DIG RNA/DNA Labelling (Roche Diagnostics®) par incorporation d'UTP couplé à la digoxigénine (DIG). La révélation est alors visualisée par l'activité de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps Anti-Digoxigénine (Roche Diagnostics®), en présence du substrat, le BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl Phosphate p-toluidine), ainsi que de NBT (4 Nitro Blue Tetrazodium chloride) permettant d'amplifier le signal.

Les ADNc de *Cg-DML*, *Cg-Foxl2* et *Oyvlg* sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques (Tableau 3). Les produits de PCR sont ensuite clonés dans un vecteur pCR II-TOPO (Invitrogen®) à l'aide du kit TOPO TA Cloning (Invitrogen®).

Les sondes ADN destinées au criblage de la banque d'ADNg sont amplifiées par PCR à partir de 1 ng de plasmide en présence de 1 nmole de DIG-dUTP (Roche Diagnostics®) avec des amorces spécifiques (Tableau 3) du fragment d'ADN clonés dans le vecteur pCR II-TOPO (Invitrogen®). Elles sont ensuite purifiées à partir du gel d'agarose à l'aide du kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega®).

Pour le Northern blot et l'hybridation *in situ*, des sondes ARN sont préparées. Selon la synthèse de la sonde sens ou anti-sens, 10 µg de plasmides sont linéarisés à 37°C pendant une nuit respectivement par Hind III (10 U/µL) ou par Not I (10 U/µL) à raison de 5 U/µg de plasmide, dans un volume réactionnel de 100 µL. Les ribosondes marquées à la digoxigénine sont synthétisées par transcription *in vitro* pendant 2 heures à 37°C. Le plasmide possède les deux promoteurs SP6 et T7 ARN polymérase de part et d'autre des sites de clonage multiples. Le mélange réactionnel, d'un volume total de 20 µL, est composé de 1 µg de plasmide linéarisé, 1 mM de chaque oligonucléotide ATP, GTP, CTP, 0,65 mM de UTP, 0,35 mM de DIG-11-UTP (Roche Diagnostics®), 1 U/µL d'inhibiteur de RNase, 0,2 M de DTT et 1 U/µL de Sp6 ARN-polymérase (sonde anti-sens) ou de T7 ARN-polymérase (sonde sens) (Roche Diagnostics®) dans un tampon de transcription inverse (40 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM spermidine; 0,01% (w/v) BSA). Le mélange réactionnel est traité avec une unité de la DNase RQI pendant 15 minutes à 37°C afin de digérer la matrice plasmidique. La digestion est arrêtée par addition de 0,1 volume d'EDTA (0,2 M pH 8) en chauffant 15 minutes à 65°C.

La quantité des sondes ARN marquées, estimée à 10 µg et des sondes ADN est vérifiée par dépôt sur gel d'agarose avec des dilutions de marqueurs de taille ainsi qu'en dot blot par comparaison de l'intensité de marquage d'une série de dilutions des sondes avec les mêmes dilutions d'un échantillon contrôle d'ARN et d'ADN marqués respectivement (Roche Diagnostics®). Les sondes ARN sont ensuite diluées dans une solution de 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-NaCitrate, pH 7), formaldéhyde et eau DEPC (v/v/v : 3 :2 :5) puis conservées à -80°C alors que les sondes ADN sont utilisées directement ou conservées à -20°C.

La spécificité d'hybridation des sondes est vérifiée par dot blot. Un, 10 et 20 ng de plasmides contenant un insert d'une séquence identique ou différente de celle des sondes, mais aussi 5, 10 et 20 µg d'ARN totaux d'huître et des ARN de levure *Torula* sont déposés sur membranes de nylon chargées positivement (Amersham® Hybond™-N<sup>+</sup>) incubées pendant 30 minutes à 120°C afin de fixer les dépôts. Les membranes ainsi obtenues sont ensuite incubées dans 3,5 mL/100 cm<sup>2</sup> d'une solution de préhybridation / hybridation (1% blocking reagent (Roche Diagnostics®); 50% formamide; 750 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.1% Tween 20; 75 mM sodium citrate pH 7; 100 µg/mL d'ARN de levure *Torula*) pendant 30 minutes à 65°C dans un four à hybridation rotatif, puis pendant 16 heures à 65°C dans la même solution en présence de 25 ng/mL de la sonde marquée (sens ou anti-sens) préalablement dénaturée 5 minutes à 90°C. Les hybrides non spécifiques sont ensuite éliminés en lavant les membranes 2 fois dans du 2x SSC/0,1% SDS à température ambiante pendant 5 minutes, suivi de 2 lavages dans du 0,5x SSC/0,1% SDS à 65°C pendant 15 minutes. Après avoir rétabli l'équilibre avec un bain de 5 minutes dans un tampon de lavage (100 mM acide maléique; 150 mM NaCl, pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20), les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec du tampon de blocage, afin d'éviter la fixation non spécifique de l'anticorps. Cent cinquante mU/mL d'anticorps anti-DIG couplé à une phosphatase alcaline [kits DNA et RNA-labelling detection (Roche Diagnostics®)] dilué dans du tampon de blocage sont ensuite déposés sur les membranes. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, elles sont rincées et rééquilibrées dans 2 bains de 15 minutes de tampon de lavage puis 5 minutes dans du tampon de détection (0,1 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5). La révélation est ensuite réalisée sur une durée allant de quelques minutes à 16 heures avec 2% de NBT/BCIP (Roche Diagnostics®) dans du tampon de détection (0,1M NaCl; 0,1M Tris, pH 9,5) [DIG detection Kit (Roche Diagnostics®)] à l'obscurité. La réaction est arrêtée par 2 bains de 5 minutes dans de l'eau bidistillée stérile.

## 12. Criblage d'une banque d'ADN génomique et analyse des clones

Pour étudier l'organisation du gène de *Cg-DMI* et identifier d'autres facteurs potentiels à domaine DM, une banque d'ADN génomique de *Crassostrea gigas* a été criblée. Cette banque a été construite dans le vecteur  $\lambda$ -DAH<sub>II</sub> (Stratagene®) à partir d'ADN génomique extrait de muscle adducteur. Un nombre total de  $1,8 \cdot 10^6$  clones indépendants ont été obtenus avec des fragments insérés de taille moyenne 15 kpb (Herpin *et al.*, 2002).

### 12.1. Transfert sur membrane et hybridation

Après amplification de la banque pour obtenir un titre de  $4,5 \cdot 10^{10}$  pfu/mL, cinq boîtes LB/agar sont préparées avec une culture de bactéries *E.coli* de la souche LE 392 ( $A_{600nm} \sim 0,6$ ) avec 50000 phages. Après une nuit à 37°C, les plages de lyses sont transférées pendant 5 minutes sur cinq membranes de nylon chargées positivement (Amersham® Hybond™-N<sup>+</sup>) de manière à disposer d'une membrane originale et de répliques afin de représenter tout le génome de l'huître. Après une étape de dénaturation 5 minutes dans une solution 1,5 M NaCl et 0,5 M NaOH, les membranes subissent une étape de neutralisation dans une solution de 1,5 M NaCl, Tris-HCl pH 8 puis deux étapes de rinçage dans une solution de 2x SSC avant d'être séchées pendant 2 heures à 80°C. Les membranes ainsi obtenues sont alors mises à incuber dans 3,5 mL/100 cm<sup>2</sup> d'une solution de préhybridation / hybridation (1% blocking reagent (Roche Diagnostics®); 50% formamide; 750 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.1% Tween 20; 75 mM sodium citrate pH 7; 100 µg/mL d'ARN de levure *Torula*) pendant 30 minutes à 35, 45 ou 50°C dans un four à hybridation rotatif, puis pendant 16 heures aux mêmes températures, dans la même solution en présence de 25 ng/mL de la sonde ADN marquée codant le domaine DM (152-584 pb de l'ADNc *Cg-DMI* amplifié avec les amorces COM5 et COM3AS) (Tableau 3) préalablement dénaturée 5 minutes à 95°C. Les membranes sont ensuite lavées 2 fois dans du 2xSSC/0,1% SDS à température ambiante pendant 5 minutes, puis à différentes stringences résultant de combinaisons de salinité allant de 0,5x à 10x SSC et de températures allant de 35 à 65°C. La révélation est ensuite réalisée à l'aide du Kit Dig detection (Roche Diagnostics®) comme décrit précédemment.

A l'issue de ce criblage primaire, les phages correspondant à un marquage positif sur les deux répliques sont prélevés, mis en présence de bactéries pour un second criblage différentiel réalisé selon le même protocole expérimental.

## 12.2. Purification de l'ADN de phages recombinants

A l'issue du second criblage, une plage de lyse isolée de clones positifs est prélevée, mise en suspension dans une solution de SM (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,02% gélatine). La suspension de phages obtenue est titrée. La méthode d'extraction de l'ADN de phage est inspirée de Kaslow (1986). Dix<sup>10</sup> cellules bactériennes *E. coli* de la souche LE 392 mises en suspension dans une solution de SM sont incubées pendant 10 minutes à 37°C en présence de 10<sup>8</sup> phages à analyser. Cette suspension est mélangée à 500 mL de milieu de culture [milieu LB (10 g/L de peptone; 5 g/L d'extrait de levure; 5 g/L de NaCl; 1 mL de NaOH 1N; 20 mM de glucose), 10 mM MgSO<sub>2</sub> et 0,2% maltose] puis incubée une nuit à 37°C sous agitation. A ce lysat liquide de phages, sont ajoutés les éléments suivants : 2% chloroforme, 1 µg/mL de DNaseI et de RNase A, 1 M NaCl. Après incubation 30 minutes à 37°C, les fragments bactériens sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 6000g. Les phages en suspension dans le surnageant sont précipités en ajoutant du PEG 8000 (PolyEthylèneGlycol) jusqu'à une concentration de 10% (w/v). Cette solution est incubée pendant 1 à 2 heures à 4°C puis centrifugée 20 minutes à 6000g. Le culot de phages est repris dans 3 mL de tampon SM puis traité pendant 30 minutes à 37°C par de la DNase I et de la RNase A en concentrations finales de 5 et 100 µg/mL respectives. Les phages sont ensuite lysés par du SDS 10% (concentration finale 0,5%) et de l'EDTA 0,5 M pH 8 (concentration finale 20 mM) et traités par de la Protéinase K à une concentration finale de 100 µg/mL à 68°C pendant 30 minutes. L'ADN des phages est alors extrait par un volume de phénol saturé à pH 8, de phénol/Chloroforme (v/v) puis par un volume de chloroforme. La solution aqueuse d'ADN est précipitée en ajoutant 0,5 volume de NH<sub>4</sub>Ac 5 M et 2 volumes d'éthanol 95%. Après incubation 1 heure sur la glace, le précipité est centrifugé 15 minutes à 10000g. Le culot obtenu est alors rincé à l'éthanol 70%, séché et repris dans de l'eau bidistillée stérile.

## 12.3. Criblage différentiel de l'ADN des phages recombinants

Une analyse préliminaire de l'ADN des phages est réalisée par criblage différentiel en dot blot afin de vérifier si les clones issus de la banque d'ADNg contiennent plusieurs facteurs à domaine DM. Ainsi, trois sondes ADN sont utilisées, une sonde du domaine DM (152-584 pb de *Cg-DMI*) susceptible de reconnaître tous les facteurs de la famille *Dmrt*, une sonde HDM « Hors domaine DM » (584-693 pb de *Cg-DMI* amplifié avec les amorces

COM3S et SP312) (Tableau 3) et une sonde IDM présentant l'intron du gène *Cg-DMI*, toutes deux spécifiques du facteur *Dmrt* de l'huître. Dix ng de plasmides contenant un insert *Cg-DMI* (contrôle positif), 10 ng de plasmides contenant une séquence différente (contrôle négatif), et 500 ng d'ADN de phages de chaque clone positif purifié sont déposés sur membranes de nylon chargées positivement (Amersham® Hybond™-N<sup>+</sup>) incubées pendant 30 minutes à 120°C afin de fixer les dépôts. La préhybridation, l'hybridation avec les trois sondes et la révélation sont réalisées comme décrit précédemment à l'aide du kit Dig detection (Roche Diagnostics®).

#### 12.4. Digestions enzymatiques et *Southern blotting*

L'analyse de l'ADN des phages est réalisée par *Southern Blotting* après digestion par l'enzyme de restriction EcoRI. Trente µg d'ADN sont digérés pendant 2 heures à 37°C dans un volume réactionnel final de 300 µL en présence d'un tampon optimal (recommandé par le fournisseur d'enzyme) et de 60U d'enzyme de restriction (Promega®). Un tiers de chaque digestion (10µg) est déposé sur un gel d'agarose à 0,7% dans du tampon TAE (40 mM Tris; 20 mM acide acétique; 2 mM EDTA, ajusté à pH 8,5). Après électrophorèse, le gel est incubé successivement pendant 15 puis 20 minutes à température ambiante dans une solution de dénaturation et de transfert (0,4 N NaOH ; 1 M NaCl). Les fragments d'ADN digérés sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham®) dans la solution de transfert pendant une nuit. Après rinçage pendant 15 minutes dans une solution de neutralisation (0,5 M Tris-HCl pH 7,2 ; 1 M NaCl), la membrane est séchée pendant 10 minutes à température ambiante. La préhybridation, l'hybridation avec la sonde du domaine DM et la révélation sont réalisées comme décrit précédemment à l'aide du kit Dig detection (Roche Diagnostics®). Après l'analyse des bandes positives, les fragments de restriction d'intérêt sont séparés sur gel d'agarose, purifiés et sous-clonés dans un plasmide pour être séquencés.

### 13. *Northern Blotting*

Les ARN totaux sont extraits à partir de gonades mâles et femelles d'huîtres adultes à l'aide du KIT TRI REAGENT™ (Sigma®). Le *Northern Blotting* est réalisé avec 3 µg d'ARN polyadénylés purifiés à partir des ARN totaux. Les ARN sont maintenus en conditions

dénaturantes dans une solution à 50% de formamide, 2,46 M de formaldéhyde, MOPS 1X [0,02 M de MOPS (acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique) pH 7,0 ; 2 mM NaOAc pH 5,2 ; 1 mM EDTA pH 8,0], dénaturés à 70°C durant 10 minutes puis mélangés avec 2 µl de bleu de dépôt 10x (50% glycérol ; 10 mM EDTA pH 8 ; 0,25 % de bleu de Bromophénol et 0,25 % de xylène cyanol).

L'électrophorèse est alors réalisée sous 50 à 60 Volts sur un gel dénaturant d'agarose à 1% contenant 2,2 M de formaldéhyde et du MOPS 1X, avec comme référence des marqueurs de taille ARN (Promega®). Le transfert est ensuite effectué sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham®) par capillarité dans un tampon de transfert (0,01 N NaOH ; 3 M NaCl) pendant 12 heures. Après rinçage dans du 6x SSC, la membrane est séchée pendant 10 minutes à température ambiante. La préhybridation, l'hybridation et la révélation sont réalisées comme décrit précédemment à l'aide du kit DIG detection (Roche Diagnostics®).

#### 14. Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* a été réalisée afin de mettre en évidence l'expression des gènes codant *Cg-DMI* et *Cg-Foxl2* sur des coupes histologiques de différents tissus à l'aide du kit DIG RNA Labelling (Roche Diagnostics®). La synthèse des sondes utilisées est décrite précédemment.

Pour l'hybridation et la révélation, les coupes d'échantillons sont déparaffinées dans du Rotihistol® (2x5 minutes), réhydratées dans des bains successifs d'alcool de degré décroissant (100, 95, 70 et 50% - 2 minutes chacun) puis rincées 2x2 minutes dans du tampon TE (136 mM NaCl; 25 mM Tris; 2,7 mM KCl, pH 7,4). Après une perméabilisation par la protéinase K (5 µg/mL dans du tampon TE) à 37°C pendant 20 minutes, les tissus sont rincés 2x5 minutes dans du tampon TE puis deux étapes de pré-hybridation sont réalisées en chambre humide: (1) 200 µL/lame de tampon TE/tampon d'hybridation (v/v) pendant 5 minutes à température ambiante; (2) le même volume de tampon d'hybridation seul, pendant 1 heure, à température ambiante puis 30 minute à la température d'hybridation (52°C pour *Cg-DMI* et à 54°C pour *Cg-foxl2*). L'hybridation est ensuite réalisée durant une nuit, en chambre humide, à la même température dans des chambres autocollantes (GeneFrame®, ABgene) avec des sondes ARN sens et anti-sens (27-1490 pb de l'ADNc de *Cg-DMI* amplifié avec les amorces SPL52 et 3UTRAS ; 9-1193 pb de l'ADNc de *Cg-Foxl2* amplifié avec les amorces Cg-Foxl2S5 et Cg-Foxl2AS3) (Tableau 3) diluées à 300 ng/mL dans du tampon

d'hybridation (100 µL/lame) et préalablement dénaturées 5 minute à 80°C. Les lavages, le marquage avec l'anticorps et la révélation sont réalisés à l'aide du Kit Dig detection (Roche Diagnostics®) comme décrit précédemment, avec quelques modifications: l'anticorps déposé (200 µL/lame) est dilué au 1/500 et incubé 2 heures en chambre humide à température ambiante; la révélation est réalisée en chambre humide pendant 4 à 6 heures. La réaction de détection est stoppée par 2 bains de tampon TE de 5 min chacun. L'anticorps hybridé à des sites non spécifiques est éliminé par un bain de Tris-EDTA (Tris 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) de 5 minutes. Après un lavage de 5 minutes à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces de précipités de tampon TE, les coupes sont rincées dans du PBS puis montées entre lame traitées à l' aminoalkylsilane et lamelle dans un mélange glycérol/PBS (v/v: 1:1).

## IV. Techniques biochimiques : *Western Blotting*

### 1. Extraction et dosage des protéines

Les échantillons broyés sont repris à froid dans du tampon de lyse (Hépes 20 mM; EDTA 250 mM; DTT 200 mM; AEBSF 1M; E64 10 µM) (v/v: 1:2,5) puis soniqués et centrifugés à 15000g, 30 minutes puis à 105000g, 1 heure à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré puis dessalé à l'aide d'un microcon, dont le seuil de coupure est de 10 kDa (Millipore®). Les protéines sont ensuite dosées par la méthode BCA (acide bicinchoninique) à l'aide du kit *BCA protein assay* (Sigma®). Ce dosage colorimétrique repose sur la capacité des protéines à réduire les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^{+}$  en milieu alcalin. Cet ion interagit avec deux molécules de BCA pour former un complexe dont l'absorbance est maximale à 562 nm. La quantification des protéines s'effectue grâce à une gamme étalon de protéines réalisée à partir d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 1 mg/mL. Chaque échantillon est dilué au 1/20<sup>ème</sup> et au 1/30<sup>ème</sup> dans du tampon Hépes 20 mM. Cinquante µl de chaque dilution sont incubés 30 minutes à 37°C avec 1 mL de la solution BCA. La concentration protéique est déterminée à partir de la courbe étalon obtenue par lecture de l'absorbance à 562 nm.

## 2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE, à l'aide d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide/bisacrylamide et d'un gel de séparation à 10% d'acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%). Les échantillons, repris dans du tampon 4X SDS/PAGE (Tris 300 mM; SDS 2,4%;  $\beta$ mercaptoéthanol 30%; bleu de bromophénol 3,6%) (v/v: 5:1), sont chauffés 5 minutes à 90°C afin de dénaturer les protéines. Cent  $\mu$ g de protéines et 10  $\mu$ L d'un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, Biorad®) sont déposés. La migration a lieu en tampon de migration Tris base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 3,5 mM, pH 7,4 à 40V jusqu'à ce que le marqueur et les échantillons pénètrent dans le gel de séparation puis à 90V jusqu'à la fin de la migration.

## 3. Transfert des protéines sur membrane PVDF (PolyVinylidene DiFluoride)

La membrane de transfert (Hybond-P, Amersham®) est incubée dans du méthanol, réhydratée dans de l'eau bidistillée puis immergée 2 minutes dans du tampon de transfert (Tris base 25 mM; Glycine 192 mM; méthanol à 20%). Le transfert est réalisé par électrotransfert dans le même tampon, à 20V pendant une nuit à 4°C, à l'aide du système Mini-protean® Tetra Cell (Biorad®).

## 4. Choix des anticorps

Le premier anticorps primaire testé est un anti-DmrtA2 humain polyclonal de lapin (Abcam® – ab27917) commercialisé par Coger. Il est dirigé contre la protéine DmrtA2 présente dans le rein humain selon Shui *et al.* (2004). Il reconnaît une région protéique de 17 acides aminés (EEDSPGSASPLGSESG), riche en prolines et sérines, qui forme une boucle externe et qui est assez bien conservée chez les Vertébrés. L'épitope humain présente 94% d'identité avec le rat et la souris et 17% avec le Cg-DMI d'huître. Malgré un faible pourcentage d'identité avec l'huître, le choix de cet anticorps pour les *Western Blottings* repose sur la ressemblance structurale de Cg-DMI avec les facteurs Dmrt4 (ou DmrtA1) et Dmrt5 (ou DmrtA2). Le second anticorps testé est un anticorps monoclonal anti-Dmrt1

humain de souris (Abnova® – H00001761-M01), dont l'épitope nous est inconnu et qui est susceptible de reconnaître Cg-DMI chez l'huître.

## **5. Immunomarquage indirect**

Après rééquilibrage de la membrane dans du méthanol, de l'eau bidistillée puis du Tris 0,1 M, les sites non spécifiques sont saturés durant 1 heure dans une solution de saturation constituée de lait écrémé à 5% dans du Tris 0,1 M. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure avec l'anticorps primaire, anti-DmrtA2 de lapin ou anti-Dmrt1 de souris à des concentrations respectives de 0,5 µg/mL et 1µg/ml dans la solution de saturation. Suite à des rinçages en tampon Tween 20 0,02% / Tris HCl 0,1M, la membrane est incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de lapin (Abcam® – PO399) ou de souris (Dako® – PO260), couplé à une peroxydase, dilué à 1 µg/mL dans du Tris 0,1 M. Une fois rincée 3x5 minutes dans Tris 0,1 M, la membrane est révélée pendant 5 à 10 minutes dans la solution contenant du DAB (3-3 Diaminobenzidinetétrahydrochloride) (DAB SIGMA Fast™ 3,3, Sigma®). La réaction est stoppée avec du Tris 0,1 M.

## **V. Immunohistochimie**

Les coupes sont déparaffinées dans des bains de solvant organique (Rotihistol®) (2x10 minutes) puis les peroxydases endogènes sont inhibées dans un mélange de méthanol/eau oxygénée (v/v : 77:33%) pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (100, 95 et 70%) puis d'eau courante, de 5 minutes chacun. Afin de faciliter la liaison de l'anticorps aux antigènes, les tissus subissent une perméabilisation au Triton-X100 1% pendant 4 minutes puis, après un rinçage de 5 minutes dans du tampon Tris 50 mM / NaCl 150 mM, pH 7,4, un démasquage des épitopes par chauffage au four micro-onde (560W) pendant 2 minutes en tampon citrate 10 mM. Après refroidissement à température ambiante et rinçage des lames dans du tampon Tris 50 mM / NaCl 150 mM / gélatine 0,25% / Triton X-100 0,25%, pH 7,4, 200 µL d'anticorps anti-Dmrt1 dilué au 1/250<sup>ème</sup> (4 µg/mL) dans du tampon Tris 50 mM / NaCl 50 mM, pH 7,4 sont déposés sur chaque lame (sauf sur les contrôles négatifs). L'incubation avec l'anticorps primaire a lieu à 4°C dans une chambre humide durant 1 nuit. Après plusieurs rinçages dans du tampon 1, 200 µL d'anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de souris couplé à la peroxydase

dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon Tris 50 mM / NaCl 50 mM, pH 7,4 sont déposés sur chaque lame (sauf sur certains contrôles négatifs). L'incubation à 37°C en chambre humide dure 1 heure. Les lames sont ensuite rincées dans du tampon Tris 50 mM / NaCl 50 mM, pH 7,4. Suit la révélation avec la solution de DAB (200 µL/lame) pendant 10min. Après rinçage, les coupes sont déshydratées dans l'éthanol 100% puis elles sont montées entre lame et lamelle dans une résine (Rotihisto-kit®) après un dernier bain de 5 minutes dans du Rotihistol®.

## **VI. Observations et prises de vues**

Les photos ont été prises sur un microscope photonique Nikon Eclipse 80i à l'aide d'une caméra Nikon DXM1200-C (Nikon®, Champigny-Sur-Marne, France).

## **VII. Analyse statistiques des résultats**

Les résultats sont exprimés par la moyenne des séries expérimentales plus ou moins l'écart à la moyenne ( $x \pm SEM$ ) pour un nombre d'échantillon égal à n. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test de Mann-Whitney avec une significativité statistique pour  $p < 0,05$ .



Le déterminisme du sexe correspond à la période critique où l'expression d'un déterminant moléculaire provoque la différenciation de la gonade indifférenciée dans le sens mâle ou femelle. Chez les Métazoaires étudiés, les mécanismes du déterminisme du sexe sont variés et ils diffèrent non seulement selon les phyla mais aussi au niveau d'un même phylum. On peut néanmoins distinguer le déterminisme génétique du déterminisme environnemental.

Au cours de cette première étude, nous avons décidé d'étudier les facteurs génétiques potentiels qui déterminent la première différenciation sexuelle, chez les juvéniles, et ceux impliqués dans les changements sexuels de l'adulte chez l'huître. Au vu du peu de données disponibles à ce sujet chez les Mollusques, nous avons décidé d'appuyer notre raisonnement sur les données connues chez les Invertébrés et Vertébrés étudiés. Ainsi, chez ces derniers, le déterminisme du sexe met toujours en jeu une cascade de facteurs moléculaires, parmi lesquels *Dmrt1*. C'est un facteur conservé au cours de l'évolution, orthologue de *DSX* de la drosophile (Erdman et Burtis, 1993) et de *MAB-3* du nématode *C. elegans* (Shen et Hodgkin, 1988) et impliqué dans la différenciation gonadique mâle.

Nous avons donc, dans un premier temps, recherché un facteur orthologue de *Dmrt1* en nous basant sur la conservation de séquence du domaine DM pour définir des amorces dégénérées. A partir d'ARNm de gonades d'huître, une séquence partielle d'un ADNc codant un domaine DM a été identifiée par RT-PCR puis complétée par 5' et 3' RACE-PCR. Cet ADNc a été nommé *Cg-DMI*. Chez la drosophile, un épissage alternatif de l'ARNm codant *DSX* induit une forme spécifique du mâle ( $DSX^M$ ) ou de la femelle ( $DSX^F$ ). Nous avons par conséquent recherché si différentes formes d'épissage existaient pour *Cg-DMI* par RACE-PCR ainsi que l'existence et la position d'introns éventuels par l'analyse de l'ADN génomique. L'analyse de la séquence de *Cg-DMI* (Structure protéique 3D en Annexe 1) a montré la présence, en plus du domaine DM, d'un domaine DMA conservé qui est retrouvé chez *Dmrt3*, *Dmrt4* et *Dmrt5*. De plus, l'identification d'un seul intron, l'alignement des séquences protéiques de *Cg-DMI* et des différents facteurs *Dmrt* ainsi que l'établissement de l'arbre phylogénétique a montré que ce facteur était plutôt apparenté aux facteurs *Dmrt4* et *5* qu'à *Dmrt1*. Aucun épissage de *Cg-DMI* lié au sexe n'a été observé, toutefois deux formes additionnelles différenciellement polyadénylées dépourvues de signal AAUAAA ont été identifiées (Annexe 2).

Nous avons donc ensuite recherché d'autres gènes codant des facteurs à domaine DM par criblage d'une banque génomique. En l'absence d'identification de nouveaux gènes, l'analyse de Cg-DMI a été poursuivie afin de déterminer sa fenêtre d'expression spatio-temporelle. Nous avons pour cela étudié son expression au cours du développement, dans les différents tissus adultes ainsi que dans les gonades mâles et femelles au cours du cycle gamétogénétique adulte par RT-PCR classique et en temps réel à l'aide de couples d'amorces amplifiant soit le domaine DM, soit une région spécifique de *Cg-DMI* située en dehors du domaine DM (HDM). Cette double analyse a été effectuée pour différencier l'expression de notre facteur de celle d'un autre facteur DM éventuel. L'analyse a été complétée par une étude en *Western Blotting* avec un anticorps monoclonal hétérologue anti-Dmrt1 humain, hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques de *Cg-DMI* et/ou immunohistochimie avec le même anticorps, chez les adultes, les larves véligères et le naissain de 1 mois. En RT-PCR, l'expression de *Cg-DMI* apparaît ubiquiste et est présente dans les gonades des deux sexes (Annexe 3). Cependant, une augmentation significative est observée chez les mâles par rapport aux femelles à la fin du cycle gamétogénétique adulte mais avec une forte variabilité individuelle. De même, un pic d'expression est observé durant le développement chez le naissain entre 1 et 2 mois d'âge. L'immunohistochimie et le *Western Blotting* chez le rat et la souris ont permis de vérifier la spécificité de l'anticorps (Annexes 4.1 et 4.2). Alors que le *Western Blot* n'a pas permis de révéler la protéine chez l'huître, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie chez les adultes (Annexe 4.2) ont montré une expression dans les cellules germinales mâles et femelles. Du fait de l'organisation testiculaire de l'huître (cellules germinales de petite taille, cellules somatiques intra-testiculaires peu caractérisées), la distinction du marquage entre les cellules germinales (spermatogonies) et les cellules somatiques n'est pas possible en microscopie photonique. Pour les autres tissus, l'expression de Cg-DMI est localisée au niveau des cellules épithéliales du manteau, des branchies et des jeunes cellules cryptiques de la glande digestive. Une expression ubiquiste également dans des cellules potentiellement en prolifération / différenciation a également été observée par immunohistochimie et/ou hybridation *in situ* au cours du développement (Annexe 4.3). Ces résultats posent la question d'un rôle éventuel de Cg-DMI dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

En conclusion, cette étude a permis, pour la première fois, l'identification d'un facteur à domaine DM chez un Protostomien Lophotrochozoaire. Cg-DMI pourrait constituer un facteur ancestral impliqué dans de nombreux processus biologiques chez l'huître, parmi

lesquels, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire durant le développement gonadique.

*Ces résultats font l'objet d'une publication (Naimi A., Martinez A.-S., Specq M.-L., Mrac A., Diss B., Mathieu M., Sourdain P., 2009. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster Crassostrea gigas. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 152: 189–196) et sont illustrés dans les Annexes 1 à 5.*





Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpa](http://www.elsevier.com/locate/cbpa)

## Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*

Amine Naimi<sup>a</sup>, Anne-Sophie Martinez<sup>a</sup>, Marie-Laure Specq<sup>a</sup>, Abdellah Mrac<sup>a</sup>, Blandine Diss<sup>b</sup>, Michel Mathieu<sup>a</sup>, Pascal Sourdaïne<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFR 146 ICORE, IBFA, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen, France

<sup>b</sup> SATMAR, Société Atlantique de Mariculture, "La Saline" 50760 Gatteville-Phare, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 July 2008

Received in revised form 15 September 2008

Accepted 15 September 2008

Available online 26 September 2008

## Keywords:

Oyster

*Crassostrea gigas**Dmrt1**Dmrt4**Dmrt5*

Sex determination

## ABSTRACT

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a successive not systematic protandric hermaphrodite. Searching for an ortholog to *Dmrt1*, a conserved sex determinism factor, we have identified the first complete cDNA of a DM factor in Lophotrochozoa which we have called *Cg-DMI* (*Crassostrea gigas* DMRT-like). It is 359aa long, with the DM domain common to all the family factors, and one DMA domain specific to members such as *Dmrt4* and *Dmrt5*. Its gene presents one intron of 598 bp. Real time PCR and *in situ* hybridization have shown that *Cg-DMI* was expressed in both sexes, with a significantly higher expression in male than in female gonads at the end of the adult gametogenetic cycle and that a significant peak of expression was observed in spat between 1 and 2 months of age. These results suggest that *Cg-DMI* may be involved in the development of the gonad and may constitute preliminary clues for future work in order to better understand DM protein evolution.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sex determining systems are highly variable among phyla and involve genetic and/or environmental factors (Torres-Maldonado et al., 2002). Nevertheless, all these systems involve a molecular cascade of genes coding transcriptional or mRNA splicing factors which, ultimately, orientate the gonad differentiation into a testis or an ovary. One of the most conserved genes of this molecular pathway is *Dmrt1*, the vertebrate ortholog of Doublesex (*dsx*) and *Mab-3* which regulates the male differentiation in *D. melanogaster* (Erdman and Burtis, 1993) and *C. elegans* (Shen and Hodgkin, 1988) respectively. *Dmrt1* encodes a putative transcription factor with a conserved zinc finger-like DNA-binding motif, termed DM domain. The family of the DM factors includes at least eight vertebrate and eleven invertebrate members with different tissue-specific expression patterns according to species and/or DM gene member (Hong et al., 2007). In all vertebrates examined to date *Dmrt1* expression is restricted to the differentiating and to the adult male gonads as observed in mice (Raymond et al., 2000), chicken (Smith et al., 1999), amphibians (Shibata et al., 2002), rainbow trout (Nanda et al., 2002) and *Lepidochelys olivacea* turtle (Torres-Maldonado et al., 2002). Other genes of the DM domain gene family are also expressed in gonads besides in other tissues, such as *Dmrt3*, *Dmrt5*, *Dmrt7* and *Dmrt8.2* in

the mouse embryo (Kim et al., 2003; Veith et al., 2006), *Dmrt3* in the testis of the medaka (Winkler et al., 2004), *Dmrt5* in the brain and in the germinal cells of the zebrafish (Guo et al., 2004) and *Dmrt4* in the ovary of the tilapia (Guan et al., 2000).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a marine bivalve mollusc. Its development consists of three main periods: a rapid embryonic one (during 7 h post-fertilization (hpf)), a larval period with 5 different stages (16 hpf–20 days post-fertilization (dpf)), and a spat period (from 30 dpf) after the fixation and metamorphosis of larvae (around 22 dpf) (Galtsoff, 1964), whose gonadic development is observed around 3 month old (personal observations). In the adult, the gonad is a diffuse organ made of numerous tubules separated by connective tissue, the whole constituting the gonadic area (Franco et al., 2008) and evolving according to an annual reproductive cycle subdivided into four main stages (Heude-Berthelin et al., 2001; Chavez-Villalba et al., 2003): stage 0 where gonads are restricted to dispersing small clusters of germ cells during the inactive stage; stage I corresponding to mitosis of spermatogonia or oogonia which are indiscernible at this stage as is the sex of the animal; stage II where all the stages of spermatogenesis and growing oocytes are visible in male and female gonadal tubules, respectively; and stage III corresponding to the mature reproductive stage. The oyster is a successive and irregular protandric hermaphrodite without differentiable sexual chromosomes and some studies of controlled mating have shown that the sex ratio would be paternally influenced (Guo et al., 1998). Although the oyster *vasa*-like gene, a determinant of the germline, has been identified (Fabioux et al., 2004a), the factors implied in the adult sex

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 31 56 56 87; fax: +33 2 31 56 53 46.  
E-mail address: [pascal.sourdaïne@unicaen.fr](mailto:pascal.sourdaïne@unicaen.fr) (P. Sourdaïne).

change and in sex determination during the first gonadic development remain unknown in *C. gigas*.

The objective of this work was therefore to identify a DM factor in order to have a potential marker of the gonadic differentiation in *C. gigas*. In this paper we report isolating and molecular characterization of a DM domain gene, *Crassostrea gigas DMRT-like (Cg-DM1)*. We also examined the gene expression and discussed the potential role of this factor in *C. gigas*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental animals

Animals were purchased from a local oyster nursery (SATMAR, Gatteville, France). The developmental stages were obtained by mating adults from two families, one with a sexual imbalance rate in favour of the males (14 and 32% female ratio in 2004 and 2005 respectively) and the other in favour of the females (57% female ratio in 2006). The adult oysters we used in 2005 belong to two families presenting sexual imbalance rates, with female ratios in 2004 and 2005 of 80 and 63% for one and 14 and 32% for the other, respectively.

### 2.2. Reverse transcription, cloning and sequencing

Reverse transcription was performed using oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega, Charbonnières, France), 1 µg mRNA, and 200 units of M-MLV RT. cDNAs were used as a template for PCR amplification with two degenerated primers, DMRT1-s (5'-TGCCAAAGTGTGCCAGATGT(A/C)G(A/C/G/T)AA(C/T)CA(C/T)GG-3') and DMRT1-a (5'-GGATCCAGCTCCTCCTC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(C/T)TG-3'), designed in the conserved DM domain of *Dmrt1* and corresponding to the amino acid sequences PKCARCRNHG and QAQEEELGI respectively. PCR was performed with 10 ng of male gonadic area cDNA and cycled 35 × (45 s/94 °C, 45 s/60 °C, 60 s/72 °C). The resulting 200 bp fragment isolated was used to generate full-length cDNA by 5'- and 3'-RACE-PCR with the GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Eragry sur Oise, France) using adaptor and gene specific primers T2S (5'-CGGGTGGTGTCCGGCCTTGAAGGT-3'), T2SN (5'-CGGCCTTGAAGGTCAAACGGTACTG-3'), T2A (5'-GCGCACACACAGTCCCTCATCTACAG-3'), T2AN1 (5'-CCCTCCATCTACAGTACCGTTTGTGA-3') and T2AN2 (5'-TTCAAGGCCGGACACCACCCGTGAT-3'). The search of different splicing forms of mRNA was performed using 5'- and 3'-RACE-PCR with COM5 (5'-CATGCGAGCATCCGATAGATACCCACGC-3'), DMS (5'-CCATGAGTGGTGTCCGC-3') and 5DMASB (5'-GTTGCCCTTCTGCTATCAGGG-3') primers. For amplification of full-length cDNA and genomic sequences of *Cg-DM1*, sense primers SPL52 (5'-CCAACGAAATCGCAAACACACA-3') and HDMSB (5'-GGGAAGTATGGGTGGAAGAGG-3') and anti-sense primer 3UTRas (5'-TGACATATAAGGTCAAGTAAATAACC-3') were designed in the 5' and 3' cDNA ends. *Cg-DM1* cDNA and genomic DNA were cloned into PCR1I-Topo vector using a TA cloning kit (Promega), and sequenced using ABI cycle sequencing chemistry (GENOME express, Meylan, France).

### 2.3. Screening of genomic library

A genomic library of *C. gigas* was created in λ-DASH<sub>II</sub> (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's instructions and 1.8 × 10<sup>6</sup> independent clones with an insert size between 15 and 40 kbp were recovered (Herpin et al., 2002). After amplification, a total of 50000 recombinant λ-DASH phages were plated on XL1 MRA *E. coli* strain (Stratagene), adsorbed to 5 nitrocellulose membranes, eluted and screened at different stringencies with a digoxigenin-11-dUTP labelled DM domain probe (base 152–584 of *Cg-DM1* cDNA) synthesized using a DIG DNA labelling kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Hybridizations were done during 16 h in 1% blocking reagent (Roche Diagnostics), 50% formamide, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 75 mM sodium citrate pH 7, 100 µg/ml Torula yeast RNA at 35, 45 or 50 °C. Then, washes were performed under different combinations of temperatures (35 to 65 °C) and salinities (0.5 × to 10 × SSC). Positive clones were

purified as described in Sambrook and Russell (2001) and a Southern blotting was performed on DNA digested by EcoRI using a DM probe. DNA of these clones was also blotted and subjected to differential hybridization using either a DM domain probe found in all the factors of the family, an HDM probe (HDM: "Hors domaine DM", out of the DM domain; base 584–693 of *Cg-DM1* cDNA) specific to *Cg-DM1* or an intron probe (base 441–1029 of the intronic sequence of *Cg-DM1*).

### 2.4. Phylogenetic analysis

A range of invertebrate and vertebrate protein sequences encoding DMRT homologs were aligned using the CLUSTALW software (Thompson et al., 1994). Phylogenetic analyses were performed by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using MEGA version 4 (Tamura et al., 2007).

### 2.5. Real time quantitative PCR

Quantitative RT-PCR analysis was performed using the iCycler apparatus (BioRad, Marnes-La-Coquettes, France). Total RNA was isolated from adult tissues and from developmental stages using Tri-Reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) following the manufacturer's instructions. After DNase I treatment, 1 µg of total RNA was reverse transcribed. The iQ™ SYBR Green supermix PCR kit (BioRad) was used for real time monitoring of 5 ng template cDNA amplification for 40 cycles (15 s/95 °C, 15 s/60 °C). Accurate amplification of the target amplicon was assessed by constructing a melting curve. Amplification of cDNA was performed using primers specific to the DM domain (DMS 5'-CCATGGAGTGGTGTCCGC-3', DMASB 5'-GTTGCCCTTCTGCTATCAGGG-3') or HDM domain (HDMSB 5'-GGGAAGTATGGGTGGAAGAGG-3', HDMASB 5'-AAGGTTTGGCGCCATTTGA-3'). A parallel amplification of the oyster elongation factor 1α (*EF1α*, GenBank accession no. BQ426516) reference transcript was performed using qfElong1 (5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3') and qrElong1 (5'-ACGACGATCGCATTCTCTT-3') primers. The relative mRNA levels were normalized to 100 *EF1α* transcripts using the following formula  $N = 100 \times 2^{-(Ct_{EF1\alpha} - Ct_{Cg-DM1})}$  (Lelong et al., 2007). Statistical analyses were performed using two tailed Mann–Whitney *U*-test.

### 2.6. In situ hybridization

One-cm slices of oysters were fixed in Davidson's fixative. Some sections were stained with a Prenant–Gabe trichrome according to a classical protocol (Gabe, 1968) to illustrate the structure of the organs. For *in situ* hybridization experiments, 5 µm-slices were treated with 5% proteinase K in TE buffer for 30 min at 37 °C. After a pre-hybridization for 2.5 h at room temperature (RT) and 30 min at 52 °C, hybridization was performed overnight at 52 °C with DIG-labelled sense (control) or anti-sense riboprobe (400 ng/mL) in hybridization buffer. Probes were synthesized using a DIG RNA labelling kit (Roche Diagnostics) and with the *Cg-DM1* cDNA as a template. After extensive washing (2 × SSC at RT and 0.5 × SSC at 65 °C) and blocking in 1.5% blocking reagent for 1 h, detection was performed by 2 h incubation with an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody diluted 1:500 in blocking solution, followed by 4 h incubation with 2% NBT/BCIP solution in darkness at RT. All reagents were made following the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Sections were examined and pictures were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope coupled to a Nikon DXM1200-C camera (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France).

## 3. Results

### 3.1. *Cg-DM1* cloning and sequence analysis

A complete DMRT-like sequence of 1535 bp (Fig. 1A) (GenBank accession no. EU046234) shows a 5' untranslated region (UTR) of 108 bp, an open reading frame (ORF) of 1080 bp with the ATG codon at

position 109 bp and a TAA stop codon at position 1186 bp, and a 3' untranslated region of 347 bp including a single poly(A) signal (AATAAA) at position 1490 bp, 16 bp upstream of the poly(A) tail. The full-length, continuity and sequence of this cDNA were confirmed by new RT-PCR and sequencings. The deduced amino acid sequence is 359aa long, rich in serine (22%) and proline (28%), and contains the DM domain consensus sequence (from aa 26 to 81) with conserved cysteines and histidines characteristic of the DMRT protein family (Fig. 1A and C). Amino acid alignment indicates that besides the common DM domain, there are a conserved DMA domain found in *Dmrt4* and *Dmrt5* but not in *Dmrt1* and a short conserved domain of 7aa (RSAFSP1) near the C-terminus (Fig. 1A and C; Fig. 3). New 3'RACE-PCR experiments from mRNA of 1.5 month old juvenile oysters allowed us to identify two shorter cDNA isoforms ending at 720 bp and 511 bp with poly(A) tails starting at 488 bp and 696 bp respectively but without any conventional poly(A) signal identified. The sequences of the two shorter cDNAs were identical between themselves and to the full-length cDNA (Fig. 1A). PCR amplification of genomic DNA revealed the presence of only one intron 588 bp long as for *Dmrt4* and *Dmrt5* (Fig. 1A, B and C), with a GT/AG donor/acceptor site located between the nucleotides 484 and 485 of the cDNA (Fig. 1B).

Screening of the genomic DNA library using the conserved DM domain probe allowed us to retrieve 1 to 2 positive clones per 50,000 phages, which is representative of the size of the oyster's genome, at the different conditions of stringency tested. Analysis of the 8 clones by Southern blotting after EcoRI digestion and hybridization with the DM domain probe revealed 3 types of profiles illustrated by the clones 2A1, 2B1 and 3P1 which show only one band at a size of about 2000, 3000 or 9500 bp (Fig. 2A). Dot analysis of these clones using either the conserved DM domain probe (Fig. 2B, Line 1), the specific HDM probe (Fig. 2B, Line 3) or the intron probe (Fig. 2B, Line 2) did not allow us to observe any differential hybridization (Fig. 2B) and, consequently, to identify other oyster's *Dmrt* orthologs. Controls with a DNA sample from the DIG DNA labelling kit (Roche Diagnostics) and with *Cg-DMI* DNA inserted in a PCRII-Topo vector gave positive hybridizations while the plasmid alone gave no labelling (Fig. 2B).

### 3.2. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed to investigate the relationship between *Cg-DMI* and members of the *Dmrt* family. A complete protein sequence alignment of *Cg-DMI* and members of the *Dmrt* family from both protostomes and deuterostomes indicated that *Cg-DMI* was more closely related to the *Dmrt5* of the medaka with 38% identity. The corresponding phylogenetic tree confirmed that *Cg-DMI* was clustered with *Dmrt4* and *Dmrt5* (Results not shown). When this analysis was limited to the DM domain, the highest identity rates of *Cg-DMI* were observed with the *Drosophila Dmrt99B* and tilapia *DMO* (both 98%), the medaka *Dmrt4* and *Dmrt5* (98% and 96% respectively), and human and mouse *Dmrt5* (both 96%) (Fig. 3A). As also shown in Fig. 3A, sequence comparison of this domain among different species revealed a consensus sequence of 5aa (K<sub>41</sub>GHKR<sub>45</sub>) of the putative NLS (Nuclear Localization Signal) located in a conserved zinc module consisting of intertwined CCHC and HCCC Zn<sup>2+</sup>-binding sites. With respect to the DMA domain and the short conserved motif of 7aa (RSAFSP1) of the protein (Fig. 3B), the first one shared highest levels of amino acid identity with the human *Dmrt4* and *Dmrt5* sequences (52% and 57% respectively), the coral *AmDMI* (55%), and the *Drosophila Dmrt93B* and *Dmrt99B* (44% and 36% respectively) while the second one showed highest identity rates with the human *Dmrt4* and *Dmrt5* (71% and 85% respectively), *Drosophila Dmrt93B* and *Dmrt99B* (57% and 71% respectively) and coral *AmDMI* (57%). The phylogenetic tree generated using the DM domain of oyster, human, mouse and invertebrates *Dmrt* (Fig. 4) provided evidence that *Cg-DMI* is grouped with *Dmrt5* with high bootstrap support (62). This cluster

was closer to *Dmrt4* (bootstrap of 73) than to the other members of *DMRT* family, grouped together with a bootstrap support between 88 and 100.

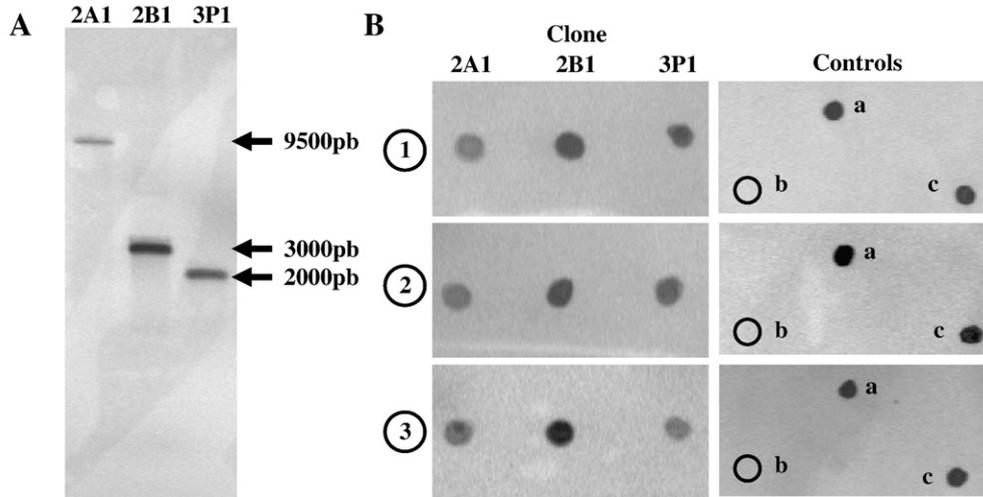
### 3.3. *Cg-DMI* expression during the development and in the adult gonads

Real time quantitative RT-PCR experiments showed, during the development (Fig. 5) as in the adult gonads (Fig. 6), the same profile of expression with both DM and HDM primers, suggesting that mRNA expression only reflects *Cg-DMI* transcript levels. During the development of the oyster, *Cg-DMI* mRNA levels were significantly increased in spat between 1 and 2 months of age (Fig. 5). In adult tissues (Results not shown), *Cg-DMI* mRNA abundance was higher in gills (mean±SEM: 0.298±0.11), labial palps (0.21±0.10) and mantle (0.13±0.07) than in gonads (mix at various gametogenetic stages; 0.02±0.01), adductor muscle (0.03±0.03) and digestive glands (0.04±0.03). A more extended analysis of *Cg-DMI* mRNA expression in the gonads of adults at different stages of the gametogenetic cycle revealed significantly increased levels in males at the end of the spermatogenetic cycle (mean±SEM: 0.51±0.47; stage III M) comparatively to females (mean±SEM: 0.015±0.008; stage III F) or to more precocious stages (Fig. 6). The variability of results observed in males at stage III, where some of them present a ten fold increase comparatively to others, was not related to histological differences of the gonads but only to individual variability. Likewise, no differences were observed between the individuals of the two families. Although the stage II male and female is not the stage where *Cg-DMI* mRNA is the most expressed, it illustrates best the cell localization of the mRNA expression by *in situ* hybridization, as seen on histological sections stained with a Prenant–Gabe trichrome, where tubules show all the types of germinal cells (Fig. 7A and D). In the male gonads (Fig. 7A–C) a cytoplasmic mRNA staining was detected in the spermatogonia and/or in the somatic cells surrounding them in the gonadal tubules (Fig. 7B). In the female gonads (Fig. 7D–H), a cytoplasmic mRNA staining, particularly intense in the juxtannuclear area, was observed in germ cells from oögonia (Fig. 7E and F) to the vitellogenic oocytes stages (Fig. 7G and H). Negative controls with the sense riboprobe gave sometimes a faint non significant signal (Fig. 7C, F and H). In the mantle (Fig. 8A–C), *Cg-DMI* mRNAs were detected in the cytoplasm of epithelial cells and large goblet cells with the anti-sense probe (Fig. 8B) but not with the sense probe (Fig. 8C). In the digestive gland (Fig. 8D–F) the mRNA expression was only found in the cytoplasm of clusters of young cryptic epithelial cells with the anti-sense riboprobe (Fig. 8E and F).

## 4. Discussion

We report here the molecular characterization of *Cg-DMI*, which is the first complete sequence of a DM factor identified in the Protostomia Lophotrochozoa phylum. The deduced serine- and proline-rich amino acid sequence presents a DM domain characteristic of the DMRT protein family and a conserved DMA domain near the C-terminus. The DMA domain is conserved with at least 50% identity in the branch of *Dmrt3*, *Dmrt4* and *Dmrt5* (Miller et al., 2003; Guo et al., 2004). The DM domain contained the putative NLS located in the zinc module consisting of intertwined CCHC and HCCC Zn<sup>2+</sup>-binding sites. NLS of many transcription factors were reported within or in the vicinity of their DNA-binding domain, including zinc finger factors, homeodomain factors, HMG box factors, and helix–loop–helix factors (Ying et al., 2007). These results suggest that the DM domain of *Cg-DMI* may have, as in other species, bi-potential functions, both DNA-binding and nuclear import (Zhu et al., 2000; Ying et al., 2007). Another conserved domain of 7aa present in the C-terminus was identified in the oyster *Dmrt* sequence and it corresponds to the first 7aa of the DMB domain found in zebrafish *Dmrt5* (Guo et al., 2004) and human *Dmrt3*, 4 and 5 (Kato et al., 2008). The genomic sequence of *Cg-DMI* only shows one intron, like *Dmrt4* and

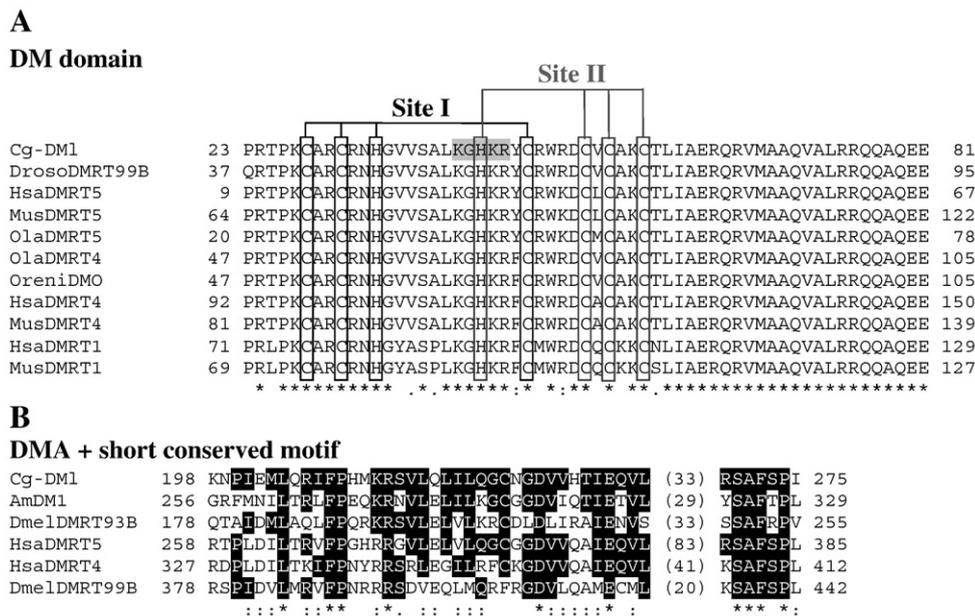




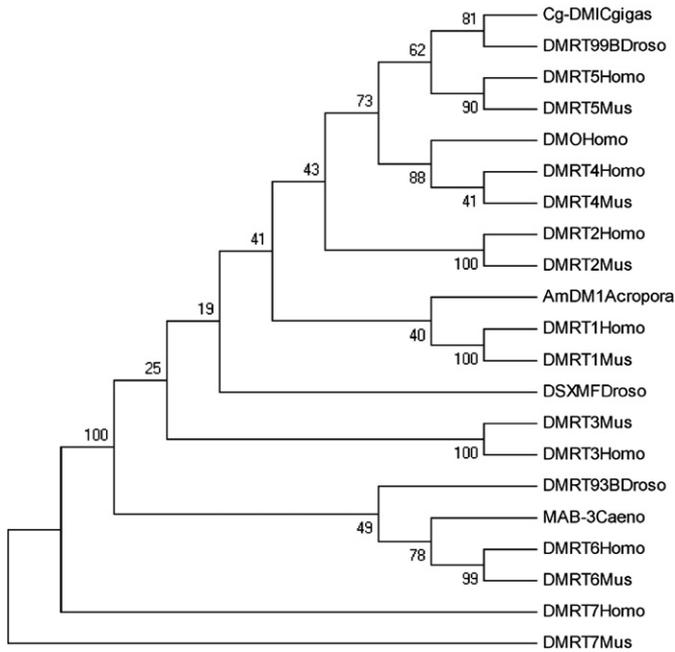
**Fig. 2.** (A) Southern blot analysis of three of the eight clones obtained from the screening of the genomic library of *C. gigas*. DNAs were digested with EcoRI and hybridized with a digoxigenin-11-dUTP labelled DM domain probe. Lane 1: clone 2A1; lane 2: clone 2B1; and lane 3: clone 3P1. For each clone, only one band was observed, around 2000, 3000 or 9500 bp. (B) Differential hybridization of the DNA of the clones 2A1, 2B1 and 3P1 with either a DM domain probe found in all the factors of the family (Line 1), the *Cg-DM1* intron probe (Line 2) or a HDM probe specific to *Cg-DM1* (Line 3). a: positive control from the DIG DNA labelling kit; b: negative control with the plasmid alone; and c: positive control with the plasmid with *Cg-DM1* DNA. The absence of differential hybridization illustrates the apparent absence of other *Dmrt* orthologs than *Cg-DM1* in the oyster.

*Dmrt5* genes (Guo et al., 2004; Yamaguchi et al., 2006) and in contrast with *Dmrt1* which presents 4 and 5 introns in mammals (Cheng et al., 2006) and fishes (Yamaguchi et al., 2006) respectively. All these results and phylogenetic analyses indicated that *Cg-DM1* was most closely related to *Dmrt4* and *Dmrt5* homologs. In the oyster, we have been unable to show the presence of other genes encoding DM factors or alternative splicing transcripts. However, 3'RACE-PCR experiments from mRNA of 1.5 month old spat allowed us to identify two additional differential polyadenylation at 488 bp and 696 bp without any AAUAAA

signal. Even if we cannot exclude oligo(dT) mismatching during the reverse transcription step, AAUAAA-independent polyadenylation has been reported for *Dmrt1* isoforms in male germ cells of the zebrafish (Guo et al., 2005). In the vertebrates and invertebrates studied so far, many DM factors or splicing transcripts have been characterized within each species, at least three in *Ciona intestinalis* as in the mosquito *Anopheles gambiae* and coral, four in *Drosophila*, six in fishes, eight in human and eleven in *Caenorhabditis elegans* (Volf et al., 2003; Hong et al., 2007). In vertebrates, these factors, like *Dmrt4* and 5 are expressed



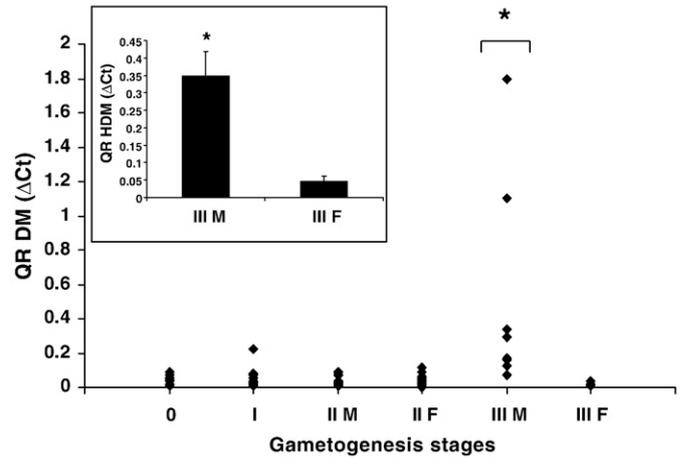
**Fig. 3.** (A) Alignment of amino acid sequences of the DM domain of oyster *Cg-DM1*, *Drosophila Dmrt99B*, mouse (*Mus*), human (*Hsa*) and medaka (*Ola*) *Dmrt4* and *Dmrt5*, tilapia (*Oreni*) *DMO* and mouse and human *Dmrt1*. Identical amino acids are indicated by asterisks. Amino acids with conserved similarities are indicated by dots or colons. The short conserved NLS (Nuclear Localization Signal) (KGHKR) is grey-shaded and the zinc module consisting of intertwined CCHC and HCCC Zn<sup>2+</sup>-binding sites are indicated with grey (Site II) and black (Site I) boxes. (B) Alignment of amino acid sequences of the DMA domain and the short conserved motif of oyster *Cg-DM1*, coral *AmDM1*, *Drosophila DmelDmrt93B* and *99B* and human (*Hsa*) *Dmrt4* and *Dmrt5*. Identical amino acids to oyster *Cg-DM1* are dark-shaded. Conserved amino acids between all sequences are indicated by stars. Amino acids with conserved similarities are indicated by dots or colons. Alignments were generated using CLUSTAL W. The numbers of the amino acid residues at the beginning and the end of the domains are indicated. (GenBank accession no. *Cg-DM1* (EU046234), *DrosoDMRT99B* (NP\_524549), *HsaDMRT5* (NM\_032110), *MusDMRT5* (AY145837), *OlaDMRT5* (AB083691), *OlaDMRT4* (AB055958), *OreniDMO* (AF203490), *HsaDMRT4* (BC130435), *MusDMRT4* (AF542047), *HsaDMRT1* (NM\_021951), *MusDMRT1* (NM\_015826), *AmDM1* (AF530064), *DmelDMRT93B* (NP\_524428).



**Fig. 4.** Phylogenetic tree generated using the DM domain of the *DMRT* proteins showing that *Cg-DMI* is clustered together with *DMRT5*. Phylogenetic analysis was performed by neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using *MEGA4* (Tamura et al., 2007). Numbers in the branches represent the bootstrap values (%) from 100 replicates (Felsenstein, 1985). (GenBank accession no. EU046234, NP\_524549, NM\_032110, AY145837, AK096011, BC130435, AF542047, AF130729, AF539811, AF530064, NM\_021951, NM\_015826, NP\_524272, AF541936, NM\_021240, NP\_524428, AF022388, AJ291671, AF542048, AJ291669, AF542046).

in other tissues on top of the gonads, suggesting that they may control a broader range of biological processes (Hong et al., 2007). The presence, in *Cg-DMI*, of a DMA domain specific to *Dmrt4* and 5 in vertebrates, also found for the coral *AmDM1*, reinforces the hypothesis that the ancestral DM proteins possessed a DMA domain (Miller et al., 2003; Volff et al., 2003). Therefore, *Cg-DMI*, as an ancestral DM factor, might be involved in a large range of biological processes whereas evolution has led to diverse DM factors, some as *Dmrt4* and 5 which may also have large functions associated to the ancestral structure and others with a more specific role, such as *Dmrt1* in sex differentiation.

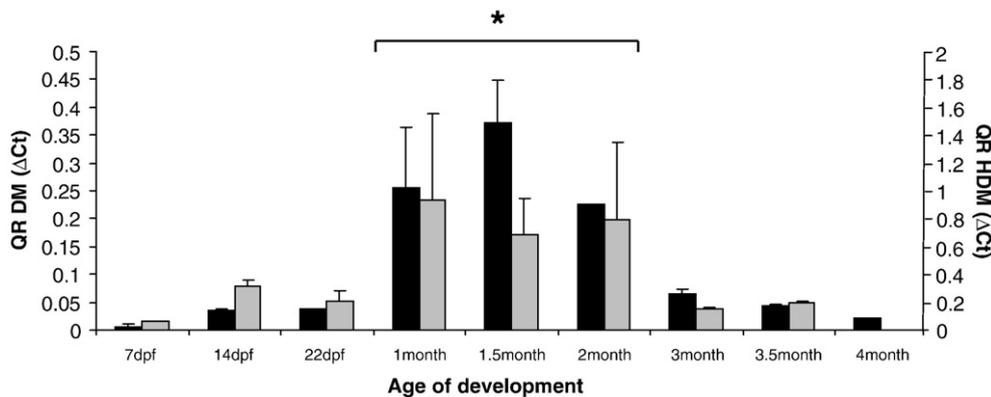
In order to know if *Cg-DMI* mRNA expression is gonad specific, i.e. in agreement with a role in the gonadic differentiation, we performed real time PCR in adult tissues. The expression was ubiquitous, in the



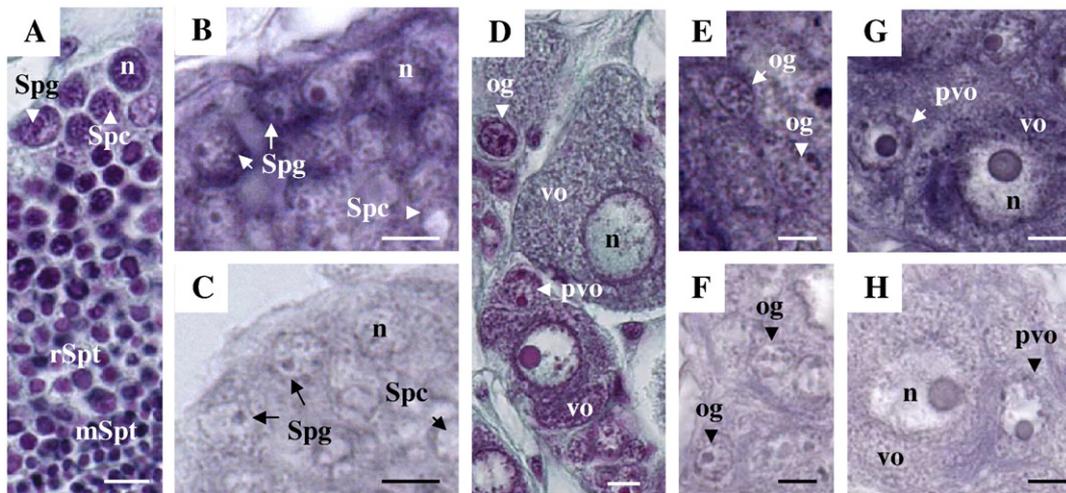
**Fig. 6.** Real time RT-PCR transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle with DM (diamonds) and HDM (insert) primers. Stage 0: undifferentiated gonad ( $n=9$ ); Stage I: gonia mitosis and sex indiscernible ( $n=29$ ); Stage II: active spermatogenesis (IIM,  $n=21$ ) and growing oocytes (IIF,  $n=58$ ); Stage III: male (IIIM,  $n=8$ ) and female (IIIF,  $n=5$ ) mature stage. QR: Relative Quantity, arbitrary units. These graphs show mRNA levels significantly increased (\*: $P<0.05$ ) in males at the end of the spermatogenetic cycle compared to females or to more precocious stages.

gills, labial palps, mantle, adductor muscle, digestive gland and gonads. *Dmrt4* and *Dmrt5*, to whom *Cg-DMI* is more related, have also shown different tissue expressions, including gonads, depending on the species considered (Guan et al., 2000; Kim et al., 2003; Guo et al., 2004). By *in situ* hybridization, *Cg-DMI* mRNA expression was restricted to particular cells, the epithelial cells in the mantle and young cryptic epithelial cells which may renew the stock of old epithelial cells in the digestive gland (Galtsoff, 1964). DM factor expression has also been observed in potentially high proliferating tissues such as *Dmrt4* in the embryonic gonad, brain and olfactory system respectively in mice (Kim et al., 2003) and medaka fish (Winkler et al., 2004), and *Dmrt5* in the developing nervous system in the zebrafish (Guo et al., 2004).

Although *Cg-DMI* is expressed in several adult tissues, its involvement in the gonadic development of the oyster is not excluded. By *in situ* hybridization, in the testis, it is observed in the cytoplasm of spermatogonia and/or somatic cells surrounding them although it is impossible at this microscopic level to differentiate the germ cell and the somatic cell limits. However, these results are in agreement with the expression of *Dmrt5* and *Dmrt1* in testicular germ cells of the



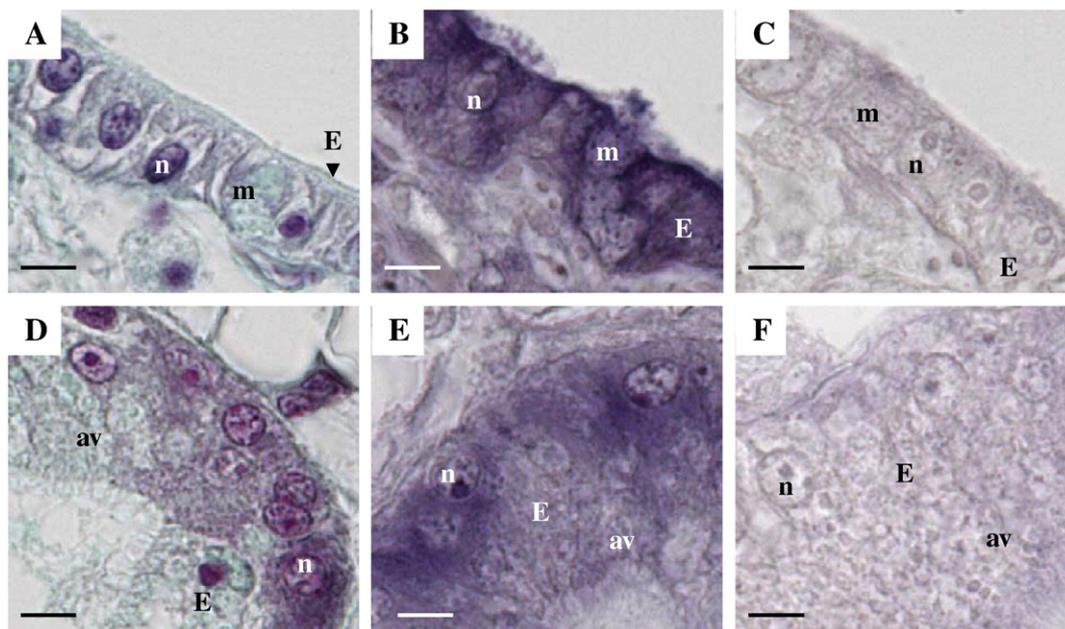
**Fig. 5.** Real time RT-PCR transcripts quantification relative to *EF1α* in developmental stages of *C. gigas* with DM (black bars) and HDM (grey bars) primers. Total RNAs were isolated from veliger larvae of 7 and 14 days post-fertilization (7 and 14 dpf), post-metamorphosis larvae (22 dpf) and 1 to 4 month old spat (1, 1.5, 2, 3, 3.5 and 4 months). QR: Relative Quantity, arbitrary units. Values are mean  $\pm$  SEM of triplicates. These graphs show mRNA levels significantly increased (\*: $P<0.05$ ) in spat between 1 and 2 months of age compared to the other developmental stages.



**Fig. 7.** Histological sections of gonads of stage II male (A) and female (D) stained with a Prenant–Gabe trichrome–*Cg-DM1* mRNA expression pattern by *in situ* hybridization with anti-sense riboprobe (B, E and G) and sense riboprobe (C, F and H). Male (A–C) and female (D–H) gonads with mRNA staining in the cytoplasm of the spermatogonia and/or of the somatic cells surrounding them (B) and in the oogonia (E), pre-vitellogenic and vitellogenic oocytes respectively (G). mSpt: mature spermatids, n: nucleus, og: oogonia, pvo: pre-vitellogenic oocyte, rSpt: round spermatids, Spc: spermatocytes, Spg: spermatogonia, and vo: vitellogenic oocyte. Bars: 5 μm.

zebrafish and the grouper (Guo et al., 2004, 2005; Xia et al., 2007) or of *Dmrt1* which is expressed either in spermatogonia and Sertoli cells (Raymond et al., 2000) or in Sertoli cells only (Winkler et al., 2004; Yamaguchi et al., 2006) depending on the species. Associated with this variable cell location of expression, *Cg-DM1* may have divergent roles in the gonad, such as an involvement in the proliferation of spermatogonia and differentiation of Sertoli cells as found for *Dmrt1* in vertebrates (Fahrioglu et al., 2007; Herpin et al., 2007; Kim et al., 2007; Lei et al., 2007). By real time PCR, *Cg-DM1* mRNA was expressed (i) in the adult gonads of both sexes as reported for *Dmrt1*, 2, 3, 4 and 5 in some vertebrates (Guan et al., 2000; Guo et al., 2004, 2005; Matsushita et al., 2007), (ii) with a significant increase in males, but not in females, at the end of the gametogenetic cycle, i.e. just before the resting period of the gonad. In hermaphrodites such as the black

porgi (He et al., 2003) and the grouper (Xia et al., 2007), changes in expression profile of *Dmrt1* appeared correlated to the ovary/testis transition. In *C. gigas*, where only some individuals of a male population change to female, such a correlation between the *Cg-DM1* expression profile variation and sex transition remains to be precised. Considering that *Cg-DM1* is expressed in spermatogonia, the highest transcript levels should be observed for stage II as in stage III, although real time PCR results only mention an increase in stage III. This apparent disagreement might be explained, in stage III, by an increase of the number of spermatogonia as other germ cells, not only due to their proliferation as in stage II but also to an increase of the gonadic volume from 5–40% of the visceral mass in the less mature animals to 60% at stage III (Fabioux et al., 2004a). Whatever the testicular cells expressing *Cg-DM1*, we have observed that some males at stage III



**Fig. 8.** Histological sections of the mantle (A) and the digestive gland (D) stained with a Prenant–Gabe trichrome–*Cg-DM1* mRNA expression pattern by *in situ* hybridization with anti-sense riboprobe (B and E) and sense riboprobe (C and F). Mantle (B) with *Cg-DM1* mRNA expression in the cytoplasm of epithelial cells and large goblet cells. Digestive gland (E) with mRNA staining in the cytoplasm of clusters of young cryptic epithelial cells. av: apical vesicles; E: epithelium, m: mucous, and n: nucleus. Bars: 5 μm.

present higher levels of Cg-DM1 mRNA than others without any histological differences. This could be in agreement with Guo et al. (1998) who reported that two types of males could exist in the oyster.

During the development, Cg-DM1 mRNA expression measured by real time PCR increased in spat between 1 and 2 months of age. This period of the development takes place between the larvae metamorphosis occurring around 22 days post-fertilization and the 3 month old spat stage which shows gonadic tissue (personal observations). To our knowledge, only one study by Fabioux et al. (2004b) deals with the development of the gonad during the organogenesis of the oyster by following the *in situ* expression of the oyster vasa-like gene, a determinant of the germline. These authors hypothesized that cells giving rise to putative primordial germ cells proliferate and migrate to the anterior and the posterior sides of the body during the late larval stages to differentiate again, in spat, into two groups of germinal stem cells which, at sexual maturity, would proliferate intensively to form the gonadal tubules. Therefore, the kinetic of the Cg-DM1 mRNA expression appears in accordance with the development of the gonad in *C. gigas*.

Cg-DM1, as an ancestral DM factor, might be involved in a large range of biological processes and its role in cell proliferation and/or differentiation during the development of the gonad remains to be precised.

### Acknowledgements

This research is supported by Conseil Régional de Basse-Normandie (CRAB) and by DRAM/IFOP funds. The authors are grateful to Christophe Lelong for helpful discussions, to Béatrice Adeline for technical assistance, to the SATMAR staff and to Christophe Joubel for the English proofreading. Amine Naimi is supported by a Conseil Régional de Basse-Normandie-SATMAR grant.

### References

- Chavez-Villalba, J.E., Cochard, J.-C., Le Pennec, M., Barret, J., Enriquer-Diaz, M., Caceres-Martinez, C., 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 721–731.
- Cheng, H.H., Ying, M., Tian, Y.H., Guo, Y., McElreavey, K., Zhou, R.J., 2006. Transcriptional diversity of DMRT1 (DSX- and mab3-related transcription factor 1) in human testis. *Cell Res* 16, 389–393.
- Erdman, S., Burtis, K., 1993. The Drosophila doublesex proteins share a novel zinc-finger-related DNA binding domain. *EMBO J* 12, 527–535.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004a. 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., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004b. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 320, 592–598.
- Fahrioglu, U., Murphy, M.M., Zarkower, D., Bardwell, V.J., 2007. mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sexual Dev* 1, 42–58.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaire, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40, 251–269.
- Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques. Masson et Cie eds., Paris Vlème, France.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (G.). *Fish. Bull. U.S.* 64, 1–480.
- Guan, G., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 272, 662–666.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen Jr., S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52, 394–402.
- Guo, Y., Li, Q., Gao, S., Zhou, X., He, Y., Shang, X., Cheng, H., Zhou, R., 2004. Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of Dmrt5 of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 324, 569–575.
- Guo, Y., Cheng, H., Huang, X., Gao, S., Yu, H., Zhou, R., 2005. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 330, 950–957.
- He, C.L., Du, J.L., Wu, G.C., Lee, Y.H., Sun, L.T., Chang, C.F., 2003. Differential Dmrt1 transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Cytogenet Genome Res* 101, 309–313.
- Herpin, A., Favrel, P., Cunningham, C., 2002. Gene structure and expression of cg-ALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Genes* 301, 21–30.
- Herpin, A., Schindler, D., Kraiss, A., Hornung, U., Winkler, C., Schartl, M., 2007. Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene Dmrt1bY. *BMC Dev. Biol* 7, 99.
- Heude-Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., Kellner, K., 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* of two different growing area (Normandy and Atlantic shore, France). *Invert. Reprod. Dev* 40, 79–86.
- Hong, C.S., Park, B.Y., Saint-Jeanet, J.P., 2007. The function of Dmrt genes in vertebrate development: it is not just about sex. *Dev. Biol* 310, 1–9.
- Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Colbourn, J.K., Tatarazako, N., Watanabe, H., Iguchi, T., 2008. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. *Genomics* 91, 94–101.
- Kim, S., Kettlewell, J.R., Anderson, R.C., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2003. Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr. Patterns* 3, 77–82.
- Kim, S., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2007. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. *Dev. Biol* 307, 314–327.
- Lei, N., Hornbaker, K.I., Rice, D.A., Karpova, T., Agbor, V.A., Heckert, L.L., 2007. Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. *Biol. Reprod* 77, 66–475.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quéré, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Cg-TGF- $\beta$ , a TGF- $\beta$ /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 30–38.
- Matsushita, Y., Oshima, Y., Nakamura, M., 2007. Expression of DMRT genes in the gonads of *Rana rugosa* during sex determination. *Zool. Sci* 24, 95–99.
- Miller, S.W., Hayward, D.C., Bunch, T.A., Miller, D.J., Ball, E.E., Bardwell, V.J., Zarkower, D., Brower, D.L., 2003. A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. *Evol. Dev* 5, 251–258.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., Schartl, M., 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11778–11783.
- Raymond, C., Murphy, M., O'Sullivan, M., Bardwell, V., Zarkower, D., 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14, 2587–2595.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol* 4, 406–425.
- Sambrook, Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shen, M.M., Hodgkin, J., 1988. mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54, 1019–1031.
- Shibata, K., Takase, M., Nakamura, M., 2002. The Dmrt1 expression protein in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol* 27, 232–241.
- Smith, C.A., McClive, P.J., Western, P.S., Reed, K.J., Sinclair, A.H., 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402, 601–602.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4637–4680.
- Torres-Maldonado, L.C., Landa, P.A., Moreno, M.N., Marmolejo, V.A., Meza, M.A., Merchant, L.H., 2002. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol* 129, 20–26.
- Veith, A.M., Klattig, J., Dettai, A., Schmidt, C., Englert, C., Volf, J.N., 2006. Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less Dmrt8 genes in the mouse. *Genomics* 88, 185–195.
- Volf, J.N., Zarkower, D., Bardwell, V.J., Schartl, M., 2003. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J. Mol. Evol* 57, 1–9.
- Winkler, C., Hornung, U., Kondo, M., Neuner, C., Duschl, J., Shima, A., Schartl, M., 2004. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal dmrt genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev* 121, 997–1005.
- Xia, W., Zhou, L., Yao, B., Li, C.J., Gui, J.F., 2007. Differential and spermatogenic cell-specific expression of DMRT1 during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 263, 156–172.
- Yamaguchi, A., Lee, K.H., Fujimoto, H., Kadomura, K., Yasumoto, S., Matsuyama, M., 2006. Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol. D* 1, 59–68.
- Ying, M., Chen, B., Tian, Y., Hou, Y., Li, Q., Shang, X., Sun, J., Cheng, H., Zhou, R., 2007. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin- $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 804–813.
- Zhu, L., Wilken, J., Phillips, N.B., Narendra, U., Chan, G., Stratton, S.M., Kent, S.B., Weiss, M.A., 2000. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev* 14, 1750–1764.

## Annexes Chapitre I

### • Annexe 1 : Prédiction de la conformation protéique en 3D de Cg-DMI

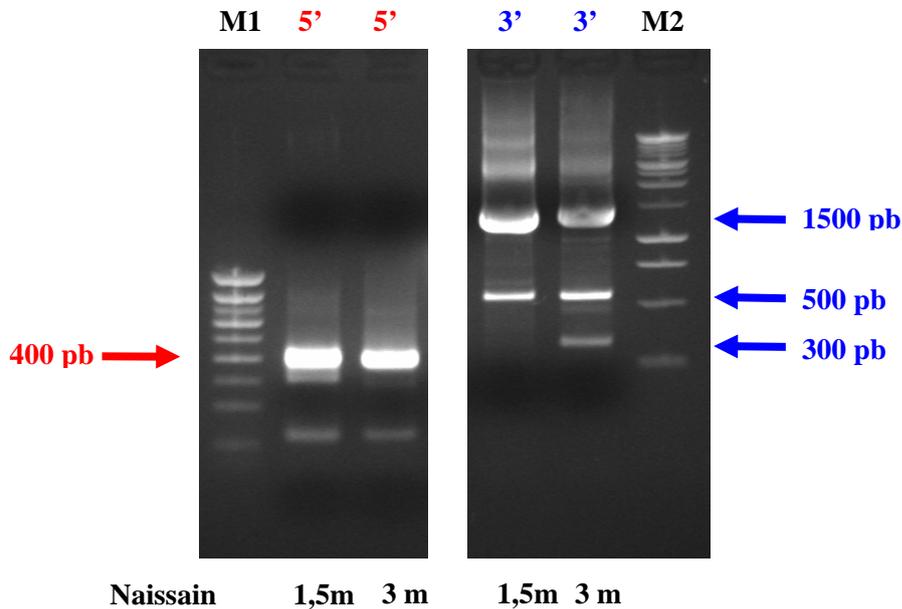
Une prédiction de la structure tridimensionnelle du domaine DM de Cg-DMI a été réalisée par modélisation informatique avec le logiciel *I-Tasser* (Wu *et al.*, 2007; Zhang, 2007; Zhang, 2008) à partir des structures des facteurs à domaine DM définies en cristallographie et en RMN (Figure 23). D'après les scores d'homologie, le domaine DM de Cg-DMI serait très proche structurellement des facteurs Dmrt, dont Dsx de *D. melanogaster* (Zhu *et al.*, 2000). Cg-DMI montre les deux hélices  $\alpha$  conservées, une courte hélice  $\alpha$  du côté N-terminal et une plus longue qui s'étend jusqu'à la queue C-terminale. Ainsi, outre la conservation de séquence en acides aminés du domaine DM et sa parenté phylogénétique avec les facteurs Dmrt, il montre la même structure tridimensionnelle supposant une conservation de fonction des facteurs Dmrt au cours de l'évolution.



**Figure 23 : Structure tridimensionnelle du domaine DM de Cg-DMI.**

La structure 3D de Cg-DMI, réalisée avec le logiciel *I-Tasser* (Wu *et al.*, 2007 ; Zhang, 2007 ; Zhang, 2008), montre deux hélices (en rose), une hélice  $\alpha$  courte du côté N-terminal et une plus grande du côté C-terminal.

• Annexe 2 : Recherche d'un épissage alternatif de *Cg-DMI*



**Figure 24 : Recherche d'un épissage alternatif du transcrit *Cg-DMI* aux extrémités 3' et 5' par RACE-PCR sur du naissain de 1 et 1,5 mois.**

Marqueurs de taille M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> : respectivement *Smartladder SF* (de 100 à 1000 pb) et 1kb (Promega®). m : mois.

Un seul fragment d'environ 400pb est apparu à l'extrémité 5' alors que trois formes différemment poly-adenylées ont été identifiées à l'extrémité 3'. Elles présentent des tailles d'environ 1500, 500 et 300pb selon la position du signal de polyadénylation.

**A**

Cg-DMI-b Transcrit de 300pb

CTTGAAAGGTCACAAACGGTACTGTAGATGGAGGGACTGTGTATGCGCAAAATGCACCCTGATAGCAGAAAGGCA  
ACGCGTGATGGCGGCTCAGGTGGCGCTCAGAAGACAGCAAGCCCAGGAGGAGAACGAAGCCAGGGAATTGGGGAT  
GCTCTATGGACCTAATGGTCTCCTCCAGCTGAATCCTGAAACTATCACCATGTTTCTGATGCCAAGAAAAGTGGT  
TGATAACAAGCGGGAGTGACAGAGAGGATGGACCAGCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**B**

Cg-DMI-b Séquence peptidique correspondante de 89 acides aminés

LKGHKRYCRWRDCVCAKCTLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEENEARELGMLYGPNGLLQLNPETIT  
MFPDAKKVVDTSKSDREDGPATK

**C**

Cg-DMI-c Transcrit de 500pb

CTTGAAAGGTCACAAACGGTACTGTAGATGGAGGGACTGTGTATGCGCAAAATGCACCCTGATAGCAGAAAGGCA  
ACGCGTGATGGCGGCTCAGGTGGCGCTCAGAAGACAGCAAGCCCAGGAGGAGAACGAAGCCAGGGAATTGGGGAT  
GCTCTATGGACCTAATGGTCTCCTCCAGCTGAATCCTGAAACTATCACCATGTTTCTGATGCCAAGAAAAGTGGT  
TGATAACAAGCGGGAGTGACAGAGAGGATGGACCAGCTACAAAACGACAAAAGCTAGACTCTTCCAGAACCATT  
TCCGGTTTTCGCGGTGTTTCATCAGAAGATATGAACGAGAGGACGCATTCACCAGCCGATTCAACATCGCCTCCGAC  
ATCTCCAAAACCTTGAGATCCGCCCTCACCAAGCGATGACAAAACCGGAACCATTCCCAAAAGTCCCCCTTTGAGGA  
AGGTCTTCTGGCAGGTAACCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**D**

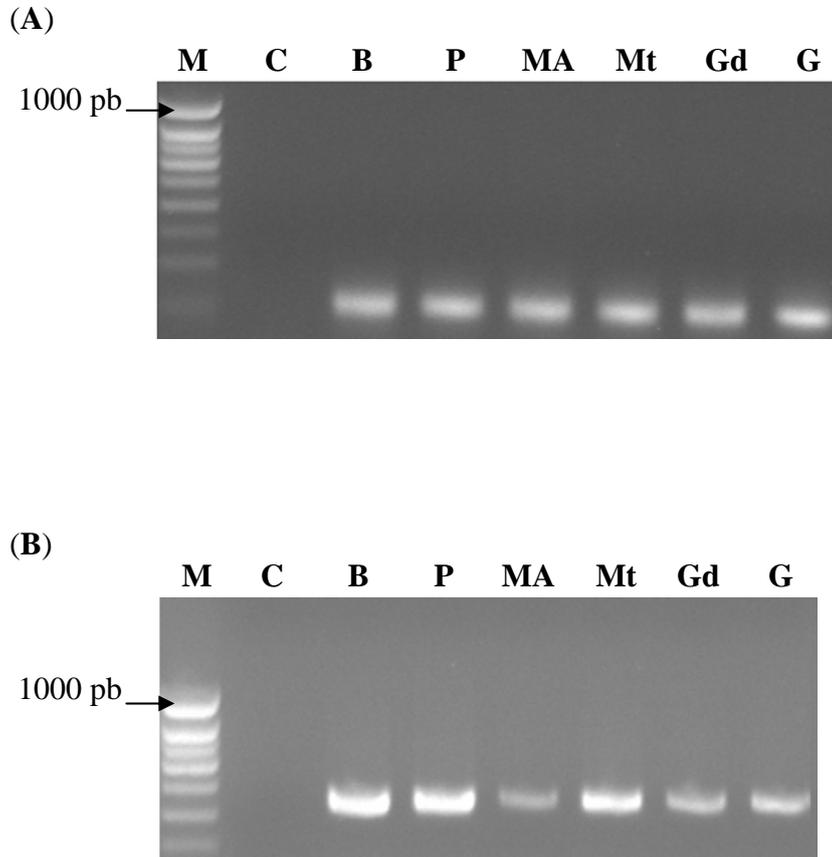
Cg-DMI-c Séquence peptidique correspondante de 159 acides aminés

LKGHKRYCRWRDCVCAKCTLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEENEARELGMLYGPNGLLQLNPETIT  
MFPDAKKVVDTSKSDREDGPATKRQKLDSSRTDSPVSRCSSEDMNERTHSPADSTSPPTSPKLADPPSPS  
DDKPEFPKSPFEEGLLAGNSKK

**Figure 25: Séquences nucléiques (A, C) et protéiques (B, D) des fragments de 300pb (nommée Cg-DMI-b) (A, B) et de 500pb (nommée Cg-DMI-c) (C, D) des isoformes différenciellement poly-adenylées de Cg-DM dans la région 3'.**



• **Annexe 3 : Expression des transcrits *Cg-DMI* dans les différents tissus de l'huître adulte par RT-PCR classique et en temps réel**

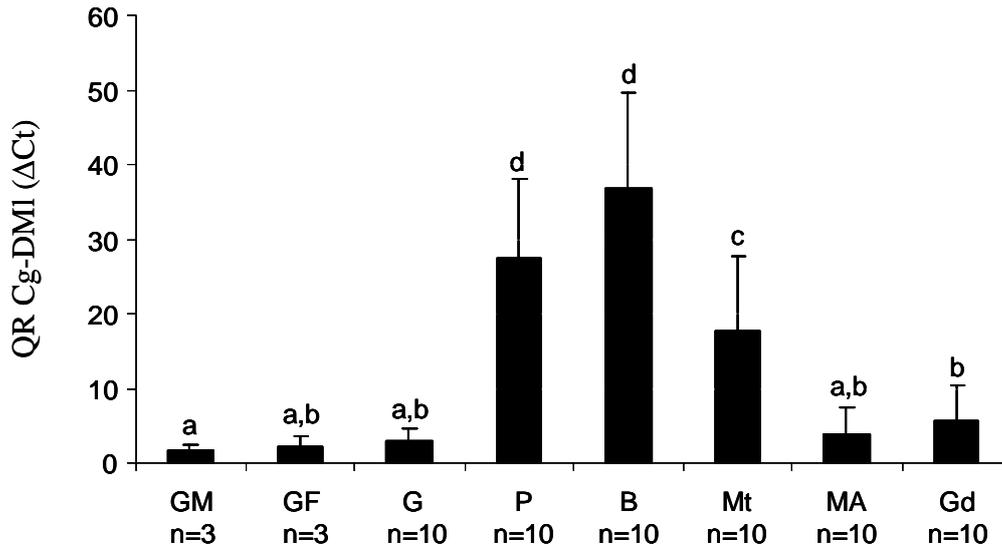


**Figure 27: RT-PCR d'ARNm de différents tissus d'huîtres.**

(A): Produits d'amplification du facteur d'élongation *EFl-α*, utilisé comme gène de référence avec les amorces qfElong et qrElong. (B): Produits d'amplification de *Cg-DMI* obtenus avec des amorces spécifiques. Les tissus proviennent de 5 animaux différents. L'échantillon de gonades est composé de 4 femelles et d'1 mâle.

**M:** Marqueur de taille *Smartladder SF* (Promega®); **C:** Contrôle négatif sans ADNc; **B:** Branchies; **P:** Palpes labiaux; **MA:** Muscle Adducteur; **Mt:** Manteau; **Gd:** Glande digestive; **G:** Gonade.

Les transcrits *Cg-DMI* sont détectés dans tous les tissus testés (branchies, palpes labiaux, muscle adducteur, manteau, glande digestive et gonades).



**Figure 28: Quantité relative des transcrits *Cg-DMI* dans divers tissus d’huître analysée par RT-PCR en temps réel.**

Les barres représentent l’écart moyen et les lettres (a, b, c et d) correspondent aux différences significatives entre les groupes (seuil de significativité de 5%) selon le test de Mann-Whitney.

n = 3 à 10 individus selon les tissus; **G**: Gonade (mélange); **P**: Palpes labiaux; **B**: Branchies; **Mt**: Manteau; **MA**: Muscle Adducteur; **Gd**: Glande digestive; **GM**: Gonades Mâles; **GF**: Gonades Femelles.

L’expression des transcrits *Cg-DMI* est significativement plus élevée dans les branchies, les palpes labiaux et le bord du manteau que dans le muscle adducteur, la glande digestive ou les gonades des deux sexes. Aucune différence d’expression entre les gonades mâles et femelles n’a été détectée.

## • Annexe 4 : Expression de la protéine et/ou du transcrite de Cg-DMI dans les tissus adultes et au cours du développement

Ce travail a été réalisé par immunohistochimie et *Western Blotting* avec un anticorps monoclonal anti-Dmrt1 humain de souris (Abnova® – H00001761-M01), dont l'épitope nous est inconnu et qui est susceptible de reconnaître Cg-DMI chez l'huître. Le premier anticorps primaire testé, anti-DmrtA2 humain polyclonal de lapin (Abcam® – ab27917), choisi d'après la ressemblance structurale de Cg-DMI avec les facteurs Dmrt4 et 5, a donné des résultats peu satisfaisants qui ne sont donc pas présentés ici. Les sondes utilisées pour l'hybridation *in situ* sont les mêmes que celles mentionnées dans l'Article illustrant ce Chapitre et sont spécifiques de Cg-DMI.

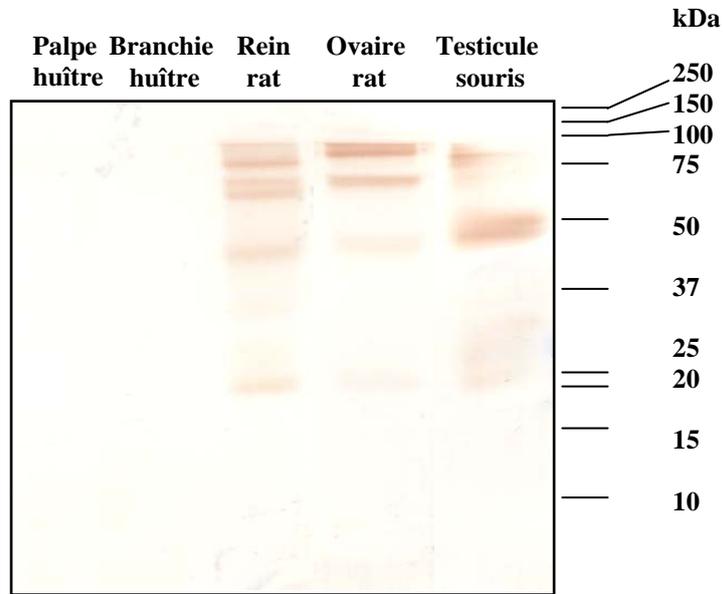
### 4.1. Expression de la protéine chez les adultes par *Western Blotting*

Dans un premier temps, la spécificité de l'anticorps a été vérifiée par *Western blotting* à partir d'extraits protéiques de reins et ovaires de rats, de testicules de souris et de palpes et branchies d'huître. La membrane marquée avec l'anticorps anti-Dmrt1 humain présente plusieurs bandes (Figure 29). Une bande d'environ 50 kDa est marquée au niveau du rein et de l'ovaire de rat et avec une intensité plus élevée, au niveau du testicule de souris. Une bande d'environ 20 kDa, d'intensité plus faible et deux bandes de haut poids moléculaire, entre 70 et 100 kDa, sont retrouvées dans ces mêmes organes. Quelques bandes apparaissent dans les puits sans extrait, probablement dues à des «contaminations» lors des dépôts dans les puits voisins. Pour les extraits d'huîtres également testés avec cet anticorps, aucune bande n'est apparue, que ce soit dans les palpes, les branchies ou la gonade (Résultats non illustrés).

Ces résultats ont été confirmés par d'autres *Western Blottings* et renforcés par des résultats sur d'autres organes (Résultats non illustrés) Le testicule de rat révèle une bande de la même taille que dans les extraits de testicule de souris (entre 40 et 50 kDa) mais d'intensité plus faible. Aucun marquage n'a été mis en évidence dans l'extrait de gonade d'huître, bien que celle-ci ait été dissociée du tissu de réserve.

Par *western blot* avec un anticorps anti-Dmrt1, aucune expression du facteur Cg-DMI n'a été détectée dans les branchies, les palpes, la gonade d'huître. Ceci pourrait être expliqué soit par une faible expression de la protéine dans ces organes soit par une absence de

reconnaissance de Cg-DMI par l'anticorps. Par contre, les témoins positifs (rat et souris) ont révélé la présence de plusieurs bandes dont une à la taille attendue, validant l'utilisation de cet anticorps. En effet, la bande entre 40 et 50 kDa exprimée fortement dans le testicule de souris, dans une moindre mesure dans le rein de rat et très faiblement dans l'ovaire de rat correspondrait à la taille de 40kDa attendue pour la protéine Dmrt1 chez le rat et la souris (respectivement N° Accession **NP\_056641** et **AAK57706** – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La bande observée dans l'ovaire et le rein soulève des questions car elle atteste de la présence de protéine dans des organes où l'ARNm de Dmrt1 n'a pas été retrouvé chez cette espèce (Raymond *et al.*, 1999b). Les bandes observées à 20 kDa pourraient correspondre à d'autres facteurs Dmrt dont l'épitope pourrait être reconnu, comme par exemple dans le testicule de souris, Dmrt8.1 et 8.2 respectivement de tailles 19 et 26 kDa (N° Accession: **NP\_081867** et **NP\_001034205** - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Les bandes de tailles entre 70 et 100 kDa pourraient correspondre à Dmrt3, Dmrt4 ou Dmrt5, dont les ARNm sont exprimés dans le testicule de souris adulte (Kim *et al.*, 2003) et dont les séquences peptidiques font respectivement 93, 121 et 104 kDa (respectivement N° Accession **XP\_001078962**, **XP\_001055710**, **XP\_001068179**- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Figure 29 : Western Blot à partir de tissus d’huîtres, de rat et de souris.**

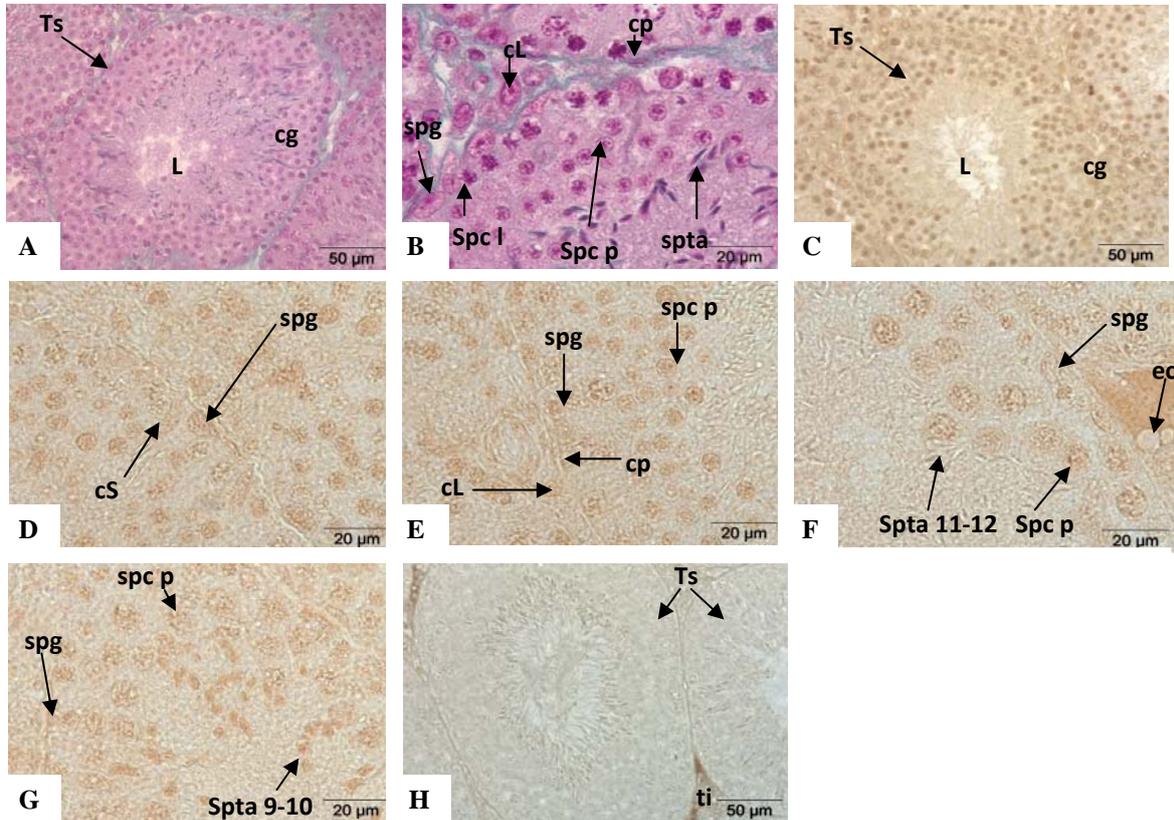
Anticorps primaire anti-Dmrt1 humain de souris (dilution 1 $\mu$ g/ml); Anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de souris couplé à la peroxydase (dilution 1/1000).

Quantité de protéines : 100 $\mu$ g/puit.

## **4.2. Localisation de l'expression de la protéine de Cg-DMI chez les adultes par immunohistochimie**

L'étude de la localisation de l'expression de la protéine de Cg-DMI chez les adultes de *C. gigas* avait pour objectif de confirmer l'expression ubiquiste des ARNm, présents notamment dans les cellules germinales et/ou somatiques des tubules des gonades mâles et femelles ainsi que dans les cellules épithéliales du manteau, des branchies et des jeunes cellules cryptiques de la glande digestive.

Ce travail a été réalisé avec le même anticorps que celui utilisé en *Western Blotting*. La spécificité de l'anticorps a été vérifiée en immunohistochimie sur des coupes de testicules de souris dont la structure est observée en parallèle grâce à une coloration au trichrome de Prenant-Gabe. Chaque tubule séminifère de testicule (Figure 30A, B) est limité par des cellules péritubulaires et est entouré de tissu interstitiel qui contient des cellules de Leydig. Chaque tubule contient des cellules de Sertoli et des cellules germinales qui se différencient et diminuent en taille au cours de la spermatogenèse centripète (Figure 30A, B). De la périphérie à la lumière du tubule sont présents des spermatogonies ovales avec un gros noyau et des amas chromatinien, des spermatocytes I leptotènes avec des amas chromatinien puis des spermatocytes I pachytènes, plus nombreux (stade le plus long) et plus gros et finalement des spermatides allongées aux stades 9 à 12. La présence simultanée de ces types de cellules germinales illustre les stades gamétogénétiques IX à XII (Figures 30B et 31). Sur la coupe de testicule de souris immunomarquée, les noyaux de toutes les cellules somatiques (péritubulaires, Leydig et Sertoli) (Figures 30D, E) et germinales (Figures 30C-G) sont marqués à l'exception des spermatides allongées de stades 11 à 12 (Figure 30F). Le contrôle négatif, en absence d'anticorps primaire anti-Dmrt1 ne met en évidence aucun marquage au sein des tubes séminifères. Un marquage non spécifique est néanmoins observé dans le tissu interstitiel, notamment dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 30 H), comme sur le contrôle positif (Figure 30 F).



**Figure 30: Immunohistochimie du testicule de souris.**

Anticorps Ire anti-Dmrt1 humain de souris (dilution 4μg /ml); Anticorps Ire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 1/1000).

**A, B:** Colorations au trichrome de Prenant-Gabe. **C- G:** Contrôles positifs. **H:** Contrôle négatif.

cg: cellule germinale, cL: cellule de Leydig, cp cellule péri tubulaire, cS: cellule de Sertoli, ec: élément du système circulatoire, L: lumière, spc l: spermatocyte léptotène, spc p: spermatocyte pachytène, spg: spermatogonie, spta 9-10: spermatide allongée 9-10, spta 11-12: spermatide allongée 11-12, ti: tissu interstitiel, Ts: tubule séminifère.

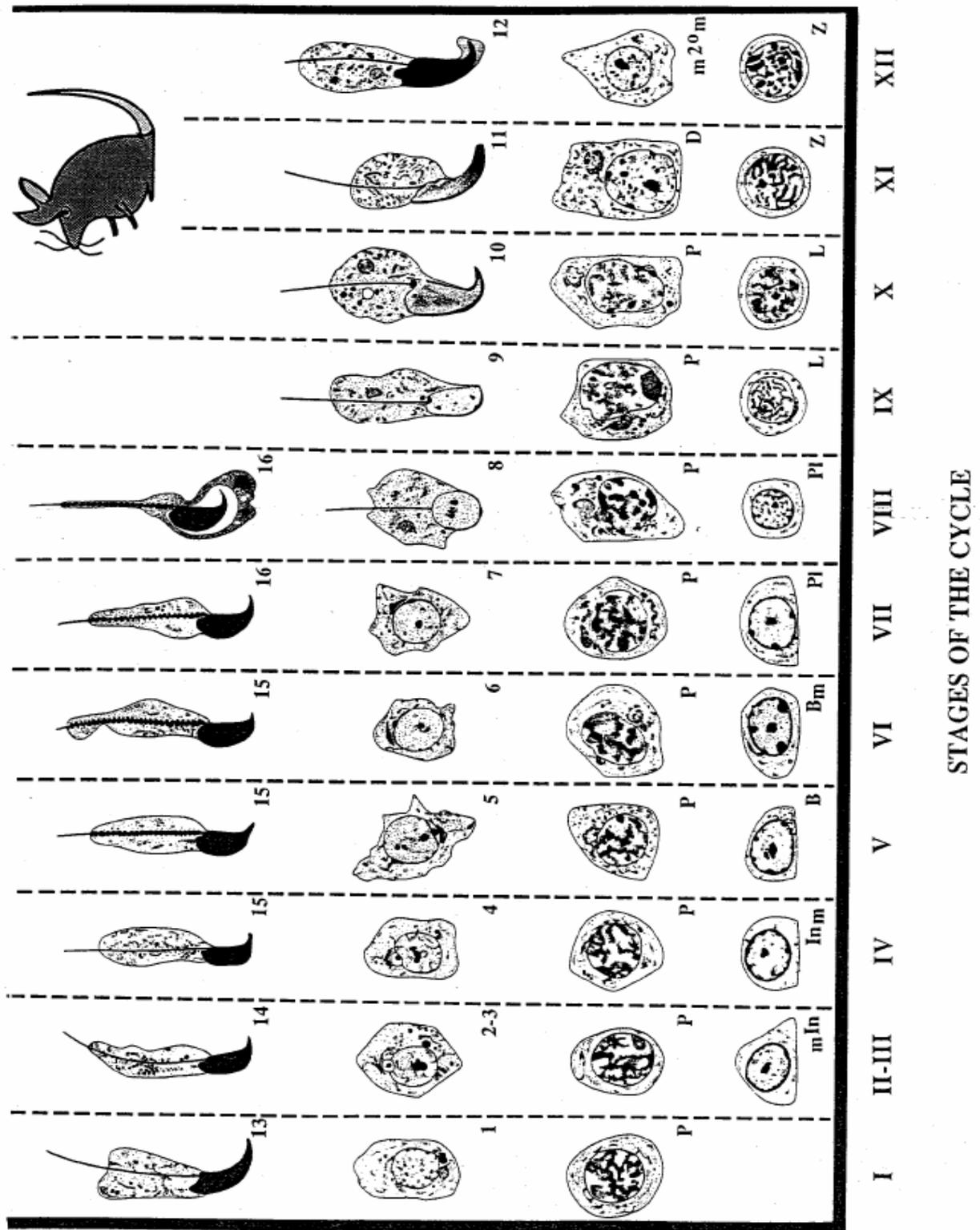


Figure 31: Stades de gamétogenèse de la souris (d'après Russell *et al.*, 1990)

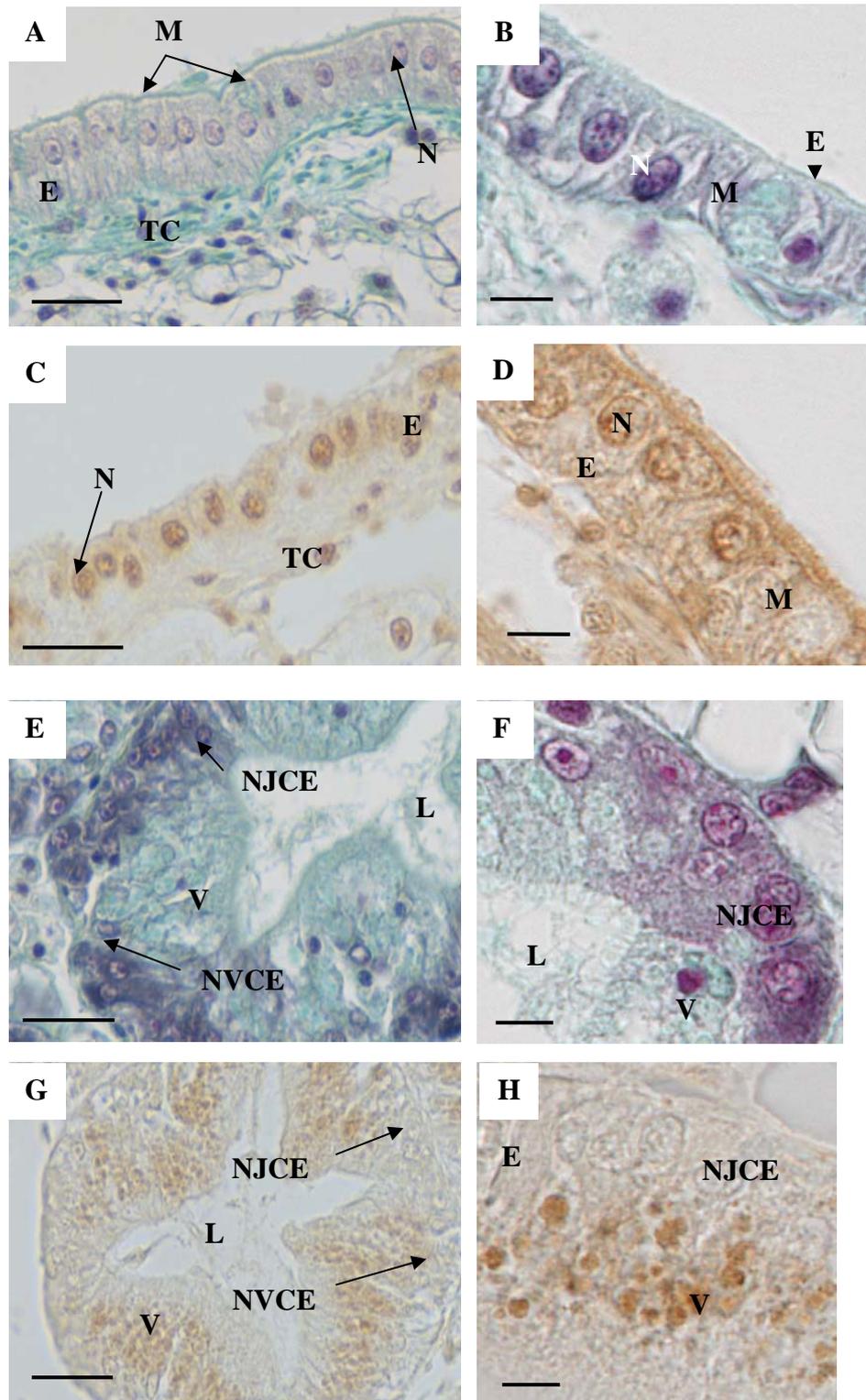
Chez *C. gigas*, la structure de chaque organe, observée grâce à une coloration au trichrome de Prenant-Gabe, est décrite selon Galtsoff (1964). Dans les branchies, les lamelles sont délimitées par un épithélium simple stratifié et cilié reposant sur un tissu conjonctif. L'IHC montre un marquage des noyaux des cellules épithéliales et de certaines cellules du tissu conjonctif (Résultats non illustrés). Le manteau est recouvert de cellules épithéliales cylindriques présentant un gros noyau central et de larges cellules caliciformes qui reposent sur la membrane basale et le tissu conjonctif (Figures 32A, B). Comme dans les branchies, un marquage nucléaire des protéines est localisé dans les cellules épithéliales (Figures 32C, D). L'épithélium des glandes digestives, entouré de tissu conjonctif, est composé de larges cellules non ciliées avec un gros noyau basal. En coupe histologique (Figures 32E, F), la lumière des tubes forme une croix, délimitée aux pointes par des jeunes cellules épithéliales cryptiques avec un cytoplasme foncé et ailleurs par des cellules épithéliales plus âgées contenant de nombreuses vésicules apicales. Un immunomarquage est observé essentiellement au niveau de vésicules apicales des cellules épithéliales plus grosses et âgées (Figures 32G, H). La gonade d'huître est un tissu mixte et non permanent constitué de tubules gonadiques dont les prolongements s'insinuent dans le tissu conjonctif vésiculeux. Chez le mâle à maturité au stade IIIa (Figures 33A-E), les tubules gonadiques contiennent non seulement des cellules somatiques mais aussi des spermatogonies, des spermatocytes et des spermatides qui se différencient de manière centripète (Figures 33A, C). Un marquage nucléaire des protéines est mis en évidence dans les cystes à spermatogonies et à spermatocytes mais pas dans ceux à spermatides (Figures 33B, D). Dans les gonades des femelles matures (Figures 33F-K), des follicules à différents stades ainsi que des ovogonies, des ovocytes aux stades pré-vitellogéniques, vitellogéniques et matures sont observables (Figures 33F, H). Un marquage nucléaire et parfois légèrement cytoplasmique des protéines est observable dans les follicules, les ovogonies et tous les stades ovocytaires (Figures 33G, I et J). Aucun marquage n'apparaît sur les contrôles négatifs (Figures 33E, K).

Ainsi, les résultats obtenus dans les testicules de souris valident la spécificité de l'anticorps en mettant en évidence une expression nucléaire de la protéine détectée par l'anticorps, dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes, spermatides rondes et allongées) semblable à celle observée par Pask *et al.* (2003). Les résultats obtenus chez l'huître montrent une expression protéique de Cg-DMI apparentée à celle de Dmrt4 et Dmrt5, localisée dans de nombreux tissus mais limitée à certains types cellulaires. Dans la branchie, le manteau et la glande digestive, Cg-DMI est

exprimé dans les cellules épithéliales. Dans la glande digestive, la protéine a été localisée dans des groupes de jeunes cellules épithéliales cryptiques qui peuvent renouveler le stock de cellules épithéliales plus âgées (Galtsoff, 1964). L'expression de facteurs à domaine DM a également été observée dans des tissus à fort potentiel prolifératif tels que *Dmrt4* dans la gonade embryonnaire de la souris (Kim *et al.*, 2003) mais aussi le cerveau et le système olfactif en développement du médaka (Winkler *et al.*, 2004). Même si le rôle biologique de la plupart des facteurs à domaine DM doit encore être précisé, une étude de Herpin *et al.* (2007) chez le médaka a mis en évidence un rôle de *Dmrt1Y*, gène dupliqué de *Dmrt1* sur le chromosome Y, dans la régulation négative de la prolifération des cellules germinales primordiales. De même, des travaux menés chez la souris suggèrent que *Dmrt1* pourrait être impliqué dans la prolifération post-natale des spermatogonies et la différenciation des cellules de Sertoli (Fahrioglu *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007a et b). Chez l'huître, le rôle de Cg-DMI dans la prolifération et la différenciation cellulaire reste à préciser.

Même si Cg-DMI est exprimé dans plusieurs tissus et dans les gonades des deux sexes, son rôle dans le développement gonadique n'est pas exclu. Dans le testicule, il est exprimé dans les cystes contenant tous les stades de la spermatogenèse, des spermatogonies aux spermatocytes. Ces résultats sont en accord avec la localisation de l'expression de *Dmrt1* et *Dmrt5* dans les cellules germinales testiculaires chez le poisson zèbre (Guo *et al.*, 2004, 2005) mais aussi de *Dmrt1* dans les cellules de Sertoli (Yamaguchi *et al.*, 2006) ou les spermatogonies (Kim *et al.*, 2007a et b) selon les espèces. Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé dans les cellules de Sertoli et les spermatogonies dans le testicule embryonnaire puis uniquement dans les spermatogonies après la naissance (Lei *et al.*, 2007).

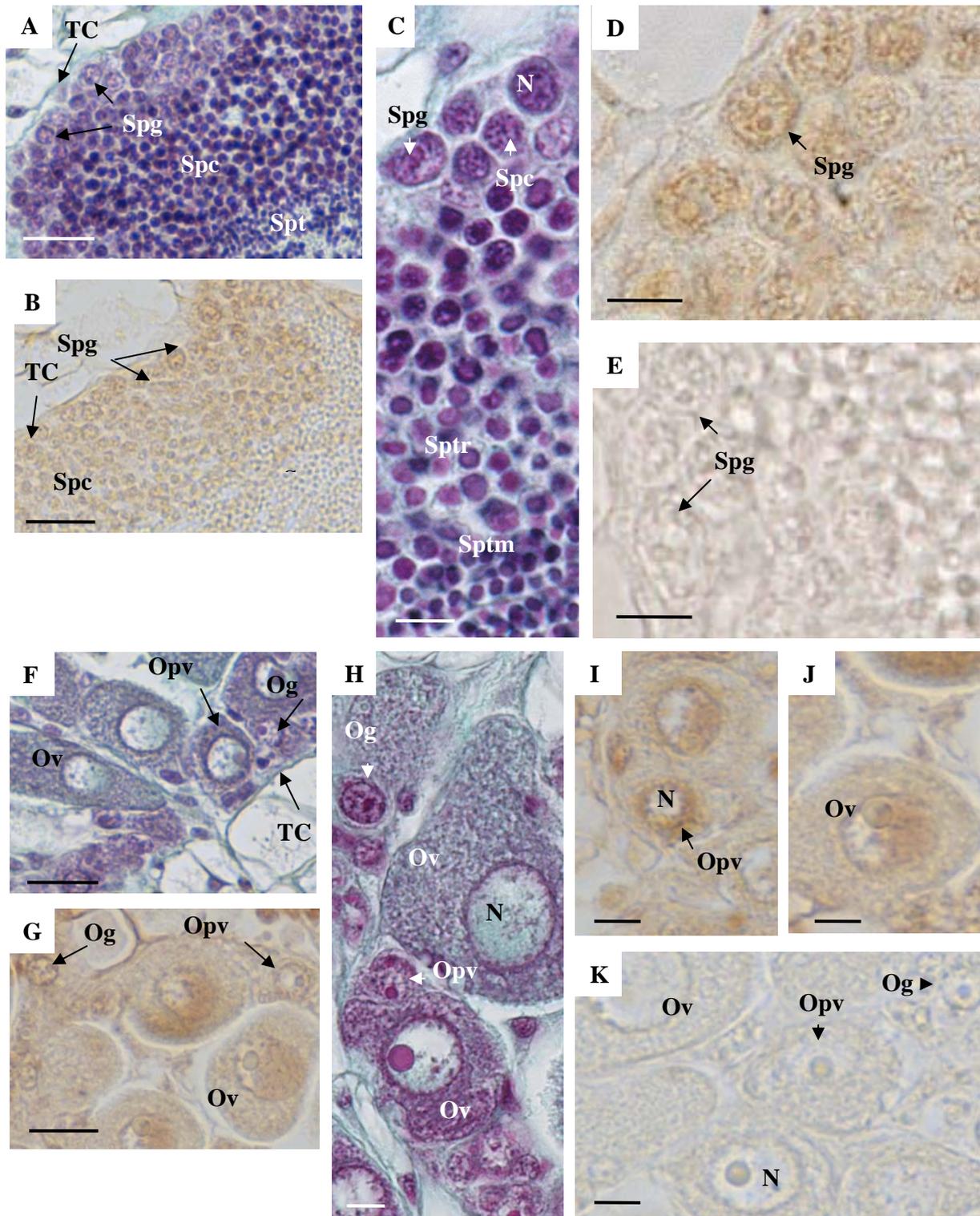
Cg-DMI est aussi exprimé dans le tissu ovarien. Ceci a également été démontré pour *Dmrt4* chez le tilapia (Guan *et al.*, 2000) et pour *Dmrt1* et *Dmrt5* chez le poisson zèbre (Guo *et al.*, 2004, 2005). Les souris femelles dont le gène *Dmrt4* a été invalidé, sont stériles et leurs ovaires présentent des follicules polyovulaires, suggérant ainsi que *Dmrt4* régule la folliculogenèse plutôt que le développement gonadique (Balciuniene *et al.*, 2006). Récemment, chez les amphibiens, l'analyse de *Dmrt2*, *3* et *5* durant la période du déterminisme sexuel laisse supposer que ces trois gènes pourraient être impliqués dans le développement testiculaire mais aussi ovarien (Matsushita *et al.*, 2007).



**Figure 32 : Expression de la protéine Cg-DMI dans le manteau (A - D) et la glande digestive (E - H) de *C. gigas*.**

A, B, E et F: coloration au trichrome de Prenant-Gabe. C, D, G et H: Immunohistochimie avec l'anticorps anti-Dmrt1. Les contrôles négatifs sans anticorps primaire en immunohistochimie ne sont pas illustrés mais aucun marquage n'est apparu.

E: épithélium, L: lumière, M: mucus, N: noyau, NJCE: noyau des jeunes cellules épithéliales, NVCE: noyau des vieilles cellules épithéliales, TC: tissu conjonctif, V: vacuoles. Echelles: A, C, E et G: 10µm; B, D, F et H: 2µm



**Figure 33 : Expression de la protéine Cg-DMI dans la gonade mâle (A - E) et la gonade femelle (F-K) au stade IIIa chez *C. gigas*.**

A, C, F et H: coloration au trichrome de Prenant-Gabe. B, D, E, G, I, J et K: immunohistochimie avec l'anticorps anti-Dmrt1. E, K: Contrôles négatifs sans anticorps primaire.

N: noyau; Og: ovogonie, Opv: ovocyte pré-vitellogénique, Ov: ovocyte vitellogénique, Spc: spermatocyte, Spt: spermatide, Sptm: spermatide mature; Sptr: spermatide ronde; Spg: spermatogonie, TC: tissu conjonctif. Echelle: 10μm.

### **4.3. Localisation de l'expression des transcrits et/ou de la protéine de Cg-DMI chez des larves véligères et du naissain âgé de 1 mois par hybridation *in situ* et /ou immunohistochimie**

Afin de préciser le rôle de Cg-DMI au cours de la mise en place de la première gonade, nous nous sommes intéressés à localiser son expression au cours du cycle de développement. Cette étude a été initiée sur les larves véligères par hybridation *in situ* et/ou immunohistochimie et chez le naissain de 1 mois uniquement avec la seconde approche.

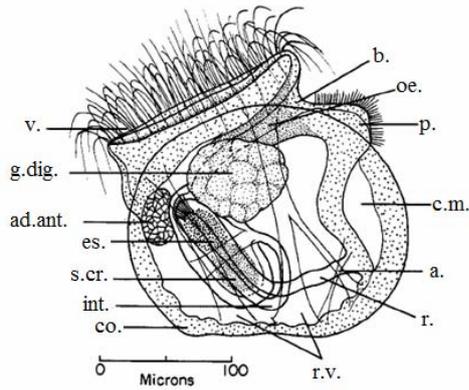
D'après Galtsoff (1964) (Figure 34), la masse viscérale des larves véligères (environ 100µm) est limitée par l'épithélium du manteau (Figures 35A, D) recouvert lui-même d'une coquille. La larve présente un vélum (Figures 35A, C), un tube digestif fonctionnel avec notamment un estomac au contact de la glande digestive (Figures 35A, B) et une ébauche de pied (Résultats non illustrés) formés d'un épithélium cilié ainsi que des muscles adducteur antérieur et rétracteurs du vélum (Figures 35A, B). Chez ce stade de développement, en IHC (Figures 35E-G, L), un marquage nucléaire et cytoplasmique spécifique est observé dans les cellules épithéliales de la glande (Résultats non illustrés) et du tube digestifs (Figures 35E, G), du manteau (Résultats non illustrés) et du vélum (Figures 35E, F). Un marquage intense des muscles est également mis en évidence sur les coupes marquées (Figures 35E, G). Il semble spécifique même s'il est présent avec une faible intensité sur les contrôles négatifs (Figure 35L). En HIS, un marquage cytoplasmique spécifique des ARNm est observé uniquement avec la sonde anti-sens (Figure 35H-J et K) dans les mêmes tissus, (i) au pôle apical des cellules épithéliales de la glande et du tube digestifs (Figure 35H, I), (ii) dans les muscles (Figures 35H - J), (iii) dans l'épithélium du manteau (Figures 35H, J) et du vélum (Résultats non illustrés).

La forme et le plan d'organisation du naissain de 1 mois (environ 1mm), illustrés sur le dessin de la Figure 36 et sur les coupes histologiques de la Figure 37, sont semblables à ceux d'un adulte. Seule la localisation protéique a été étudiée chez ce stade de développement. Le marquage, à la fois cytoplasmique et péri-nucléaire, absent des contrôles négatifs (Figures 37I - L), est observé (i) dans l'épithélium et les pièces chitineuses des lamelles branchiales (Figures 37A, B, E, F), (ii) dans les cellules du manteau (Résultats non illustrés), (iii) dans les cellules épithéliales du tube digestif (Figures 37A, C, E, G). Dans la glande digestive,

l'immunomarquage est présent dans des vésicules de sécrétion apicales présentes dans certaines cellules épithéliales (Figures 37D, H).

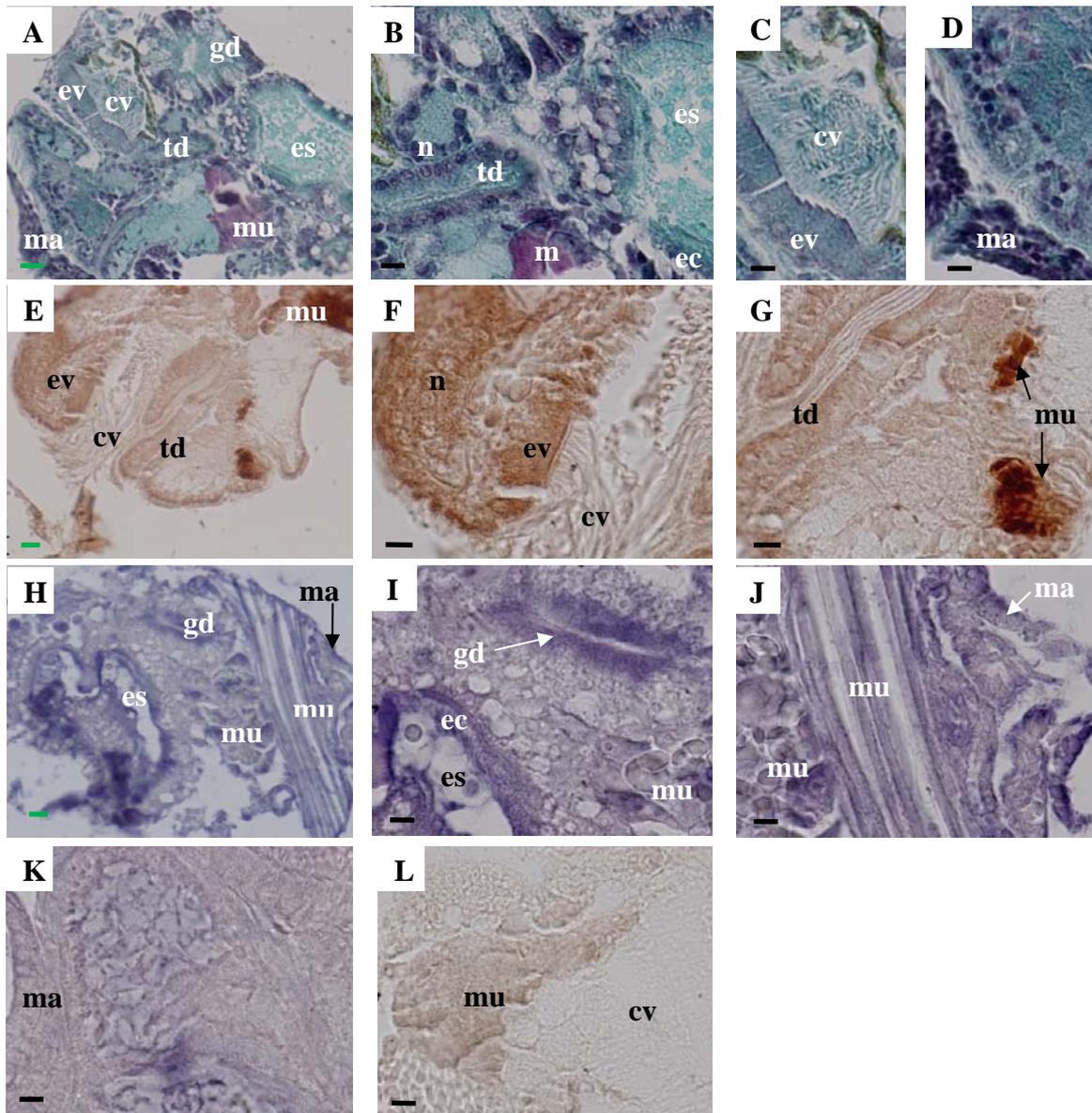
Cg-DMI est présent dans les muscles et les épithéliums du manteau, de l'appareil digestif et du velum chez la larve véligère et dans les épithéliums du manteau, du système digestif et des branchies chez le naissain de 1 mois. Cette localisation ubiquiste est cohérente avec l'expression de facteurs à domaine DM observée dans des tissus embryonnaires. En effet, chez le xénope, le poisson medaka et *Xiphophorus maculatus*, l'expression de *Dmrt4* notamment dans le système olfactif et les arcs branchiaux, suggère un rôle dans le développement et la neurogenèse du système olfactif (Kondo *et al.*, 2002 ; winkler *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2005b ; Veith *et al.*, 2006). *Dmrt5* est exprimé dans le cerveau embryonnaire chez le poisson zèbre (Guo *et al.*, 2004), le poisson platy (Veith *et al.*, 2006) et la souris (Kim *et al.*, 2003). Ainsi, une expression de Cg-DMI dans divers tissus lors de l'embryogenèse pourrait renforcer l'hypothèse d'un rôle dans la prolifération/différenciation cellulaire mentionné chez les adultes, même si le cas du vélum, censé régresser à la fin du stade larvaire pour disparaître complètement chez le naissain, reste inexpliqué.

Cependant, l'expression ubiquiste de Cg-DMI n'exclut pas un rôle dans la mise en place et le développement de la gonade embryonnaire. En effet, un rôle de Cg-DMI dans la prolifération et la différenciation cellulaire, notamment lors de la mise en place de la lignée germinale, peut être envisagé. Dans de nombreux groupes, comme les Mammifères ou les Amphibiens, au cours de l'embryogenèse les cellules germinales (primordiales et souches) se multiplient et se différencient lors de leur migration (Wylie, 1999). Chez l'huître, la formation de la lignée germinale au cours de l'ontogenèse a été décrite en suivant l'expression de *Oyvg*, qui est un marqueur de cette lignée cellulaire chez *C.gigas* (Fabioux *et al.*, 2004a). Les transcrits de *Oyvg* sont localisés au niveau du pôle végétatif des ovocytes non fécondés et transmis maternellement à l'embryon. Au cours du développement précoce, ces transcrits maternels sont observés dans un seul des blastomères (du macromère CD au stade 2 cellules jusqu'au mésentoblaste 4d de la blastula). A partir de ce stade, le mésentoblaste se divise en deux amas de cellules qui migrent de part et d'autre de la masse viscérale et qui pourraient correspondre aux cellules germinales primordiales. Ces cellules se multiplient pendant leur migration et chez les juvéniles, elles se différencient en cellules germinales souches, qui entrent en prolifération pour former les tubules gonadiques à la maturité sexuelle (Fabioux *et al.*, 2004b).

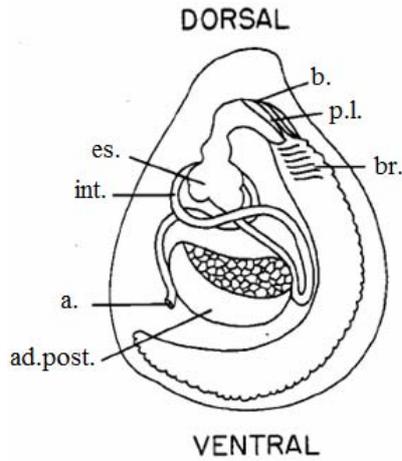


**Figure 34 : Dessin d'une larve véligère d'*Ostrea edulis* (Galtsoff, 1964).**

**a.:** anus, **ad.ant.:** muscle adducteur antérieur, **b.:** bouche, **c.m.:** cavité du manteau, **co.:** coquille, **es.:** estomac, **g.dig.** glande digestive, **int.:** intestin, **oe.:** œsophage, **p.:** rudiment de pied, **r.:** rectum, **r.v.:** muscles rétracteurs du velum, **s.cr.:** sac style cristallin, **v.:** velum.

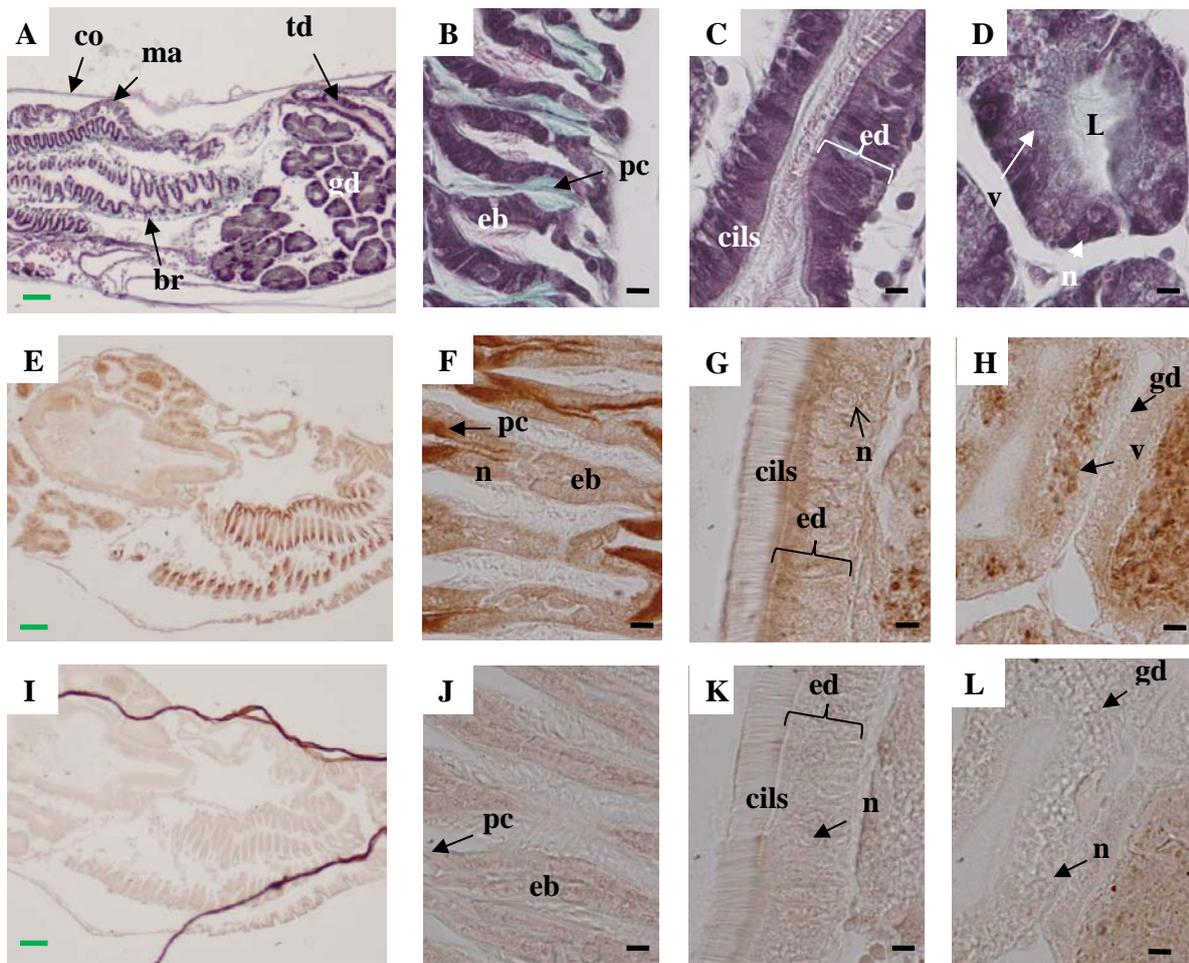


**Figure 35 : Expression de la protéine et du transcrit de Cg-DMI chez la larve véligère de *C. gigas*. A - D:** coloration au trichrome de Prenant-Gabe. **E - G:** immunohistochimie avec l'anticorps anti-Dmrt1. **H - J:** hybridation *in situ* avec la sonde anti-sens. **K, L:** contrôles négatifs respectivement en HIS (sonde anti-sens) et IHC en absence d'anticorps primaire. cv: cils du vélum, ec: épithélium cilié, ev: épithélium du vélum, es: estomac, gd: glande digestive, n: noyau, td: tube digestif, ma: manteau, mu: muscle. Echelles: verte 10µm, noire 5µm.



**Figure 36 : Dessin d'une huître juvénile (naissain) d'*Ostrea edulis* (Galtsoff, 1964).**

**a.:** anus, **ad.post.:** muscle adducteur postérieur, **b.:** bouche, **br.:** branchies, **es.:** estomac, **int.:** intestin, **p.l.:** palpes labiaux,



**Figure 37 : Expression de la protéine Cg-DMI chez le naissain de 1 mois de *C. gigas*.**

**A - D:** coloration au trichrome de Prenant-Gabe. **E - H:** immunohistochimie avec l'anticorps anti-Dmrt1. **I - L:** contrôles négatifs. **B, F, J:** branchies. **C, G, K:** glande digestive. **D, H, L:** tube digestif

br: branchie, co: coquille, eb: épithélium branchial, d: épithélium digestif, gd: glande digestive,

L: lumière, lb: lamelle branchiale, pc: pièce chitineuse, ma: manteau, td: tube digestif, v: vésicules. Echelles: verte 50 µm, noire 5 µm.

Dans le premier chapitre, nous avons présenté l'étude de la caractérisation moléculaire et de l'expression d'un facteur à domaine DM, Cg-DMI. Ce dernier ne présente pas un profil classique d'acteur moléculaire du déterminisme du sexe, à savoir une expression gonade-spécifique et précocément dimorphique. Sans exclure un rôle dans ce mécanisme, Cg-DMI pourrait être impliqué dans la prolifération cellulaire et/ou la différenciation, notamment durant le développement gonadique chez *C. gigas*. Nous avons donc recherché un deuxième acteur potentiel du déterminisme sexuel chez l'huître. L'étude des cascades du déterminisme sexuel chez les Métazoaires a montré la présence de *Foxl2*, marqueur moléculaire le plus précoce de la différenciation ovarienne identifié à ce jour chez les Mammifères (Cocquet *et al.*, 2002) et conservé des Cnidaires au Mammifères (Nakamoto *et al.*, 2006).

Nous avons donc entrepris, dans un premier temps, la caractérisation d'un orthologue de *Foxl2* par la même approche que celle développée lors du premier chapitre. Ainsi, à partir d'ARNm de gonade d'huître, une séquence partielle d'un ADNc codant un domaine *Forkhead* a été identifiée par RT-PCR avec des amorces dégénérées puis complétée par 5' et 3' RACE-PCR. Cet ADNc a été nommé *Cg-Foxl2* (Annexe 1). L'analyse de la séquence de *Cg-Foxl2* (Structure protéique 3D en Annexe 2), l'alignement des séquences protéiques des facteurs Fox des Protostomiens et des Deutérostomiens ainsi que l'établissement des arbres phylogénétiques montrent que *Cg-Foxl2* est apparenté aux facteurs de la sous-classe Foxl2, en particulier Foxl2b de la truite arc en ciel et Foxl2 de la cione. L'analyse entreprise sur l'ADN génomique n'a révélé aucun intron dans les 926 premières paires de bases de la séquence.

Dans un deuxième temps, la fenêtre d'expression spatio-temporelle de ce facteur a été déterminée. Pour cela, nous avons étudié son expression au cours du développement, dans les différents tissus adultes ainsi que dans les gonades mâles et femelles au cours du cycle gamétogénétique adulte par RT-PCR en temps réel à l'aide de couples d'amorces spécifiques de *Cg-Foxl2*. Afin de faire le parallèle avec la mise en place de la gonade au cours du développement et les réversions sexuelles lors de la reprise du cycle gamétogénétique adulte, l'étude de l'expression de Cg-DMI et Oyvlg, un marqueur des cellules germinales chez *C. gigas* (Fabioux *et al.*, 2004a) a également été entreprise. L'analyse a été complétée par une étude en histologie chez certains stades de naissain. Chez les adultes, les transcrits *Cg-Foxl2* sont exclusivement exprimés dans les gonades, à l'exception des palpes labiaux. L'expression gonadique, à la fois mâle et femelle, croît régulièrement au cours du cycle gamétogénétique adulte, en accord avec le développement des gonades. Cette augmentation est significative dès

le stade II chez les femelles, période de vitellogenèse. Durant le développement, l'expression des transcrits *Cg-Foxl2* diminue significativement chez le naissain entre 1-1,5 et 3 mois d'âge, Ceci contraste avec les pics d'expression de *Oyvlg* et *Cg-DMI* observés au même moment, et qui semblent en accord avec les migrations cellulaires observées lors de la mise en place de la gonade. *Cg-Foxl2* présente également un pic d'expression non significatif à 3,5 mois, stade pour lequel on assiste à une reprise de gamétogenèse dans la gonade déjà formée.

En conclusion, cette étude a permis, pour la première fois, l'identification d'un facteur *Foxl2* chez un Mollusque. Sans exclure un rôle dans le déterminisme du sexe femelle, *Cg-Foxl2* pourrait être impliqué dans la vitellogenèse chez les femelles et la maturation gonadique mâle, ainsi que dans la mise en place et le maintien de la première gonade chez l'huître.

*Ces résultats font l'objet d'une publication (Naimi A., Martinez A.-S., Diss B., Mathieu M., Sourdain P. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster Crassostrea gigas.) soumise à Comparative Biochemistry and Physiology et sont illustrés en Annexe.*

**Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas***

**Amine NAIMI<sup>a</sup>, Anne-Sophie MARTINEZ<sup>a</sup>, Blandine DISS<sup>b</sup>, Michel MATHIEU<sup>a</sup>, Pascal SOURDAINE<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup> : UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFR 146 ICORE, IBFA, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen, France.

<sup>b</sup> : SATMAR, Société Atlantique de Mariculture, " La Saline" 50760 Gatteville-Phare, France.

**Correspondance :**

**A.-S. Martinez**

**UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen, France.**

**e-mail : [anne-sophie.martinez@unicaen.fr](mailto:anne-sophie.martinez@unicaen.fr)**

**Tel.: 33 (0)2 31 56 51 64**

**Fax: 33 (0)2 31 56 53 46**

## **Abstract**

A *Foxl2* ortholog has been identified in a Lophotrochozoa, the pacific oyster, which is a successive irregular hermaphrodite Mollusc. Its cDNA has been called *Cg-Foxl2* (*Crassostrea gigas* Foxl2) and the deduced protein sequence is 367aa long. This latter contains the combination of conserved domains, the *Forkhead* box and the C-terminal region, specific to Foxl2 factors. Its gene is devoid of intron at least in the first 926 bp of the cDNA. Real time PCR has shown a gonadic male and female *Cg-Foxl2* expression, increasing during the adult gametogenetic cycle for both sexes, but with a significant increase more precocious in females than in males. In females this increase corresponds to the vitellogenetic stage. During the development, the combined analysis of expression of *Cg-Foxl2*, *Cg-DMI* (a potential factor of the male gonadic differentiation) and *Oyvlg* (a germ cell marker) has led to highlight an interesting temporal window of the gonadic differentiation, between larval metamorphosis and 3 month old spats, especially in spats around 1-1.5 month old. These results may constitute preliminary clues for future work to better understand sex differentiation in the pacific oyster, in particular during the first gonadic establishment.

Keywords: Oyster - *Crassostrea gigas* – *Foxl2* – *Cg-DMI* – gonad - gametogenetic cycle - development - sex determination

## Introduction

Sex determination is the key period preceding sexual differentiation, where a primary signal initiates a molecular cascade of genes coding transcriptional or mRNA splicing factors allowing the final differentiation of the gonads into testis or ovary. Three main systems of sex determinism exist among phyla, a Genetic Sex Determination (GSD), an Environmental Sex Determination (ESD) and a mix of GSD and ESD (Valenzuela et al., 2003). In Mammals, where sexual differentiation has been most studied, the activation of such a cascade involves genes such as *Wt1*, *Sox9*, *Sf1*, *Gata4* and *Dmrt1* in the male (Ferguson-Smith, 2007) and *Foxl2*, *Dax1* and *Wnt4* in the female (Wilhelm, 2007).

*Foxl2* (*Forkhead box l2*) is one of the most conserved genes involved in the early events of the cascade leading to the ovary differentiation, although its role is not well defined, especially in Invertebrates (Cocquet et al., 2002; Ottolenghi et al., 2005). The encoded protein belongs to the Forkhead/winged helix family of transcription factors (Kaestner et al., 2000). The members of this family are characterized by a conserved DNA-binding motif called *Forkhead* box domain and would be involved in the regulation of cell differentiation and proliferation (Lehmann et al., 2003). In many Vertebrates examined to date showing different sex determination systems, such as the mouse (Crisponi et al., 2001; Loffler et al., 2003), the fish Nile tilapia (Wang et al., 2004), the chicken (Govoroun et al., 2004), and the red-eared slider turtle (Loffler et al., 2003), *Foxl2* is expressed in embryonic somatic cells of ovaries and its expression is maintained in adult ovary for most species (Uhlenhaut and Treier, 2006; Wotton et al., 2007). Knock-out mice for *Foxl2* (Ottolenghi et al., 2005) or double knock-out mice for *Foxl2* and *Wnt4* (Ottolenghi et al., 2007) showed respectively partial or complete XX sex reversal with testis like structures. All these results suggest an involvement of *Foxl2* not only in the female gonadal differentiation but also in its maintain during the adult life. This role of *Foxl2* seems also conserved in hermaphrodite species such as the protogynous grouper, where the gene expression is significantly down-regulated during female-to-male sex change (Alam et al., 2008). In Invertebrates, orthologs of *Foxl2* have also been characterized such as *NvFoxL2* in the Cnidarian *Nematostella vectensis* (Magie et al., 2005), *SpFoxl2* in the Echinid urchin *Strongylocentrotus purpuratus* and which is highly expressed during the first 72h of the development (Tu et al., 2006) or *Sd-FoxL2* which shows an ubiquitous expression in the sponge *Suberites domuncula* (Adell and Müller, 2004).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a marine bivalve Mollusc whose development consists of three main periods (embryo, larvae, spats) (Galtsoff, 1964). The establishment of

the gonad during the organogenesis remains unknown. Only one specific marker of the primordial germ cells (PGCs), orthologous to *vasa* and called *Oyvlg*, was characterized in *C. gigas* (Fabioux et al., 2004a). Its expression analysis by *in toto* hybridization suggests a migration of the PGCs to the anterior and the posterior sides of the body around the digestive gland of later stage larvae and first postlarvae stage (Fabioux et al., 2004b). In juvenile oysters, PGCs would differentiate into two groups of germinal stem cells (GSCs) which would proliferate intensively to form the gonadic tubules when the animals reach sexual maturity. The oyster is a successive and irregular protandric hermaphrodite with a diffuse and non permanent gonad evolving according to an annual reproductive cycle subdivided into four main stages (Heude-Berthelin et al., 2001). No differentiable sexual chromosomes have been characterized but a single-locus sex determinism has been suggested (Guo et al., 1998). A potential factor involved in the gonadic development if not in its differentiation has also been characterized for the first time in Lophotrochozoa and called *Cg-DML* (*Crassostrea gigas DMRT-like*). Its expression, studied by Real time PCR and *in situ* hybridization, is observed (i) during the development where it significantly increases in 1.5 months old spats, (ii) in adults of both sexes where it is significantly increased only in male gonads at the end of the gametogenetic cycle (Naimi et al., 2009). Nevertheless, the temporal window, the factors, and the mechanisms involved in the adult sex change and in sex determination during the first gonadic development still remain unclear in *C. gigas*.

The objective of this work was therefore to identify a gene orthologous to *Foxl2* in order to have a marker of the ovarian differentiation in *C. gigas*. In this paper, we report isolating and molecular characterization of *Cg-Foxl2* (*Crassostrea gigas Foxl2*) in the oyster. We also examined the gene expression and discussed the potential role of this factor in the sex determinisms of the oyster, in particular in association with the first establishment of the gonad during the development.

## Materials and methods

### *Experimental animals*

Animals were purchased from a local oyster nursery (SATMAR, Gatteville, France). The developmental stages were obtained by mating adults from two families, one with a sexual imbalance rate in favour of the males (14 and 32% female ratio in 2004 and 2005 respectively) and the other in favour of the females (57% female ratio in 2006). The adult oysters we used in 2005 belong to two families presenting sexual imbalance rates, with female ratios in 2004 and 2005 of 80 and 63% for one and 14 and 32 % for the other, respectively.

### *Reverse transcription, cloning and sequencing*

Reverse transcription was carried out using oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega, Charbonnières, France), 1 µg mRNA and 200 units of M-MLV RT (Promega). cDNAs were used as template for PCR amplification with two degenerated primers designed to anneal to the nucleotidic sequence encoding the conserved *Forkhead* domain of *Foxl2*. The sense primer Foxl2SN5 corresponding to the KNKKGWQN amino acid sequence was 5'-AAGAAYARRA ARGGHTGGCARRAA-3', whereas the antisense primer Foxl2AS3 corresponding to the DMFEKGN amino acid sequence was 5'-AGTTBCCHTTYTCRAACATDTC-3 (where Y is C or T, R is A or G, H is A, C, or T, B is C, G, or T, and D is A, G, or T). PCR was performed in a total volume of 50 µl with 40 ng of male and female gonadic area cDNA in 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, containing 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM of each dNTP, 1 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega). The reaction was cycled 2 min. at 96°C, 5 cycles (10 sec. at 96°C and 3min. at 65°C), 5 cycles (10 sec. at 96°C and 3min. at 60°C), 35 cycles (30 sec. at 96°C, 30 sec. at 50°C and 1min. at 72°C) followed by an extension step at 72 °C for 10 min.

A resulting 106bp fragment was isolated and used to generate full-length cDNA by 5' and 3' RACE using the GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Eragny sur Oise, France) using adaptor and gene specific primers Fox1S (5'-CAGTATTCGCCACAATTTGAGCTTAAA-3'), Fox1SN (5'-AAAGTTCCTCGTGAAGGTGGAGA-3'), Fox1AS (5'-CTCGAATGCCGGGTCCAGG GTCCAGAA-3') and Fox1ASN (5'-TCTCCACCTTCACGAGGAACTTT-3'. A sense primer Cg-FoxL2S5 (5'-CACGGACATTTTCGGTTCTCA-3') and an anti-sense primer Cg-

FoxL2AS3 (5'-TGTCTGTCAGTTCTTGGCGTCT-3') were designed in the 5' and 3' cDNA ends to amplify full-length cDNA and genomic sequences of *Cg-Foxl2* by PCR in a total volume of 50µl during 30 cycles (95°C, 45 sec., 56°C, 45 sec. and 72 °C, 120 sec.), followed by an extension step at 72 °C for 10 min. Resulting fragments were purified and cloned into PCRII-Topo vector using a TA cloning kit (Promega) and sequenced using ABI cycle sequencing chemistry (GENOME express, Meylan, France).

### ***Northern blot analysis***

Total RNA was extracted from male and female gonads of adult oyster using Tri-Reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) following the manufacturer's instructions. Poly(A<sup>+</sup>) RNAs were purified using Dynabeads oligo-dT25 (Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT<sup>™</sup> KIT; Dynal A.S, Oslo, Norway). Around 3 µg of mRNA were run by electrophoresis on a 1% formaldehyde agarose gel and transferred onto a nylon membrane (Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare, Orsay, France). Antisense digoxigenin-11-dUTP labelled *Cg-Foxl2* probe (base 9-1193 of *Cg-Foxl2* cDNA) was transcribed *in vitro* from *Cg-Foxl2* cDNA inserted in PCRII-Topo vector (Promega) using a DIG RNA labelling kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Hybridizations were performed during 16h in 1% blocking reagent (Roche Diagnostics), 50% formamide, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 75 mM sodium citrate pH 7, 100 µg/ml Torula yeast RNA at 55°C. Then, washes and signal analysis were performed following the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). After extensive washing with 2x SSC/0.1%SDS at RT and 0.5xSSC/0.1%SDS at 65°C and blocking in 1.5% blocking reagent for 30 min., detection was performed by 30 min. incubation with an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody diluted 1:5000 in blocking solution, followed by an overnight incubation with 2% NBT/BCIP solution in darkness at RT. All reagents were made following the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics).

### ***Phylogenetic analysis***

A range of Invertebrate and Vertebrate protein sequences encoding Foxl2 homologues were aligned using the CLUSTALW software (Thompson et al., 1994). Phylogenetic analyses were performed by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using the software MEGA version 4 (Tamura et al., 2007).

### **Real time quantitative PCR**

Quantitative RT-PCR analysis was performed using the iCycler apparatus (BioRad, Marnes-La-Coquettes, France). Total RNA was isolated from adult tissues and from developmental stages using Tri-Reagent (Sigma) following the manufacturer's instructions. After DNase I treatment, 1µg of total RNA was reverse transcribed. The iQ<sup>TM</sup> SYBR Green supermix PCR kit (BioRad) was used for real time monitoring of 5ng template cDNA amplification for 40 cycles (15s/95°C, 15s/60°C). Accurate amplification of the target amplicon was assessed by constructing a melting curve. Amplification of cDNA was performed using primers specific to *Cg-Foxl2* (qFoxl2S2 5'-AATATCAGGGATGGGCACAA-3', qFoxl2AS1 5'-GTCCTTGGGTGCAGGA ACTA-3'), to *Cg-DMI* (DMS 5'-CCATGGAGTGGTGTCCGC-3', DMASB 5'-GTTGCCTTTCTGCTATCAGGG-3') (Naimi et al., 2009) and to *Oyvlg* (VS-S9 5'-TCCCCGAGGAGATTCAGA-3', VS-AS9 5'-ACGTCAGTGCAAGCACCA) (Fabioux et al., 2004a). A parallel amplification of the oyster elongation factor 1α (*EF1α*, GenBank accession no. **BQ426516**) reference transcript was performed using qfElongI (5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3') and qrElongI (5'-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3') primers. The relative mRNA levels were normalized to 100 *EF1α* transcripts using the following formula  $N=100 \times 2^{(CtEF1\alpha - CtCg-gene)}$  (Lelong et al., 2007). Statistical analyses were performed using two tailed Mann-Whitney U-test.

### **Histology**

Unshelled spats of 3, 3.5 and 4 months of age were fixed in Davidson's fixative for 48h. Thus, sections were stained with a Prenant-Gabe trichrome according to a classical protocol (Gabe, 1968). The slides were therefore examined and pictures were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope coupled to a Nikon DXM1200-C camera (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France).

## Results

### *Cg-Foxl2 cloning and sequence analysis*

A complete *Cg-Foxl2*-like sequence of 1357 bp (Results not shown) (GenBank accession n° **FJ68956**) shows a 5' untranslated region (UTR) of 31 bp, an open reading frame (ORF) of 1104 bp with the ATG codon at position 32 bp and a TAA stop codon at position 1133 bp, and a 3' untranslated region of 222 bp including a single poly(A) signal (AATAAA) at position 1314 bp, 21 bp upstream of the poly(A) tail. The full length, continuity and sequence of this cDNA were confirmed by new RT-PCR and sequencings. The deduced amino acid sequence (Fig. 1) is 367aa long, contains the *Forkhead* domain consensus sequence (from aa 124 to 224), also known as “winged helix” domain, characteristic of the FOX protein family. However, *Cg-Foxl2* protein is devoid of the polyalanine tract (A), the glycine-rich (G), and the proline (P) repeats. PCR amplification of genomic DNA revealed the absence of intron until 926 bp (Results not shown). Northern blot analysis (Fig. 2) revealed the presence of only one *Cg-Foxl2* mRNA transcript between 1500 and 2000b in both sexes, although its expression was very faint in male gonads. The quality of the mRNA was controlled by the appearance of a band with *Oyvlg* probes (Results not shown).

### *Phylogenetic analysis*

Phylogenetic analysis was performed to investigate the relationship between *Cg-Foxl2* and members of the Fox family. A complete protein sequence alignment of *Cg-Foxl2* and members of the Fox family from both protostomes and deuterostomes (Fig. 1) indicated that *Cg-Foxl2* shared highest amino acid identity rates with the Foxl2 of the human (33%), mouse (31%), zebrafish, tilapia and chicken (40% each), medaka (39%), frog (42%) and xenopus (38%). The alignment also revealed that Foxl2 protein sequence is conserved amongst species, especially in the *Forkhead* domain where putative NLS sequences with basic amino acids have been identified at the C-terminal end (RRRRRMRR), and in the C-terminal region of the sequence. In contrast, the polyalanine tract and glycine and proline repeats are only found in Mammals. The corresponding phylogenetic tree confirmed that *Cg-Foxl2* was clustered with Foxl2 subfamily, with highest identity rates with Foxl2 of zebrafish, tilapia and medaka (89% each), human, mouse and chicken (88% each), and frog and xenopus (both 87%) (Results not shown). The phylogenetic tree generated using the *Forkhead* domain of

oyster, human and mouse *Fox* (Fig. 3) provided evidence that Cg-Foxl2 is grouped with other Foxl2 with high bootstrap support (100). Within the Foxl2 subfamily in both protostomes and deuterostomes (Fig. 4), *Cg-Foxl2* presented an out-group (97 bootstrap support) with Foxl2b of the rainbow trout and Foxl2 of ciona.

### ***Cg-Foxl2 expression in adult tissues***

*Cg-Foxl2* mRNA, measured by real-time quantitative RT-PCR, were detected in all tissues tested (Fig. 5) with significantly higher levels in gonads (mix at various gametogenetic stages; mean  $\pm$  SEM: 0.33 $\pm$ 0.26) and labial palps (mean  $\pm$  SEM: 0.58 $\pm$ 0.42) than in gills (mean  $\pm$  SEM: 0.01 $\pm$ 0.01), mantle (mean  $\pm$  SEM: 0.01 $\pm$ 0.01) adductor muscle (mean  $\pm$  SEM: 0.08 $\pm$ 0.10) and digestive glands (mean  $\pm$  SEM: 0.02 $\pm$ 0.02).

### ***Cg-Foxl2 expression during the development and in the adult gonads***

During the development of the oyster, real RT-PCR experiments (Fig. 6) showed that, after a period of slight non significant increase of expression between 7dpf larvae and 1.5 month old spat, *Cg-Foxl2* mRNA levels were then significantly decreased excepted in the 3.5 months old spats which showed a non significant increase. *Cg-Foxl2* mRNA levels were also expressed in parallel with those of *Cg-DMI* and *Oyvlg* (Fig. 6). Although *Oyvlg* expression was irregular, both factors showed a significant peak of expression around 1-1.5 month compared to 3 month old spats.

The analysis of *Cg-Foxl2* mRNA expression in the gonads of adults at different stages of the gametogenetic cycle (Fig. 7A) revealed a general increase for both sexes. More precisely, mRNA levels were significantly increased in stage II females (mean  $\pm$  SEM: 1.17  $\pm$  0.90) compared to stage II males (mean  $\pm$  SEM: 0.14  $\pm$  0.12) or to more precocious stages (mean  $\pm$  SEM: 0.21  $\pm$  0.14; stage 0 and mean  $\pm$  SEM: 0.48  $\pm$  0.40; stage I). At stage III, this increase continues in females (mean  $\pm$  SEM: 3.50  $\pm$  2.56) which show a level not significantly different from males of the same stage (mean  $\pm$  SEM: 2.25  $\pm$  1.62). *Oyvlg* expression measured in parallel (Fig. 7B) showed, as *Cg-Foxl2*, an increase during the adult gametogenetic cycle for both sexes. This increase is progressive in males and significantly higher in stage II males (mean  $\pm$  SEM: 1.54  $\pm$  1.07) compared to stage II females (mean  $\pm$  SEM: 0.67  $\pm$  0.60) while it is more sudden in females for which it is significant in stage III (mean  $\pm$  SEM: 2.10  $\pm$  1.17).

***Histology of the gonad in spats***

The structure of the gonadic area of spats of 3, 3.5 and 4 months old is illustrated on Figure 8. Collecting ducts can be observed at the periphery of the gonadic area from 3 months of age. At 3 months of age, these ducts are limited on one side by a thin pavementous epithelium, which seems to start to be ciliated at 3.5 months old and replaced by a ciliated prismatic epithelium at 4 months old. On the other side, where the gametogenesis takes place, some somatic and/or germinal cells appear progressively from 3.5 to 4 months old. Whatever the age, no gonadic tubules are seen. In our conditions, the gonadal area of younger spats has not been observed because of the difficulty of processing them due to the fact that they are too small to be unshelled.

## Discussion

We report here the molecular characterization of *Cg-Foxl2*, which is the first cDNA sequence of a forkhead factor identified in the Protostomia Lophotrochozoa phylum. The genomic sequence of *Cg-Foxl2* revealed the absence of intron, at least in the first 926 bp of the gene, like *Foxl2* genes identified in Vertebrates (Cocquet et al., 2002; Govoroun et al., 2004; Nakamoto et al., 2006). Phylogenetic analyses of Cg-FoxL2 with members of the Fox family from both protostomes and deuterostomes provided evidence that Cg-Foxl2 is grouped with the Foxl2 subfamily with high bootstrap support (100). The deduced amino acid sequence presents a high conserved *Forkhead* domain characteristic of the Fox protein family (Weigel et Jackle, 1990; Katoh and Katoh, 2004) and a conserved C-terminal region, as observed for Foxl2 in other species studied (Cocquet et al., 2003; Govoroun et al., 2004; Nakamoto et al., 2006). Putative NLS sequences characterized by the presence of basic amino acids have also been identified in Cg-Foxl2 at the C-terminal end of the *Forkhead* box such as in other Fox factors (Carlsson and Mahlapuu, 2002). However, this factor, as Foxl2 in Invertebrates and non mammalian Vertebrates, contained neither a polyalanine tract (A) nor glycine (G) or proline (P) repeats, which are only found in Mammals (Cocquet et al., 2003; Wang et al., 2004; Liu et al., 2007). When the phylogenetic analysis was restricted to the Foxl2 subfamily of protostomes and deuterostomes, Cg-Foxl2 appeared as an out-group (97 bootstrap support) with Foxl2b of the rainbow trout and Foxl2 of Invertebrates such as the Urochordata ciona, which is in agreement with the general phylogenetic classification. Because Teleosts have highly derived genomes due to a relatively recent lineage specific polyploidisation (Wittbrodt et al., 1998; Steinke et al., 2006), at least two *Foxl2* paralogs, *Foxl2a* and *Foxl2b*, have been characterized so far (Baron et al., 2004). According to our phylogenetic analysis, *Foxl2b* could be the ancestral form. In the oyster, a single transcript of *Cg-Foxl2* was detected by northern blot in the gonads of both sexes.

Real time PCR analysis of the *Cg-Foxl2* mRNA showed that its expression is significantly higher in gonads and labial palps than in other tissues. This gonadal expression is in agreement with a role in the differentiation of the gonad in the oyster as it has been shown in several Vertebrates (Cocquet et al., 2002 and 2003), although Foxl2 is also expressed in other tissues such as the eyelids and the brain and/or the pituitary (Govoroun et al., 2004; Wang et al., 2004; Nakamoto et al., 2006; Alam et al., 2008; Oshima et al., 2008) according to species. In the oyster, high levels of expression of *Cg-Foxl2* in the labial palps,

an organ rich in storage cells (Heude-Berthelin et al., 2000), are not inconsistent if we consider, as Vandeputte et al (2007) in the sea-bass, that some of the genes acting on sex determination and growth are the same, or at least are strongly linked.

The analysis of the *Cg-Foxl2* mRNA expression along an adult gametogenetic cycle in *C. gigas* showed an increase in agreement with the seasonal development of the gonad. Indeed, in adults, the gonad is a non permanent diffuse organ made of a branched gonadal tubules invaginated in a storage tissue, the whole constituting the gonadic area (Franco et al., 2008), evolving according to an annual reproductive cycle. The gametogenesis is initiated each year from clusters of germ cells scattered in the storage tissue (stage 0). Then these germ cells proliferate (stage I), differentiate and mature (stages II and III) in the gonadal tubules as these latter grow, ramify and spread in the storage tissue which inversely regress (Heude-Berthelin et al., 2001; Fabioux et al., 2004a). Moreover, intrinsic characteristics of the oyster gametogenesis lead to difference between males and females and between stage II and III, illustrated by an increase of the number of germ cells during spermatogenesis and the increase of the oocyte volume during the folliculogenesis (Lango-Reynoso et al., 2000; Li et al., 2000; Heude-berthelin et al., 2001; Franco et al., 2008). This is indirectly illustrated by the expression of *Oyvlg*, a germ cell specific marker, which increased linearly during spermatogenesis and abruptly at stage III in females, reflecting, in the latter, the maternal mRNA storage process during the oocyte vitellogenesis (Li et al., 2000). In contrast, the increase of *Cg-Foxl2* expression is linear in both sexes, although it starts to be significant in female, at stage II, a time of the gametogenetic cycle corresponding to the start of the vitellogenesis. These results suggest a role of *Cg-Foxl2* in the vitellogenesis in the oyster which is in agreement with the role of *Foxl2* in the folliculogenesis hypothesized in adults of many species, amongst Mammals (Crisponi et al., 2001; Cocquet et al., 2003), birds (Loffler et al., 2003; Govoroun et al., 2004) and fish such as the Nile tilapia and the medaka (Wang et al., 2004; Nakamoto et al., 2006). Moreover, the role of *Foxl2* associated, in most species, to a follicular somatic cell expression (Crisponi et al., 2001; Govoroun et al., 2004; Nakamoto et al., 2006; Uhlenhaut and Treier, 2006) may also suggest such an expression for *Cg-Foxl2* in the oyster. At last, a dimorphic gonadal expression of *Cg-Foxl2* was observed at stage II, where meiosis and early vitellogenesis take place respectively in males and females, but not at stage III, corresponding to ripe gonads. The expression increase observed in males at stage III is in disagreement with the results observed in other species including hermaphrodites, where *Foxl2* expression is about two to hundred fold higher in adult ovaries than in adult testes

(Govoroun et al., 2004; Alam et al. 2008; Oshima et al., 2008). This may indicate a new function of Foxl2 in the male gonadal maturation of the oyster.

The establishment of the gonad during the development of the oyster remains unknown; however, the analysis of the *Oyvlg* mRNA expression by Fabioux et al. (2004b) has allowed to precise the development and the location of primordial germ cells (PGC) during the development of the oyster. From the veliger larvae stage, PGC migrate to two areas on both sides of the dorso-ventral axis which will correspond to the future gonad localization around the digestive gland in late larvae stages. After metamorphosis, PGC start to differentiate into two groups of germinal stem cells which would later proliferate intensively to form the gonadic tubules when juveniles reach sexual maturity (Fabioux et al., 2004b). *Oyvlg* mRNA is of maternal origin and its content gradually decreases during the early development until the last stage analysed, the trocophorae stage (18hpf) (Fabioux et al. 2004b), probably reflecting the decrease of the relative proportion of germ cells precursors to total number of cells. In our study, *Oyvlg* mRNA levels started to significantly increase after metamorphosis, reaching a peak in 1-1.5 month old spats and then decreasing in older spats (3 to 4 months old), reflecting again the decrease of relative number of germ cells per total number of cells. A *Cg-DMI* mRNA level increase was observed concomitantly to the one of *Oyvlg* and the kinetic of expression of both appears in agreement with the establishment, in the pericardic region, of the two primary gonads symmetrically to the digestive gland (Fabioux et al. 2004b). In contrast with the *Oyvlg* and *Cg-DMI* mRNAs profiles, *Cg-Foxl2* mRNA relative levels slowly increased from 7 dpf larvae to 1.5 month old spat and then decreased till 3-3.5 month old spats, a stage where our histological observations showed the presence of distinguishable gonadal collecting ducts and an apparent gametogenesis initiation. From these results and due to the impossibility in the oyster to differentiate sexes before a advanced stage of gametogenesis, it is difficult to specify if *Cg-FoxL2* is an early female sex differentiation marker as proposed in Vertebrates (Loffler et al., 2003; Govoroun et al., 2004; Wang et al., 2004; Nakamoto et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). Nevertheless, because the oyster is generally male the first year of its life, we could conceive that such a candidate ovary-determining gene is under-expressed in a pool of spats developing in a majority of males.

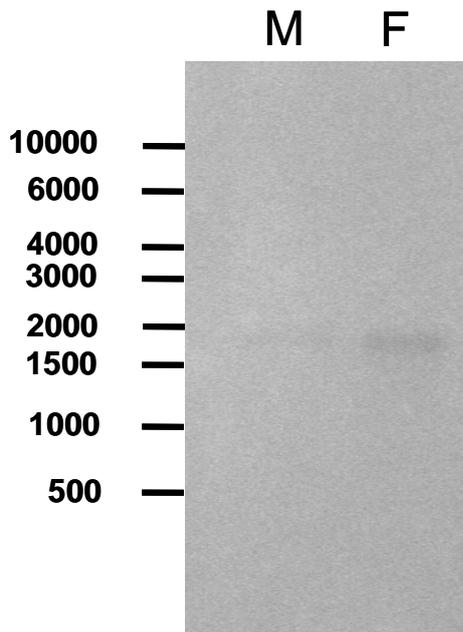
To evidence a sexual dimorphic gene expression in the oyster, especially during the development, it would be necessary to work on monosexual populations which are actually unavailable in the oyster. However, by specifying the window of the sexual determinism, biotic or abiotic factors could be applied at this time to orientate the gonadal differentiation.

## **Acknowledgements**

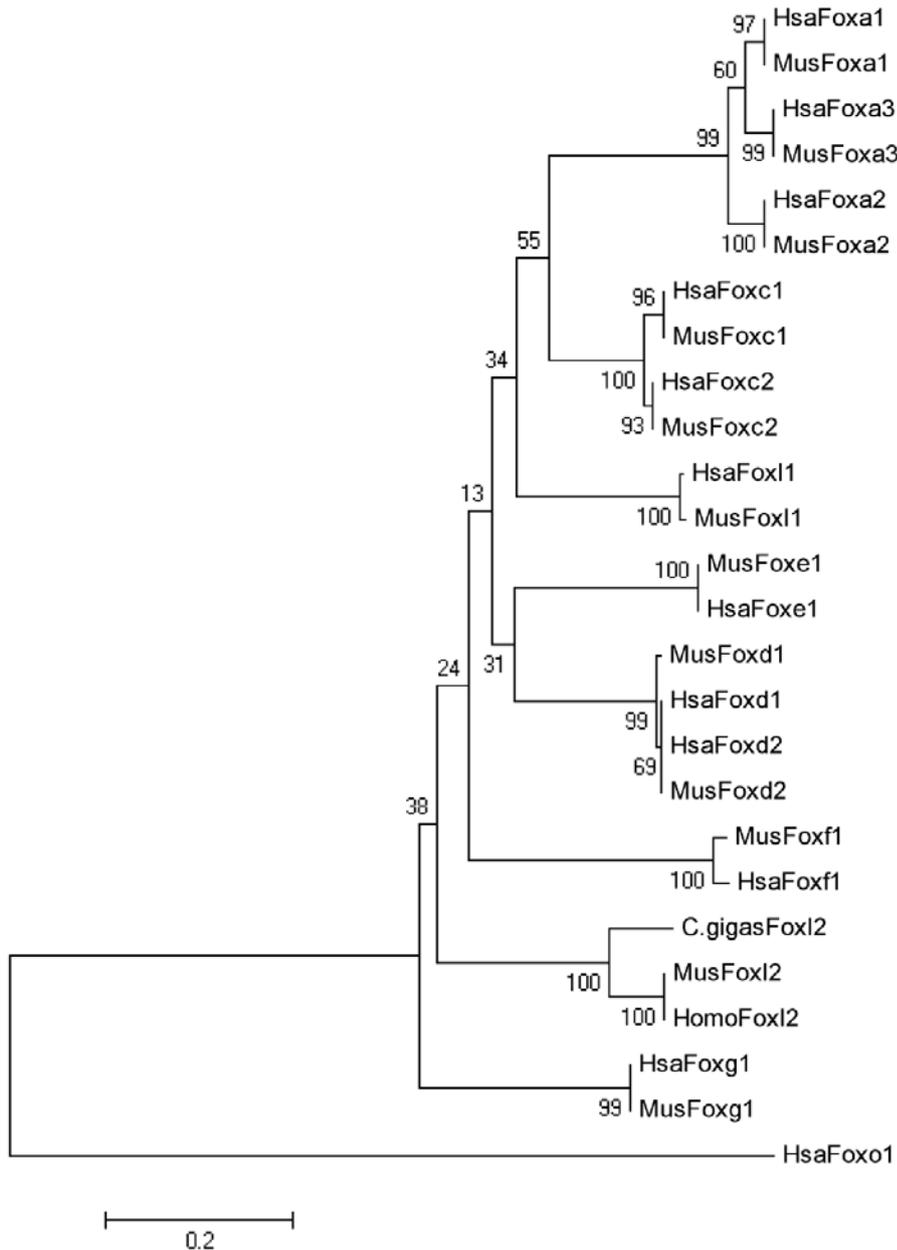
This research is supported by *Conseil Régional de Basse-Normandie* (CRAB) and by DRAM/IFOP funds. The authors are grateful to Christophe Lelong for helpful discussions, to Béatrice Adeline for technical assistance, to the SATMAR staff and to Christophe Joubel for the english proofreading. Amine Naimi is supported by a *Conseil Régional de Basse-Normandie-SATMAR* grant.

**Figure 1: Alignment of amino acid sequences of oyster Cg-Foxl2 with Foxl2 proteins of some Vertebrates.** Identical amino acids are indicated by asterisks. Amino acids with conserved similarities are indicated by dots or colons. The solid bar indicates the *Forkhead* domain. The putative NLS sequence is double aligned. The polyalanine tract (A), glycine rich repeats (G), and proline repeats of Mammals are boxed. Alignments were generated using CLUSTALW. The numbers of the amino acid residues are indicated. (GenBank accession no. medaka (*Oryzias latipes*: AB252055), tilapia (*Oreochromis niloticus*: AY554172), zebrafish (*Danio rerio*: BC116585), xenopus (*Xenopus laevis*: AB372218), frog (*Rana rugosa*: AB372103), mouse (*Mus musculus*: AF522275), human (*Homo sapiens*: AF301906), chicken (*Gallus gallus*: AY487165), oyster (*Crassostrea gigas*: FJ68956).

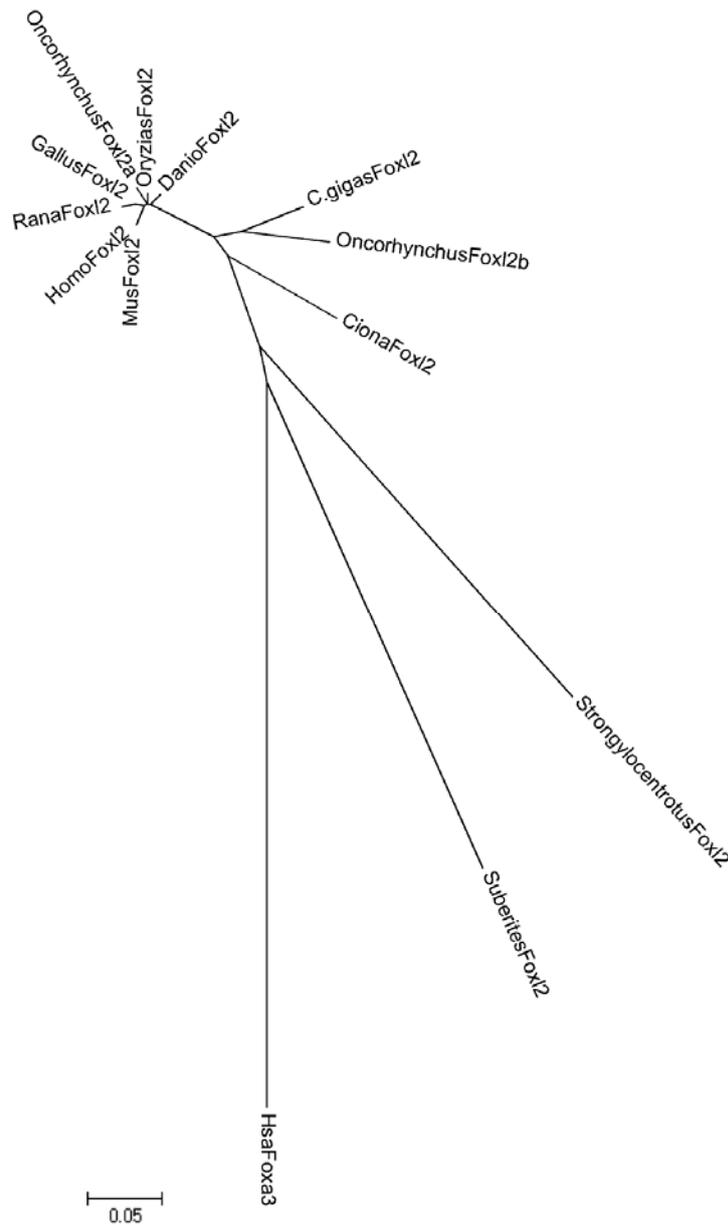




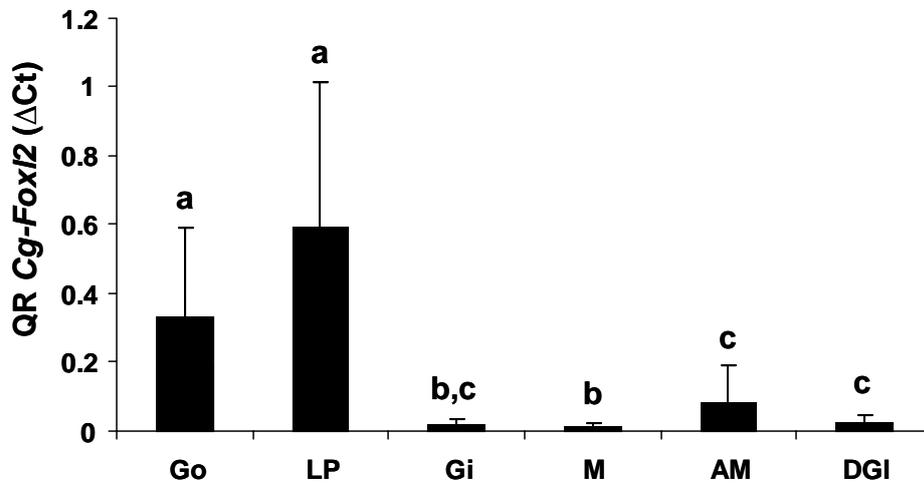
**Figure 2: Northern blot analysis of *Cg-Foxl2* mRNA in male (M) and female (F) gonads of adults of *C. gigas* showing the presence of only one *Cg-Foxl2* mRNA transcript between 1500 and 2000b in both sexes. Three point eight  $\mu\text{g}$  of male gonads and 2.9 $\mu\text{g}$  of female gonads were spotted. *Oyvlg* was taken as a control of gonads mRNA quality (Results not shown).**



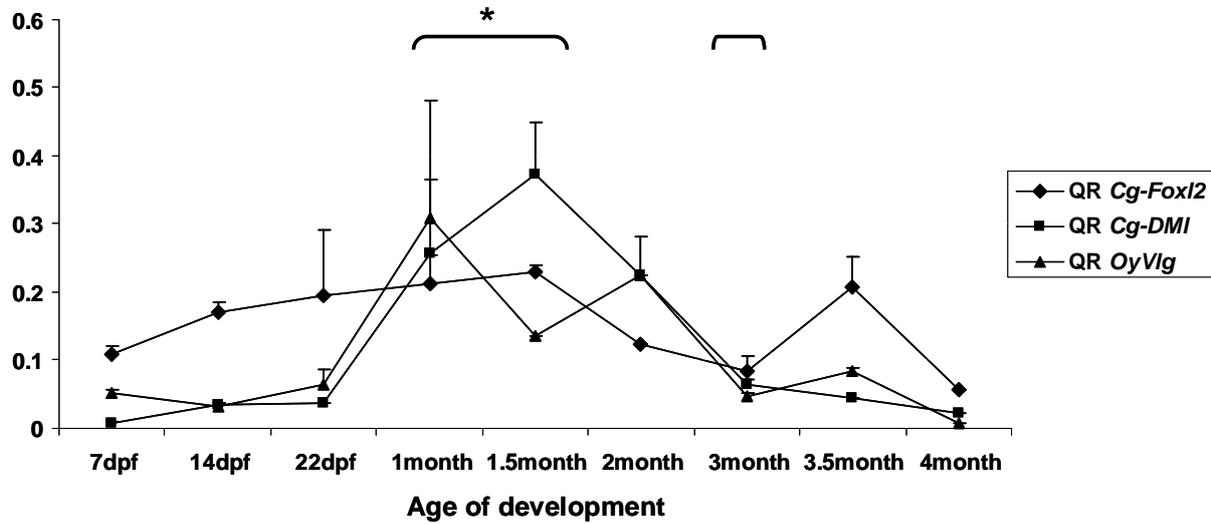
**Figure 3: Phylogenetic tree of the Fox proteins showing that *Cg-Foxl2* is clustered together with *Foxl2*.** Phylogenetic analysis was performed by Neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using *MEGA4* software (Tamura et al., 2007). Numbers in the branches represent the bootstrap values (%) from 100 replicates (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerandl and Pauling, 1965) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. (GenBank accession no. [BC033890](#), [BC096524](#), [EU275778](#), [BC037083](#), [EU402966](#), [NM 010446](#), [BC052011](#), [NM 001453](#), [BC113437](#), [NM 013519](#), [AF315075](#), [NM 008024](#), [NM 183298](#), [NM 004473](#), [NM 008242](#), [NM 004472](#), [NM 004474](#), [NM 008593](#), [NM 010426](#), [NM 001451](#), [FJ68956](#), [AF522275](#), [AF301906](#), [NM 005249](#), [NM 008241](#), [NM 002015](#)).



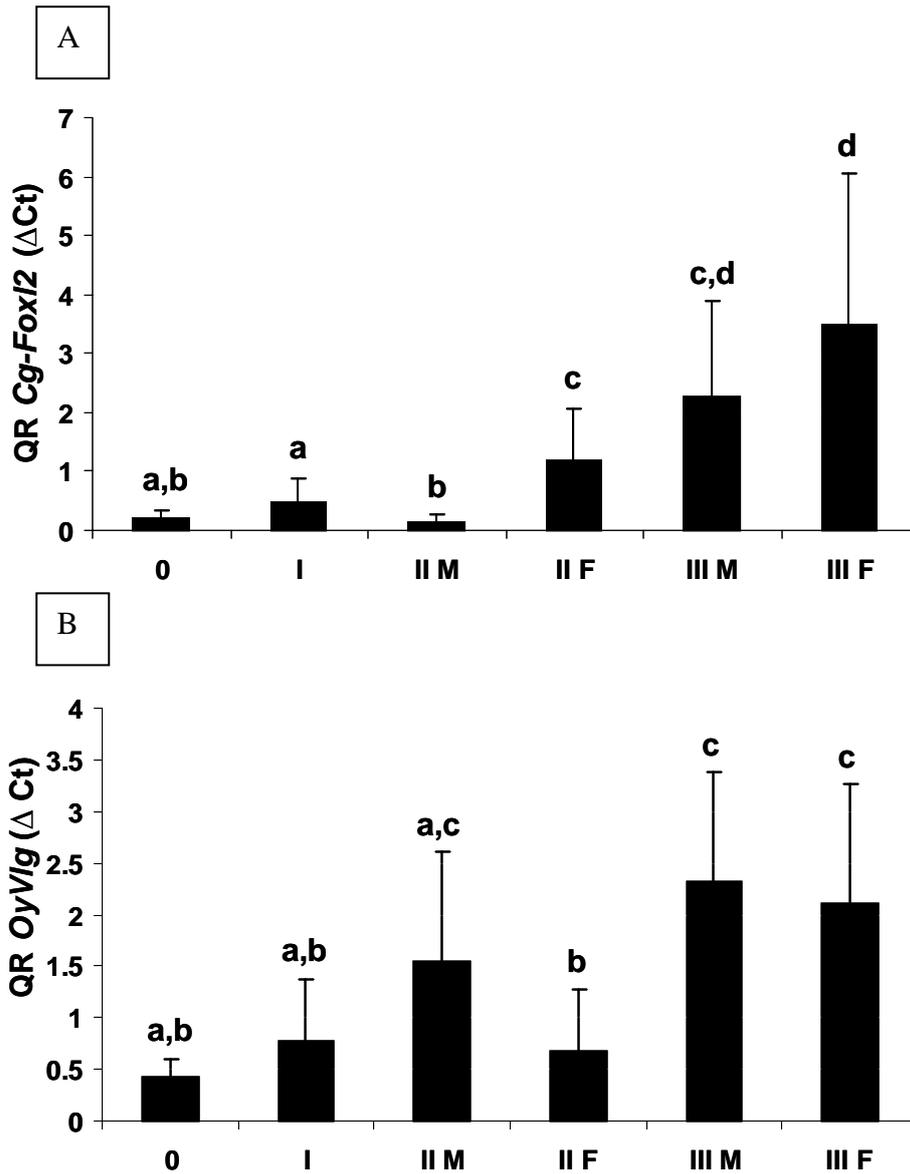
**Figure 4: Phylogenetic tree of the Foxl2 proteins showing that Cg-Foxl2 presents an out group with the trout Foxl2b and ciona Foxl2.** Human Foxa3 was used as an out group. Phylogenetic analysis was performed by Neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using *MEGA4* software (Tamura et al., 2007). The bootstrap consensus tree inferred from 100 replicates (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerkanndl and Pauling, 1965) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. (GenBank accession n° **FJ68956**).



**Figure 5: Real-time RT-PCR *Cg-Foxl2* transcripts quantification relative to *EF1α* in different tissues of *C. gigas*.** Total RNA were isolated from male and female gonads at various stages (Go), labial palps (LP), gills (Gi), mantle (M), adductor muscle (AM) and digestive glands (DGI). QR: Relative Quantity, arbitrary units. Values are mean±SEM of triplicates. Different letters (a-c) indicate significant differences (P<0.05) between tissues. This graph shows mRNA levels significantly higher in gonads and labial palps compared to other tissues. .Number of animals (n=10).

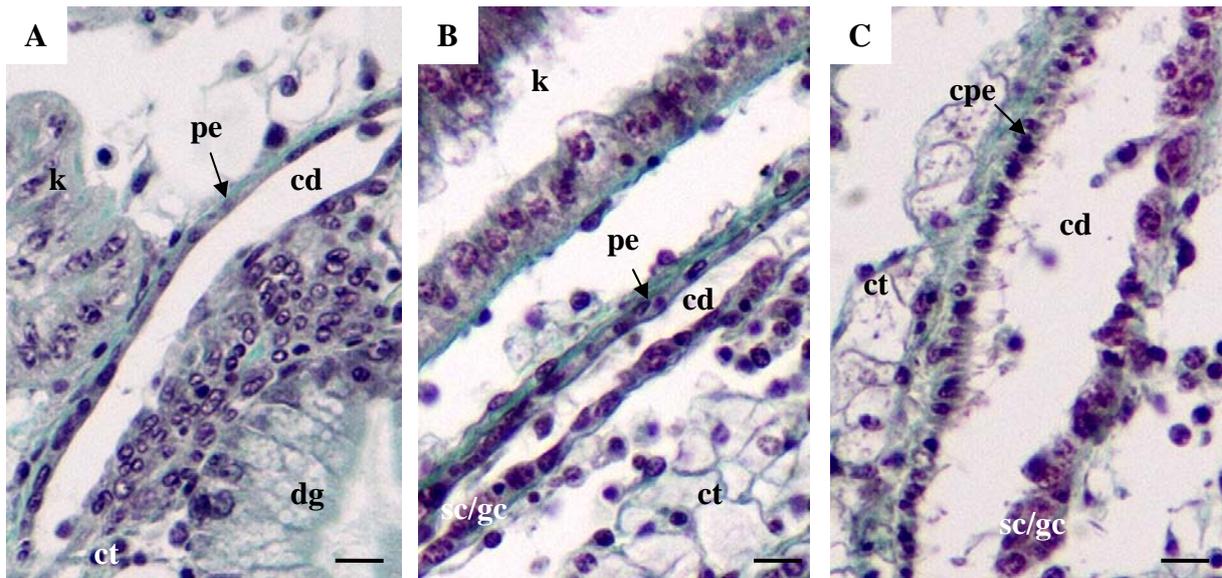


**Figure 6: Real time RT-PCR transcripts quantification relative to EF1 $\alpha$  in developmental stages of *C. gigas* with *Cg-Foxl2*, *Cg-DMI* and *Oyvlg* primers.** Total RNAs were isolated from veliger larvae of 7 and 14 days post-fertilization (7 and 14 dpf), post-metamorphosis larvae (22 dpf) and 1 to 4 month old spat (1, 1.5, 2, 3, 3.5 and 4 months). QR: Relative Quantity, arbitrary units. Values are mean $\pm$ SEM of triplicates. This graph shows *Cg-DMI* and *Oyvlg* mRNA levels significantly increased (\*:  $P < 0.05$ ) in spats between 1-1.5 and 3 months of age while *Cg-Foxl2* transcript levels were significantly decreased from 1-1.5 to 3 month old.



**Figure 7: (A) Real time RT-PCR *Cg-Foxl2* transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle. This graph shows mRNA levels increasing in both sexes during the gametogenetic cycle, with a significant drop from stage II in females and stage III in males. (B) Real time RT-PCR *Oyvlg* transcripts quantification relative to *EF1α* in the gonads of adults of *C. gigas* during the gametogenetic cycle.**

Stage 0: undifferentiated gonad (n=5); Stage I: gonia mitosis and sex indiscernible (n=19); Stage II: active spermatogenesis (IIM, n=18) and growing oocytes (IIF, n=36); Stage III: male (IIIM, n=7) and female (IIIF, n=6) mature stage. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Different letters (a-d) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between tissues. This graph shows *Oyvlg* mRNA expression increasing during the adult gametogenetic cycle for both sexes but with significant differences between sexes at stage II.



**Figure 8: Histological sections of the gonadic area of spats of 3 months (A), 3.5 months (B) and 4 months old (C) stained with a Prenant-Gabe trichrome. Collecting ducts can be observed in spats from 3 months old at the periphery of the gonadic area. They are limited on one side by a thin pavementous epithelium at 3 and 3.5 months old (A and B) and by a ciliated prismatic epithelium at 4 months old (C). On the other side, where the gametogenesis takes place, some undistinguishable somatic and germinal cells appear progressively from 3.5 to 4 months old (B and C). cd: collecting duct; cpe: ciliated prismatic epithelium; ct: connective tissue; dg: digestive gland; k: kidney; pe: pavementous epithelium; sc/gc: somatic and germinal cells. Bars: 10  $\mu$ m.**

## References

- Adell, T., Muller, W.E.G., 2004. Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene* 334, 35-46.
- Alam, M.A., Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Hirai, T., Nakamura, M., 2008. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 75-85.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., Veitia, R.A., 2004. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 705-715
- Carlsson, P., Mahlapuu, M., 2002. Forkhead transcription factors: Key players in development and metabolism. *Development Biology* 250, 1-23.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M., Veitia, R.A., 2002. Evolution and expression of Foxl2. *J. Mol. Evol.* 55, 916-921.
- Cocquet, J., De Baere, E., Gareil, M., Pannetier, M., Xia, X., Fellous, M., Veitia, R.A., 2003. Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 206-211.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M.S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A., Pilia, G., 2001. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* 27 (2), 132-134.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004a. 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., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004b. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592-598.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Ferguson-Smith, M., 2007. The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1. *Sex. Dev.* 1 (1), 2-11.

- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaine, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40, 251-269.
- Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie eds., Paris VIème, France.
- Galtsoff, P.S., 1964. The american oyster *Crassostrea virginica* (G.). *Fish. Bull. U.S.* 64, 1-480.
- Govoroun, M.S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J-P., Couty, I., Batellier, F., Cotinot, C., 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* 231, 859-870.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K.Jr., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52, 394-402.
- Heude-Berthelin, C., Kellner, K, Mathieu, M., 2000. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2, 136-145.
- Heude-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). *Invert. Reprod. Dev.* 40, 79-86.
- Kaestner, K.H., Knökel, W., Martinez, D.E., 2000. Unified nomenclature for the Winged Helix/Forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14, 142-146.
- Katoh, M., Katoh, M., 2004. Human *Fox* gene family. *Int. J. Oncol.* 25, 1495-1500.
- Lango-Reynoso F., Chavez-Villalba J., Cochard J.C. and Le Pennec M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lehmann, O.J., Sowden, J.C., Carlsson, P., Jordan, T., Bhattacharya, S.S., 2003. Fox's in development and disease. *Trends Genet.* 19, 339-344.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quéré, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Cg-TGF- $\beta$ , a TGF- $\beta$ /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp.Immun.* 31, 30-38.
- Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.*, 66, 502-508.

- Liu, J., Liu, S., Tao, M., Li, W., Liu, Y., 2007. Isolation and expression analysis of testicular type Sox9b in allotetraploid fish. *Mar. biotechnol.* 9 (3), 329-34.
- Loffler, K.A., Zarkower, D., Koopman, P., 2003. Etiology of Ovarian Failure in Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Inversus Syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinol.* 144, 3237-3243.
- Magie, C.R., Pang, K., Martindale, M.Q., 2005. Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 215 (12), 618-30.
- Naimi, A., Martinez, A.S., Specq, M.L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., Sourdaine, P., 2009. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol., A.* 152, 189-196.
- Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D.E., Nagahama, Y., Shibata, N., 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Commun.* 344, 353-361.
- Oshima, Y., Uno, Y., Matsuda, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., 2008. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159 (2-3), 170-177.
- Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J.E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G., Schlessinger, D., 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 14 (14), 2053-62.
- Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger D., 2007. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 16 (23), 2795-804.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Steinke, D., Hoegg, S., Brinkmann, H., Meyer, A., 2006. Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC Biology* 4, 16.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4637-4680.

- Tu, Q., Brown, C.T., Davidson, E.H., Oliveri, P., 2006. Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. *Dev. Biol.* 300 (1), 49-62.
- Uhlenhaut, N.H., Treier, M., 2006. *Foxl2* function in ovarian development. *Mol. Genet. Metab.* 88, 225-234.
- Valenzuela, N., Adams, D.C., Janzen, F.J., 2003. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *Am. Nat.* 161 (4), 676-83.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Chatain, B., 2007. A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* 176, 1049-1057.
- Wang, D., Kobayashi, T., Zhou, L., Nagahama, Y., 2004. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 83-89.
- Weigel, D., Jackle, H., 1990. The fork head domain: A novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell.* 63, 455-456.
- Wilhelm, D., 2007. R-spondin1--discovery of the long-missing, mammalian female-determining gene? *BioEssays* 29, 314-318.
- Wittbrodt, J., Meyer, A., Schartl, M., 1998. More genes in fish? *Bioessays.* 20, 511-515.
- Wotton, K.R., French, K.E.M., Shimeld, S.M., 2007. The developmental expression of *foxl2* in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Gene Expr. Patterns.* 7 (7), 793-797.
- Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., Kitano, T., 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and *Foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 935-940.
- Zuckerlandl, E., Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8 (2), 357-366.

# Annexes Chapitre II

## . Annexe 1 : Séquence nucléotidique et traduction de l'ADNc codant Cg-Foxl2

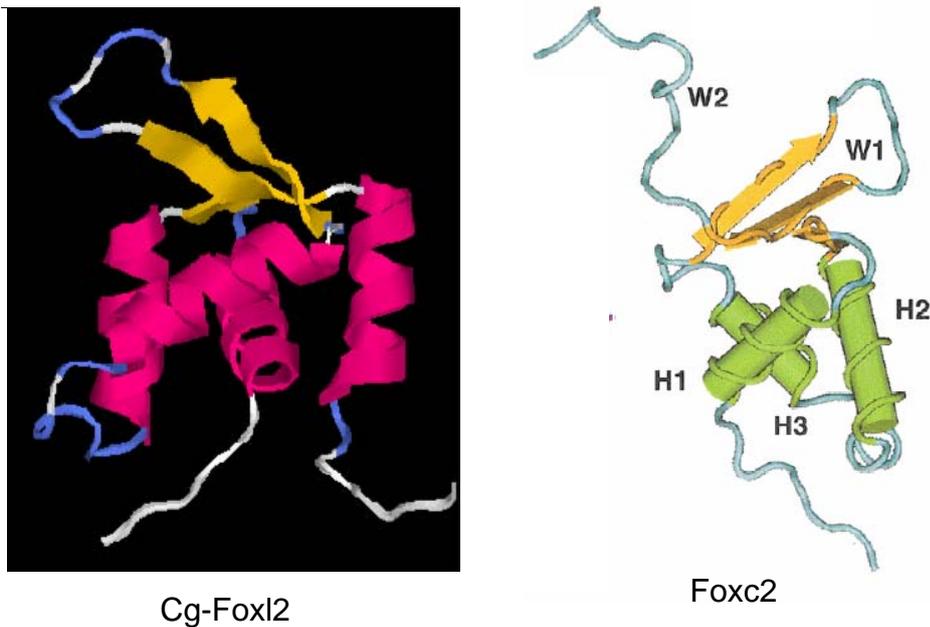
	M S E N K N E N V S N S V S D E N F	18
at	tttagccacggacattttcggttctcaaa ATG TCG GAG AAC AAA AAC GAA AAT GTG TCC AAT TCA GTA TCT GAT GAA AAT TTT	85
Y D F K M R L M R P S S K F L E S G F S E S S F E N		44
TAT GAC TTT AAA ATG CGA TTA ATG CGA CCG TCT TCA AAG TTT TTG GAA TCT GGA TTT AGT GAA AGT AGT TTT GAA AAC		163
K I W K H S F L S G E F S S N C K Y G S K V S F G I		70
AAA ATA TGG AAG CAC TCT TTT TTG TCT GGC GAA TTT TCT TCT AAT TGT AAA TAT GGA TCA AAA GTT TCG TTT GGA ATT		241
A A R L E N P S N S K P A E N K E E E F V E T K K I		96
GCA GCA AGA CTC GAG AAT CCT TCA AAC AGC AAA CCA GCG GAA AAC AAA GAA GAA GAA TTT GTA GAG ACG AAG AAA ATC		319
K S E K L E E K S K S S A G N V K I E N E N K Y T D		122
AAA TCG GAA AAA TTG GAA GAA AAA TCG AAG TCC TCT GCC GGA AAT GTG AAA ATT GAA AAT GAG AAC AAA TAT ACA GAT		397
P E Q K P P F S Y V A L I A M A I K E S S E K R L T		148
CCT GAG CAG AAA CCT CCT TTT TCT TAC GTA GCT TTG ATC GCC ATG GCG ATC AAA GAA TCG AGT GAA AAA CGC CTA ACG		475
L S G I Y Q F I I N K F P Y Y E K N K K G W Q N S I		174
CTT AGT GGA ATA TAC CAA TTT ATT ATC AAC AAA TTT CCG TAT TAC GAA AAA AAT AAG AAA GGT TGG CAG AAC AGT ATT		553
R H N L S L N E C F V K V P R E G G E E R K G N F W		200
CGC CAC AAT TTG AGC TTA AAT GAA TGC TTT GTA AAA GTT CCT CGT GAA GGT GGA GAG GAG AGA AAG GGA AAT TTC TGG		631
T L D P A F E D M F E K G N Y R R R R R M R R P Y R		226
ACC CTG GAC CCG GCA TTC GAG GAC ATG TTT GAA AAA GGA AAT TAT CCG CGT CGC CGT AGA ATG AGG CGC CCA TAC CCG		709
A S L S L P K P L F A P D S H C G P Y N Q F S L S K		252
GCG TCC CTT TCT CTG CCC AAG CCT TTG TTT GCC CCT GAC AGC CAC TGT GGA CCA TAC AAT CAG TTC TCC CTC TCC AAA		787
P Y F S P P P Y S Q Y S Q Y Q G W A Q A L A H N S S		278
CGG TAT TTC TCT CCC CCT CCT TAT TCT CAG TAT TCT CAA TAT CAG GGA TGG GCA CAA GCT TTG GCA CAC AAT TCG TCG		865
Q A G M A S A M N Q I G N Y S S C T Q G R V P P G		304
CAA GCA GGG ATG GCC AGT GCT ATG AAC CAA ATC GGC AAC TAT AGT TCC TGC ACC CAA GGA CCG GTC CCT CCA CCG GGC		943
A S I T Q C G Y N A M Q Q A M Q I S P P H A P S Y T		330
GCC TCT ATC ACA CAG TGT GGT TAC AAC GCA ATG CAG CAG GCC ATG CAG ATA TCC CCA CCC CAT GCC CCA TCA TAC ACC		1021
Q L N D Y P A V P T P G T G F P F A Y R Q Q G D T L		356
CAG CTT AAC GAC TAT CCG GCG GTC CCC ACC CCC GGG ACG GGC TTC CCC TTC GCC TAC AGA CAA CAG GGT GAC ACG CTA		1099
N H M H Y S Y W T D R *		368
AAT CAC ATG CAT TAC TCG TAC TGG ACT GAC AGG TAA ctgtcagagaagatgtggaagaacattgaattatttgagacgccaagaactgacag		1190
acatatttataaaatgaagctaataattgtaccattgttgggcaatatttatttcatatgactagttgtacaaaatatacatcaaaatatttaatttgcc		1294
agtgaacatatttcatgatataaaattattgtaatcagcctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa		1357

Figure 38 : Séquences nucléotidique et protéique de Cg-Foxl2.

En minuscule, les régions 5' et 3' non traduites. Le domaine *Forkhead* est souligné. La séquence consensus du signal de polyadénylation est encadrée.

## . Annexe 2 : Prédiction de la conformation protéique en 3D de Cg-Foxl2

Une prédiction de la structures tridimensionnelle du domaine *Forkhead* de Cg-Foxl2 a été réalisée par modélisation informatique avec le logiciel *I-Tasser* (Wu *et al.*, 2007 ; Zhang, 2007 ; Zhang, 2008) (Figure 38). D'après les scores d'homologie, le domaine *Forkhead* de Cg-Foxl2 est très proche structurellement des facteurs Fox dont le facteur Foxc2 défini à partir des données en RMN (Van Dongen *et al.*, 2000). Cg-Foxl2 montre un motif hélice-boucle-hélice avec trois hélices H1, H2 et H3 et trois brins  $\beta$  antiparallèle ainsi qu'une hélice C-terminale supplémentaire. Une telle structure tridimensionnelle a déjà été décrite en cristallographie et en RMN chez les différents facteurs Fox (Gajiwala et Burley, 2000; Carlsson et Mahlapuu, 2002). Ainsi, outre la conservation de séquence en acides aminés du domaine *Forkhead* et sa parenté phylogénétique avec les facteurs Foxl2, il montre la même structure tridimensionnelle supposant une conservation de fonction des facteurs Fox au cours de l'évolution.



**Figure 39 : Structure tridimensionnelle du domaine *Forkhead* de Cg-Foxl2 et Foxc2.**

La structure 3D de Cg-Foxl2 est réalisée avec le logiciel *I-Tasser* (Wu *et al.*, 2007 ; Zhang, 2007 ; Zhang, 2008). Elle met en évidence un motif hélice-boucle-hélice avec trois hélices (en rose) et trois brins  $\beta$  antiparallèle (en jaune), comme observé pour le facteur Foxc2 défini à partir de données en RMN (Van Dongen *et al.*, 2000). H1, H2 et H3 : hélices (en vert) ; W1 et W2 : boucles W1 et W2 ; brins  $\beta$  antiparallèle (en orange).

Le déterminisme sexuel constitue une étape clé de la différenciation de la gonade et est essentiel à l'évolution des génomes par la mise en place de la reproduction sexuée. Pourtant, lorsque nous avons initié cette étude, aucun travail n'avait encore concerné ce thème chez les Lophotrocozoaires, en général et les Mollusques Bivalves en particulier, groupe phylogénétique auquel appartient l'huître *Crassostrea gigas*, espèce hermaphrodite. Sur un plan plus appliqué, l'absence de connaissance des mécanismes qui contrôlent la première différenciation gonadique et les réversions sexuelles adultes chez cette espèce constituent un handicap pour les écloseurs soucieux de gérer leurs stocks de géniteurs.

L'objectif de ce projet de thèse a donc été de caractériser des facteurs moléculaires potentiels du déterminisme sexuel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, modèle d'intérêt phylogénétique et socio-économique et dont le génome est en cours de séquençage. Ainsi, *Cg-DMI* et *Cg-Foxl2*, ont été identifiés chez l'huître par RT-PCR à l'aide d'amorces dégénérées déduites des domaines caractéristiques de leurs familles respectives et conservés chez différents organismes deutérostomiens et protostomiens ecdysozoaires. *Cg-DMI*, facteur de transcription de la famille *Dmrt1*, est l'orthologue des facteurs *DSX* et *MAB-3* impliqués, respectivement, dans la différenciation gonadique mâle de la drosophile *D. melanogaster* (Erdman et Burtis, 1993) et du nématode *C. elegans* (Shen et Hodgkin, 1988). *Cg-Foxl2* est un orthologue du facteur de transcription de la sous-classe *Foxl2*, marqueur le plus précoce de la différenciation ovarienne identifié chez les Mammifères (Nakamoto *et al.*, 2006).

Le gène *Cg-Foxl2* identifié dans cette étude est le premier facteur de la sous famille *Foxl2* à être caractérisé chez un Mollusque et serait le premier facteur potentiel du déterminisme sexuel chez l'huître. Le gène *Cg-DMI* est parmi les premiers gènes de la famille à domaine DM à avoir été caractérisés chez les Mollusques. En effet, depuis la rédaction et la publication de l'article Naimi *et al.* (2009), seule une étude de Klinbunga *et al.* (2008) a mis en évidence la caractérisation d'un facteur *Dmrt1* exprimé spécifiquement dans le testicule chez l'ormeau *Haliotis asinina*. La caractérisation de *Cg-DMI* chez l'huître ouvre des perspectives de recherche intéressantes pour la phylogénie comparée de la reproduction, ceci pour deux raisons. Premièrement, *Cg-DMI* pourrait être l'unique représentant de la famille des facteurs à domaine DM chez *C. gigas*. Si son caractère unique était confirmé chez l'huître, cela renforcerait l'intérêt phylogénétique de cette espèce, en contrastant ainsi avec d'autres Métazoaires qui possèdent plusieurs facteurs à domaine DM, comme l'homme, les poissons ou le nématode (Volf *et al.*, 2003). Deuxièmement, *Cg-DMI* serait plus apparenté

aux facteurs Dmrt4 et Dmrt5 qu'à Dmrt1 et présenterait, comme ces derniers, une expression ubiquiste dans des tissus potentiellement en prolifération/différenciation. Ces résultats laissent supposer que Cg-DMI, comme Dmrt4 et Dmrt5, aurait peu évolué à partir d'un ancêtre commun pluri-fonctionnel, par opposition à Dmrt1 qui aurait acquis, au cours de l'évolution, une plus grande spécificité (Volf *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2007).

Ce travail de thèse a également permis, pour la première fois, l'étude de l'expression de deux facteurs potentiels de la différenciation gonadique au cours du cycle gamétogénétique adulte chez un Mollusque. Malgré des profils d'expression spatio-temporel différents de ceux attendus pour des facteurs du déterminisme sexuel, Cg-DMI et Cg-Foxl2 pourraient jouer un rôle dans la différenciation gonadique mâle et femelle chez les adultes de *C. gigas*. Leur augmentation d'expression au cours du cycle gamétogénétique adulte est d'ailleurs en accord avec le développement saisonnier de la gonade (Franco *et al.*, 2008) et l'expression de Oyvlg (notre étude). Ainsi, Cg-DMI interviendrait dans la prolifération et/ou différenciation des cellules germinales et/ou somatiques des tubules gonadiques alors que Cg-Foxl2 pourrait notamment être impliqué dans la vitellogenèse chez la femelle. Nos résultats pourraient aussi indiquer un rôle spécifique de Foxl2 dans la maturation de la gonade mâle de l'huître, un rôle non mentionné chez d'autres Métazoaires qui présentent une expression testiculaire de Foxl2 généralement de 2 à 100 fois moindre que celle observée dans les ovaires (Govoroun *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004 ; Alam *et al.*, 2008 ; Oshima *et al.*, 2008). Dans l'hypothèse où le rôle de Cg-DMI et Cg-Foxl2 dans le déterminisme sexuel de l'huître serait confirmé, les résultats obtenus au cours de cette thèse soulèvent également des questions concernant la fenêtre temporelle potentielle des réversions sexuelles chez les adultes de *C. gigas*. En effet, il est classiquement supposé que ces réversions auraient lieu, chez l'huître, au stade 0, lors de la reprise de la gamétogenèse. L'augmentation significative de l'expression de Cg-DMI chez le mâle au stade III et de Cg-Foxl2 chez la femelle au stade II pourrait laisser supposer une fenêtre temporelle des réversions sexuelles adultes, variable selon les sexes, à la fin du cycle précédent le repos sexuel, plus précoce chez la femelle que chez le mâle. Cette dernière idée est renforcée par l'observation, au cours de cette thèse, d'une gamétogenèse plus précoce chez les femelles comparée aux mâles. Un complément d'information pourrait être apporté par un suivi de l'expression de *Cg-DMI* et *Cg-Foxl2* chez des individus en fin de cycle *n* et début de cycle (*n+1*), à partir de biopsies. Une variation des niveaux d'expression de ces facteurs entre le moment qui précède et suit le changement potentiel de sexe pourrait ainsi permettre de

confirmer/infirmier leur rôle dans la différenciation de la gonade lors des réversions sexuelles au cours du cycle gamétogénétique adulte.

Cette étude démontre également, pour la première fois, l'implication de facteurs potentiels du déterminisme du sexe lors de la première différenciation gonadique au cours du développement chez un Mollusque. Ces informations s'avèrent d'autant plus utiles que très peu de données sont disponibles à l'heure actuelle sur l'organogenèse de la gonade chez *C. gigas*. Ainsi, Cg-DML pourrait intervenir dans la prolifération/différenciation cellulaire au cours du développement. Nos résultats mettent aussi en lumière une période clé au cours du développement, entre la métamorphose et le stade naissain de 3 mois, plus précisément aux alentours du stade naissain âgé de 1-1,5 mois. Cette période est marquée par un pic d'expression de *Oyvlg* et *Cg-DML* alors que *Cg-Foxl2* décroît alors significativement. Cette fenêtre temporelle pourrait correspondre à la différenciation des cellules germinales primordiales en cellules germinales souches, mentionnée par Fabioux *et al.* (2004), qui s'organiseraient en deux masses symétriques de part et d'autre de la glande digestive et qui proliféreraient ensuite intensivement pour former les tubules gonadiques qui constituent la gonade mûre. Notre étude ayant été réalisée sur une population de naissain dont on ne connaît pas le sexe *a priori* et du fait de la protandrie de l'huître (développent majoritairement mâle la première année), nous pouvons penser qu'il est normal qu'un facteur de la différenciation gonadique femelle soit sous exprimé par rapport à un marqueur de la différenciation testiculaire. Le pic d'expression non significatif de *Cg-Foxl2* chez le naissain âgé d'environ 3,5 mois pourrait être concomitant à la reprise de gamétogenèse dans la gonade déjà formée, comme suggéré par nos observations histologiques. Ainsi, si nos résultats ne permettent pas d'affirmer un rôle de ces deux facteurs dans le déterminisme sexuel lors de la première mise en place de la gonade, ils amènent néanmoins à penser que ce mécanisme interviendrait chez l'huître entre la métamorphose et le stade naissain de 3 mois, peut être aux alentours du stade naissain 1-1,5 mois. Des éléments de réponse pourraient être apportés grâce à des études de localisation *in situ* de l'expression des ARNm (hybridation *in toto*) et des protéines (immunocytochimie) de Cg-FoxL2 et Cg-DML. Afin de mettre en parallèle leurs fenêtres d'expression spatio-temporelle avec celle de la première mise en place de la gonade, notamment de la lignée germinale, au cours du développement, une approche préliminaire pourrait consister à localiser les cellules germinales primordiales grâce à des anticorps hétérologues dirigés par exemple contre c-kit ou Oct 3/4 exprimés lors de la spermatogenèse chez la souris (Lacham-Kaplan, 2004) ou avec un anticorps spécifique dirigé contre la

protéine codée par *Oyvlg* et synthétisée au sein de l'UMR. Ce travail est en cours de réalisation dans le cadre d'un stage de Master II Recherche au sein de notre Equipe « Proliférations cellulaires et Gamétogenèse ». Une seconde approche nécessiterait la production de protéines recombinantes afin de disposer d'anticorps spécifiques dirigés contre Cg-DMI et Cg-Foxl2 pour réaliser des doubles marquages avec la protéine de *Oyvlg*.

Enfin, bien que cette thèse n'ait pas permis de confirmer de façon certaine l'idée avancée par Guo *et al.* (1998) d'un déterminisme sexuel génétique chez l'huître, elle constitue un premier pas dans cette voie, en apportant quelques pistes de réflexion à la question suivante: Le déterminisme sexuel de l'huître, s'il est génétique, peut-il être régulé de façon environnementale et/ou épigénétique? On peut penser, au vu de nos résultats, qu'il n'est pas régi par un gène clé de la cascade du déterminisme sexuel dont l'expression gonadique précoce serait spécifique d'un sexe, comme c'est le cas par exemple pour *Dmrt1* chez les Métazoaires gonochoriques (Hong *et al.*, 2007) dont l'ormeau (Klinbunga *et al.*, 2008). Le déterminisme du sexe chez *C. gigas* ne s'apparenterait pas non plus à ce qui est observé chez d'autres hermaphrodites, protandres comme le pagre à tête noire *Acanthopagrus schlegeli* ou protogynes comme le mérrou *Epinephelus coioides*, pour lesquels on observe une gonade bisexuelle et une transition ovaire/testicule en étroite relation avec un changement d'expression de *Dmrt1* (He *et al.*, 2003a ; Wu *et al.*, 2005 ; Xia *et al.*, 2007). Par contre, nos résultats peuvent laisser penser à un déterminisme sexuel polygénique, d'ailleurs déjà supposé chez l'huître, comme mentionné en introduction générale, d'après des travaux sur le *sex-ratio* de triploïdes chimiques et naturelles (Eudeline, 2004) ou tétraploïdes (Guo et Allen, 1997). Toutefois, bien que suspecté chez de nombreuses espèces, ce type de déterminisme est considéré comme évolutivement instable et n'a été réellement prouvé que chez quelques espèces comme le bar *Dicentrarchus labrax*, la guêpe *Nasonia vitripennis* et les tortues *Graptemys ouachitensis* et *Chelydra serpentina* (Vandeputte *et al.*, 2007). Chez ces tortues comme chez le bar, le déterminisme sexuel génétique serait associé à un déterminisme environnemental lié à la température (Vandeputte *et al.*, 2007). Ceci nous amène naturellement à penser que le déterminisme du sexe de l'huître, s'il est polygénique, pourrait être multifactoriel et régulé de façon environnementale, notamment par la température. Ainsi, maintenant que nous avons supposé l'existence d'une fenêtre temporelle plus fine potentiellement intéressante au cours du développement de l'huître, un élément de réponse pourrait être apporté en testant l'influence de facteurs environnementaux tels la température, sur l'expression de Cg-DMI et Cg-Foxl2 pendant cette fenêtre temporelle, c'est-à-dire chez du

jeune naissain (1-3 mois). Ceci pourrait permettre non seulement de confirmer/infirmier le rôle de ces facteurs dans un déterminisme de type génétique du sexe lors de la première mise en place de la gonade, mais aussi d'envisager une régulation environnementale qui, à plus long terme, pourrait permettre d'orienter le sexe des animaux en éclosion. De tels travaux sont d'ailleurs prévus dans le cadre d'un projet Européen (FP7-KBBE-2009-3) soumis en janvier 2009. Toutefois, si l'influence de la température sur le déterminisme sexuel des Métazoaires n'est plus à prouver, d'autres facteurs sont aussi à considérer, comme par exemple la nourriture. En effet, comme mentionné en introduction générale, certains animaux présentent un déterminisme environnemental du sexe dépendant de la température mais aussi de l'état nutritionnel des mères (Saccone *et al.*, 2002 ; Warner *et al.*, 2007). Chez le bar, Vandeputte *et al.* (2007) mentionnent une corrélation génétique entre la taille des individus et leur sexe, ce qui signifierait en d'autres termes que les gènes du déterminisme du sexe et de la croissance seraient les mêmes ou fortement liés. Ainsi, chez cette espèce, une taille minimale serait nécessaire au moment du déterminisme sexuel pour permettre une différenciation gonadique femelle. Une telle hypothèse semble plausible chez l'huître, pour deux raisons : (i) la croissance et la reproduction sont très étroitement liées par l'intermédiaire des cellules de réserve qui entourent la gonade (Heude-Berthelin *et al.*, 2001) et (ii) les palpes labiaux, riches en cellules de réserves (Heude-Berthelin *et al.*, 2000) expriment fortement Cg-Foxl2 et Cg-DML. Enfin, en ce qui concerne l'hypothèse d'une régulation épigénétique du sexe de l'huître, nous entendons ce terme dans le sens qui lui est donné par Wollfe et Matzke (1999), à savoir l'"Etude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modification dans la séquence de l'ADN". Un élément de réponse peut être apporté par des résultats préliminaires obtenus au sein de notre Equipe (Specq, 2008) et qui mettent en évidence la présence d'ARN non codants anti-sens potentiels de Cg-Foxl2, laissant ainsi supposer une régulation épigénétique de certains gènes chez *C. gigas*.

Sur un plan plus large, l'ensemble de notre étude a permis des avancées intéressantes concernant la physiologie de la reproduction de l'huître. Ainsi, la caractérisation de deux nouveaux acteurs de la différenciation gonadique permettra de compléter les connaissances du génome des Lophotrocozoaires indispensables pour enrichir les données en génomique comparée de la reproduction et en phylogénie moléculaire.

Les implications potentielles de Cg-DMI et Cg-Foxl2 dans les processus physiologiques de la différenciation gonadique au cours de la première mise en place de la gonade et lors des réversions sexuelles au cours du cycle gamétogénétique adulte chez *C. gigas* sont résumés sous la forme de deux schémas préliminaires synthétiques (Figures 39 et 40).

Voici enfin pour finir, d'autres perspectives de recherche plus larges concernant l'étude du déterminisme sexuel chez l'huître.

Une analyse de l'ensemble du génome de *C. gigas* actuellement en cours de séquençage (Marine Genomics Network of Excellence, Aquafirst, Génoscope d'Evry) ainsi que de son transcriptome pourrait permettre d'identifier d'autres marqueurs de la différenciation gonadique mais aussi de préciser leur expression et donc leur rôle potentiel chez l'huître. De tels travaux sont d'ailleurs prévus dans le cadre d'une ANR («Gametogenes», Génomique de la gamétogenèse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*) débutée en 2009.

Chez l'huître, une EST d'un facteur de la famille Sox a été identifiée au sein de l'UMR et son expression, étudiée au sein de notre équipe (Specq, 2008). L'analyse phylogénétique du domaine HMG conservé chez les facteurs de cette famille a montré que cette EST serait plus proche du facteur *Sox9*, acteur majeur du déterminisme sexuel mâle chez les Mammifères (Kent *et al.*, 1996) que de *Sox8*. Des résultats préliminaires de PCR semi-quantitatives illustrent un profil d'expression compatible avec celui d'un facteur du déterminisme sexuel mâle, à savoir une expression précoce marquée au cours du cycle gamétogénétique adulte (stade 0) et plus élevée dans la gonade mâle que dans la femelle. Au vu de ces résultats, la caractérisation et l'étude de l'expression spatio-temporelle de ce facteur pourraient être entreprise au cours du développement et du cycle gamétogénétique adulte.

Les fonctions biologiques des facteurs Cg-DMI et Cg-Foxl2 dans la différenciation gonadique pourraient être envisagées par des études fonctionnelles de mise sous silence de l'expression de gènes (RNAi) sur certains stades de développement d'huître ainsi que chez des adultes au cours du cycle gamétogénétique. Ces approches devraient générer des phénotypes orientant vers la compréhension des fonctions de ces gènes. Des tests fonctionnels homologues pourraient aussi être effectués sur des cultures de cellules d'huître mais nécessiteraient au préalable de produire des protéines recombinantes et de développer une lignée cellulaire chez *C. gigas*, ne disposant maintenant que de primo-cultures.

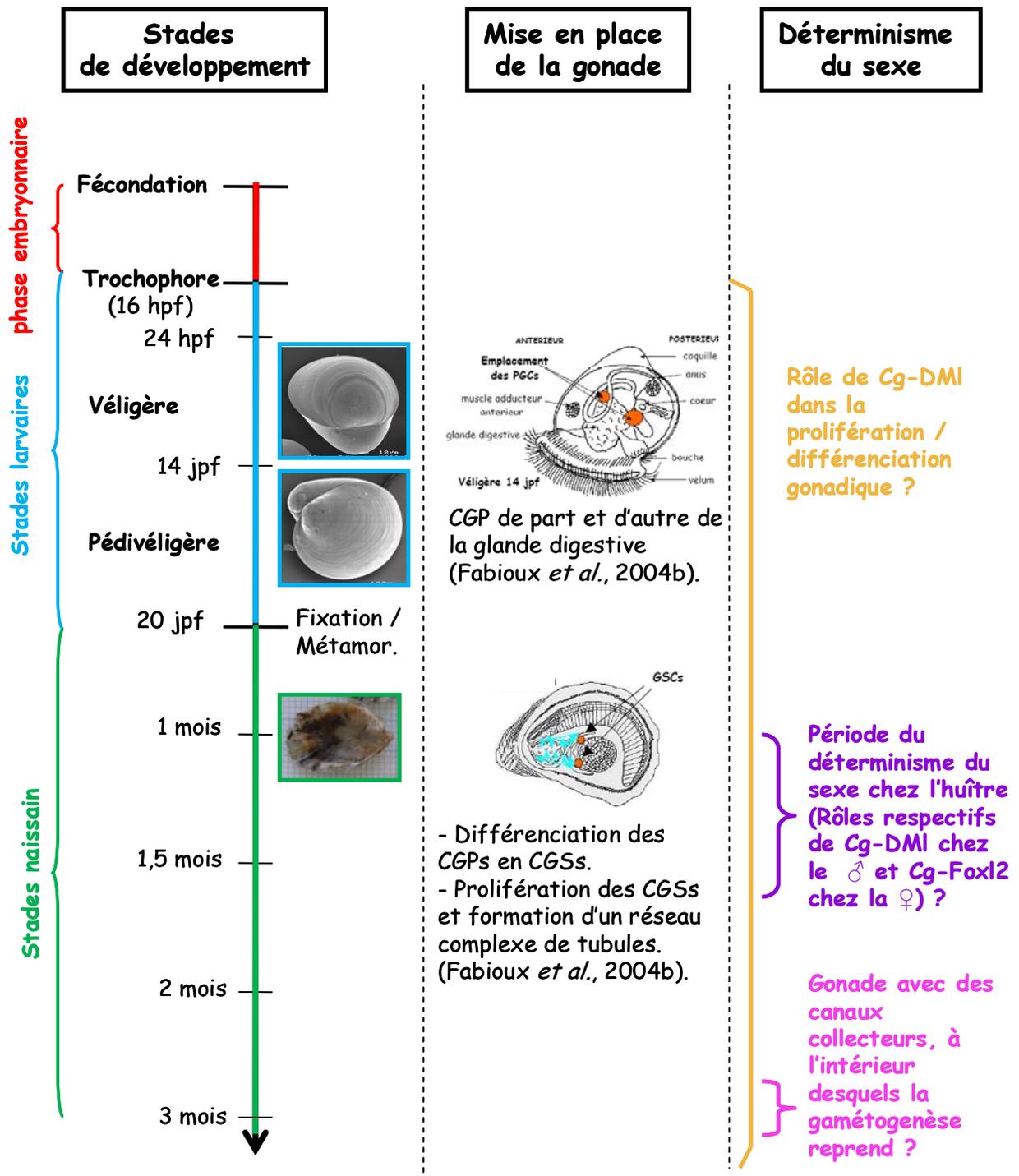


Figure 40 : Schéma préliminaire récapitulant la période potentielle du déterminisme du sexe et les implications potentielles de Cg-DMI et Cg-Foxl2 dans la différenciation gonadique au cours de la 1<sup>ère</sup> mise en place de la gonade chez *C. gigas*.

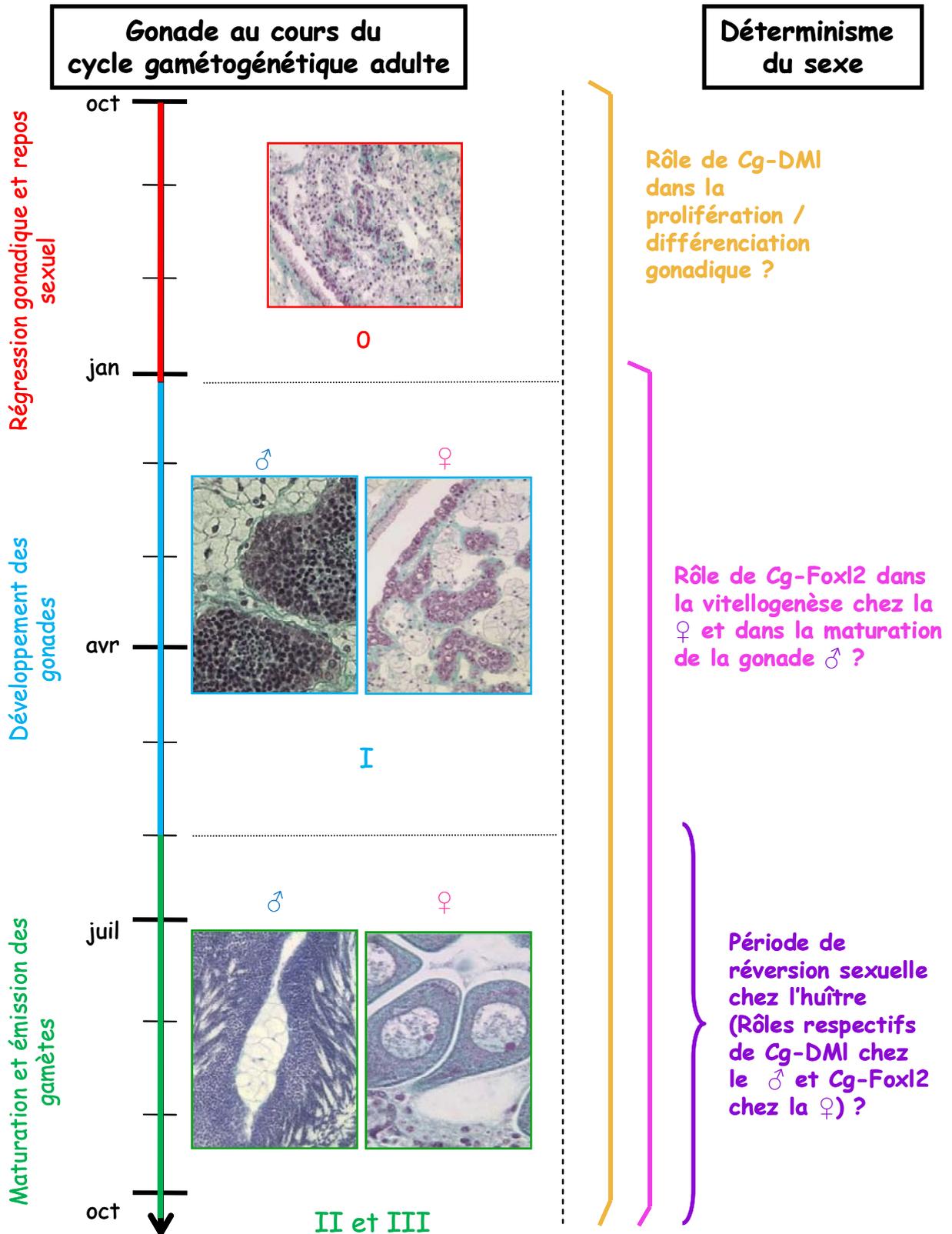


Figure 41 : Schéma préliminaire récapitulant la période potentielle des réversions sexuelles et les implications potentielles de Cg-DMI et Cg-Foxl2 dans la différenciation gonadique au cours du cycle gamétogénétique adulte chez *C. gigas*.

**-A-**

- Adell T. and Muller W.E.G. (2004) Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene* 334, 35-46.
- Adoutte A. and Philippe H. (1993) The major lines of metazoan evolution: summary of traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. *Comparative molecular neurobiology*. 1-30.
- Adoutte A., Balavoine G., Lartillot N. and De Rosa R. (1999) Animal evolution. The end of the intermediate taxa? *Trends Genet*, 15, 104-108.
- Adoutte A., Balavoine G., Lartillot N., Lespinet O., Prud'homme B. and De Rosa R. (2000) The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4453-4456.
- Alam M.A., Kobayashi Y., Horiguchi R., Hirai T. and Nakamura M. (2008) Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 75–85.
- Allen S.K.Jr, Hidu H. and Stanley J.G. (1986) Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *The Biological bulletin* 170 (2), 198-210.
- An W., Cho S., Ishii H. and Wensink P.C. (1996) Sex-specific and non-sex-specific oligomerization domains in both of the doublesex transcription factors from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3106-3111.
- Atrazhev A.M. and Elliot J.F. (1996) Simplified desalting of ligation reaction immediately prior to electroporation into *E. coli*. *Biotechniques* 21, 1024.
- Ayala F.J., Rzhetsky A. and Ayala F.J. (1998) Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 606-611.

**-B-**

- Balciuniene J., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2006) Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles. *Mol. Cell. Biol.* 26 (23), 8984-91.
- Baron D., Cocquet J., Xia X., Fellous M., Guiguen Y. and Veitia R.A. (2004) An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology* 33, 705-715.
- Berthelin C., Kellner K., Mathieu M. (2000a) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 125, 359-369.

- Berthelin C., Kellner K. and Mathieu M. (2000b). 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, 359-69.
- Bhandari R.K., Alam M.A., Soyano K. and Nakamura M. (2006) Induction of female-to-male sex change in the honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. *Zoolog. Sci.* 23 (1), 65-9.
- Boutet I., Moraga D., Marinovic L., Obreque J. and Chavez-Crooker P. (2008) Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: influence of maturation stage and sex on mRNA expression. *Gene* 407 (1-2), 130-8.
- Brake J., Davidson J. and Davis J. (2004) Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 236, 179-191.
- Bratuś A. and Słota E. (2006) *DMRT1/Dmrt1*, the Sex Determining or Sex Differentiating Gene in Vertebrata. *Folia Biologica* 54 (3-4), 81-86.
- Brown L.Y. and Brown S.A. (2004) Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet.* 20 (1), 51-8.
- Brunner B., Hornung U., Shan Z., Nanda I., Kondo M., Zend-Ajusch E., Haaf T., Ropers H.H., Shima A., Schmid M., Kalscheuer VM. and Scharl M. (2001) Genomic organization and expression of the *doublesex*-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *dmrt1*. *Genomics* 77, 8-17.
- Burtis K.C. and Baker B.S. (1989) *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56, 997-1010.
- Bustin S.A. (2000), Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.

-C-

- Cao J., Cao Z. and Wu T. (2007) Generation of antibodies against DMRT1 and DMRT4 of *Oreochromis aurea* and analysis of their expression profile in *Oreochromis aurea* tissues. *J. Genet. Genomics* 34 (6), 497-509.
- Carlsson P. and Mahlapuu M. (2002) Forkhead transcription factors: Key players in development and metabolism. *Development Biology* 250, 1-23.
- Chavez-Villalba J.E., Barret J., Mingant C., Cochard J-C., Le Pennec M. (2002a) Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture* 210, 171-186.
- Chavez-Villalba J.E., Pommier J., Andriamiseza J., Pouvreau S., Barret J., Cochard J-C. and Le Pennec M. (2002b) Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*, origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115-130.

- Chavez-Villalba J.E., Cochard J-C., Le Pennec M., Barret J., Enriquer-Diaz M. and Caceres-Martinez C. (2003) Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22 (3), 721-731.
- Cheng H.H., Ying M., Tian Y.H., Guo Y., McElreavey K. and Zhou R.J. (2006) Transcriptional diversity of DMRT1 (DSX- and mab3-related transcription factor 1) in human testis. *Cell Res.* 16, 389-393.
- Cho S., Huang Z.Y., Green D.R., Smith D.R. and Zhang J. (2006) Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Res.* 16 (11), 1366-75.
- Cho S., Huang Z.Y. and Zhang J. (2007) Sex-specific splicing of the honeybee doublesex gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics* 177 (3), 1733-41.
- Christiansen A.E., Keisman E.L., Ahmad S.M. and Baker B.S. (2002) Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *Trends Genet.* 18 (10), 510-6.
- Cocquet J., Pailhoux E., Jaubert F., Servel N., Xia X., Pannetier M., De Baere E., Messiaen L., Cotinot C., Fellous M. and Veitia R.A. (2002) Evolution and expression of Foxl2. *J. Med. Genet.* 39, 916-921.
- Cocquet J., De Baere E., Gareil M., Pannetier M., Xia X., Fellous M. and Veitia R.A. (2003) Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 206-211.
- Cocquet J., Pannetier M., Fellous M. and Veitia R.A. (2005) Sense and antisense *Foxl2* transcripts in mouse. *Genomics* 85 (5), 531-41.
- Comps M. and Duthoit J. L. (1976) Virus infection associated with 'gill disease' of the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata* Lmk. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Paris* 283, 1595-1596.
- Cotinot C., Pailhoux E., Jaubert F. and Fellous M. (2002) Molecular genetics of sex determination. *Semin. Reprod. Med.* 20 (3), 157-68.
- Crisponi L., Deiana M., Loi A., Chiappe F., Uda M., Amati P., Bisceglia L., Zelante L., Nagaraja R., Porcu S., Ristaldi M.S., Marzella R., Rocchi M., Nicolino M., Lienhardt-Roussie A., Nivelon A., Verloes A., Schlessinger D., Gasparini P., Bonneau D., Cao A. and Pilia G. (2001) The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics* 27, 159-166.
- Cristino A.S., Nascimento A.M., Costa Lda F. and Simões Z.L. (2006) A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila elanogaster*. *Genet. Mol. Res.* 5 (1), 154-68.

**-D-**

- Danton E. (1996) La triploïdie chez les Mollusques Bivalves: Application à la production commerciale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Étude de ses conséquences sur trois modèles: *Mulinia lateralis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen, 139 p.
- De Baere E., Dixon M.J., Small K.W., Jabs E.W., Leroy B.P., Devriendt K., Gillerot Y., Mortier G., Meire F., Van Maldergem L., Courtens W., Hjalgrim H., Huang S., Liebaers I., Van Regemorter N., Touraine P., Praphanphoj V., Verloes A., Udar N., Yellore V., Chalukya M., Yelchits S., De Paepe A., Kuttenn F., Fellous M., Veitia R. and Messiaen L. (2001) Spectrum of *FOXL2* gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype–phenotype correlation. *Human Molecular Genetics* 10, 1591–1600.
- De Rosa R., Grenier J.K., Andreeva T., Cook C.E., Adoutte A., Akam M., Carroll S.B. and Balavoine G. (1999) Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature*, 399, 772-776.
- Dournon C., Houillon C. and Pieau C. (1990) Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.* 34 (1), 81-92.

**-E-**

- El-Mogharbel N., Wakefield M., Deakin J.E., Tsend-Ayush E., Grutzner F., Alsop A., Ezaz T. and Graves J.A.M. (2007) DMRT gene cluster analysis in the platypus: new insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics* 89, 10-21.
- Elf P.K. (2003) Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132 (3), 349-55.
- Ellis R. and Schedl T. (2007) Sex determination in the germ line. *WormBook* 5, 1-13.
- Ellsworth B.S., Burns A.T., Escudero K.W., Duval D.L., Nelson S.E. and Clay C.M. (2003) The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 206 (1-2), 93-111.
- Erdman S. E. and Burtis K. C. (1993) The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc-finger-related DNA binding domain. *EMBO J.* 12, 527–535.
- Erdman S.E., Chen H.J. and Burtis K.C. (1996) Functional and genetic characterization of the oligomerization and DNA binding properties of the *Drosophila* doublesex proteins. *Genetics* 144, 1639-1652.
- Erwin D.H. (1991) Metazoan phylogeny and the Cambrian radiation. *Trends Ecol. Evol.* 6, 131-134.

Eudeline B. (2004) La tétraploïdie chez les mollusques bivalves, application à la production de triploïdes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Etude comparée de la gamétogenèse et des métabolismes associés chez les diploïdes, triploïdes et tétraploïdes. Thèse de l'Université de Rennes I, 183 pp.

## -F-

Fabioux C., Pouvreau S., Le Roux F. and Huvet A. (2004a) 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., Lelong C., Robert R., Pouvreau S., Daniel J.Y., Minguant C. and Le Pennec M. (2004b) Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592-598.

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, (1-2), 458-470.

Fahrioglu U., Murphy M.M., Zarkower D. and Bardwell V.J. (2007) mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sexual Dev.* 1, 42-58.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Ferguson-Smith M. (2007) The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1. *Sex. Dev.* 1 (1), 2-11.

Fleming A. and Crews D. (2001) Estradiol and incubation temperature modulate regulation of steroidogenic factor 1 in the developing gonad of the red-eared slider turtle. *Endocrinology* 142, 1403-1411.

Franco A., Heude Berthelin C., Goux D., Sourdain P. and Mathieu M. (2008) Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40, 251-269.

Frohman M.A., Dush M.K. and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts, amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 8998-9002.

## -G-

Gabe M. (1968) Techniques histologiques. Masson et Cie eds., Paris VI<sup>ème</sup>, France.

Gajiwala K.S. and Burley S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (1), 110-6.

- Galtsoff P.S., The american oyster *Crassostrea virginica* (G.). *Fish. Bull. U.S.* 64 (1964) 1-480.
- Garrett-Engle C.M., Siegal M.L., Manoli D.S., Williams B.C., Li H. and Baker B.S. (2002) Intersex, a gene required for female sexual development in *Drosophila*, is expressed in both sexes and functions together with doublesex to regulate terminal differentiation. *Development* 129 (20), 4661-75.
- Gibson U.E., Heid C.A. and Williams P.M. (1996), A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6, 995-1001.
- González-Tizón A.M., Martínez-Lage A., Rego I., Ausió J. and Méndez J. (2000). DNA content, karyotypes, and chromosomal location of 18S-5.8S-28S ribosomal loci in some species of bivalve molluscs from the Pacific Canadian coast. *Genome* 43, 1065-1072.
- Goodwin E.B. and Ellis R.E. (2002) Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 12 (3), 111-20.
- Goodwin E.B., Hofstra K., Hurney C.A., Mango S. and Kimble J. (1997) A genetic pathway for regulation of tra-2 translation. *Development.* 124 (3), 749-58.
- Govoroun M.S., Pannetier M., Pailhoux E., Cocquet J., Brillard J.P., Couty I., Batellier F. and Cotinot C. (2004) Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* 231, 859–870.
- Graham D.H., Holmes J.L. and Black W.C. (2004) Identification of quantitative trait loci affecting sex determination in the Eastern treehole mosquito (*Ochlerotatus triseriatus*). *J Hered.* 95 (1), 35-45.
- Grizel H. (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Compt. rend. Acad. Sci.* 279, 783-785.
- Guan G., Kobayashi T. and Nagahama Y. (2000) Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 662-666.
- Guigon C.J., Coudouel N., Mazaud-Guittot S., Forest M.G. and Magre S. (2005) Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinol.* 146 (7), 2992-3004.
- Guo X. and Allen S.K.Jr. (1994) Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics* 138 (4), 1199-206.
- Guo X. and Allen S.K.Jr. (1997) Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome* 40 (3), 397-405.
- Guo X., Hedgecock D., Hershberger W.K., Cooper K. and Allen S.K.Jr. (1998) Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52, 394-402.

Guo Y., Li Q., Gao S., Zhou X., He Y., Shang X., Cheng H. and Zhou R. (2004) Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of Dmrt5 of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 569-575.

Guo Y., Cheng H., Huang X., Gao S., Yu H. and Zhou R. (2005) Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 950-957.

## -H-

Hasselmann M., Vekemans X., Pflugfelder J., Koeniger N., Koeniger G., Tingek S. and Beye M. (2008a) Evidence for convergent nucleotide evolution and high allelic turnover rates at the complementary sex determiner gene of Western and Asian honeybees. *Mol Biol Evol.* 25 (4), 696-708

Hasselmann M., Gempe T., Schjøtt M., Nunes-Silva C.G., Otte M. and Beye M. (2008b) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454 (7203), 519-22.

He C.L., Du J.L., Lee Y.H., Huang Y.S., Nagahama Y. and Chang C.F. (2003a) Differential messenger RNA transcription of androgen receptor and estrogen receptor in gonad in relation to the sex change in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol. Reprod.* 69 (2), 455-61.

He C.L., Du J.L., Wu G.C., Lee Y.H., Sun L.T. and Chang C.F. (2003b) Differential Dmrt1 transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Cytogenet. Genome Res.* 101 (3-4), 309-13.

Hediger M., Burghardt G., Siegenthaler C., Buser N., Hilfiker-Kleiner D., Dübendorfer A. And Bopp D. (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex. *Dev Genes Evol.* 214 (1), 29-42.

Heimpel G.E. and De Boer J.G. (2008) Sex determination in the hymenoptera. *Annu Rev Entomol.* 53, 209-30.

Hempel L.U. and Oliver B. (2007) Sex-specific Doublesex<sup>M</sup> expression in subsets of *Drosophila* somatic gonad cells. *BMC Dev Biol.* 7, 113-127.

Herpin, A., Favrel, P. and Cunningham, C. (2002) Gene structure and expression of cg-ALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 301, 21-30.

Herpin A., Schindler D., Kraiss A., Hornung U., Winkler C. and Schart M. (2007) Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene Dmrt1bY. *BMC Dev. Biol.* 7, 99.

- Heude-Berthelin C., Kellner K. and Mathieu M. (2000) Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2, 136-145.
- Heude-Berthelin C., Laisney J., Espinosa J., Martin O., Hernandez G., Mathieu M. and Kellner K. (2001) Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* of two different growing area (Normandy and Atlantic shore, France). *Invert. Reprod. Dev.* 40, 79-86.
- Hilfiker-Kleiner D., Dübendorfer A., Hilfiker A. and Nöthiger R. (1994) Genetic control of sex determination in the germ line and soma of the housefly, *Musca domestica*. *Development* 120 (9), 2531-8.
- Hong C.S., Park B.Y. and Saint-Jeannet J.P. (2007) The function of Dmrt genes in vertebrate development: It is not just about sex. *Dev. Biol.* 310, 1-9.
- Huang X., Hong C.S., O'Donnell M. and Saint-Jeannet J.P. (2005b) The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11349-11354.
- Hudson Q.J., Smith C.A. and Sinclair A.H. (2005) Aromatase inhibition reduces expression of *FOXL2* in the embryonic chicken ovary. *Dev. Dyn.* 233 (3), 1052-5.
- Hung H. and Yao C. (2005) The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 230, 87-93.

**-I-**

- Iwade R., Maruo K., Okada G. and Nakamura M. (2008) Elevated expression of P450c17 (CYP17) during testicular formation in the frog. *Gen Comp Endocrinol.* 155 (1), 79-87.

**-K-**

- Kaestner K.H., Knockel W. and Martinez D.E. (2000) Unified nomenclature for the Winged Helix/Forkhead transcription factors. *Genes and Development* 14, 142-146.
- Kanai Y., Hiramatsu R., Matoba S. and Kidokoro T. (2005) From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J. Biochem.* 138 (1), 13-9.
- Kaslow D.C. (1986) A rapid biochemical method for purifying lambda DNA from phage lysates. *Nucleic Acids Res.* 14, 6767.
- Kato T., Matsui K., Takase M., Kobayashi M. and Nakamura M. (2004) Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 227-236.

- Kato Y., Kobayashi K., Oda S., Colbourn J.K., Tatarazako N., Watanabe H. and Iguchi T. (2008) Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. *Genomics* 91, 94-101.
- Katoh M. and Katoh M. (2004) Human *Fox* gene family. *Int. J. Oncol.* 25, 1495-1500.
- Kawamata M. and Nishimori K. (2006) Mice deficient in *Dmrt7* show infertility with spermatogenic arrest at pachytene stage. *FEBS Lett.* 580 (27), 6442-6.
- Kelleher D.F., De Carvalho C.E., Doty A.V., Layton M., Cheng A.T., Mathies L.D., Pilgrim D. and Haag E.S. (2008) Comparative genetics of sex determination: masculinizing mutations in *Caenorhabditis briggsae*. *Genetics* 178 (3), 1415-29.
- Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H. and Koopman P. (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122 (9), 2813-2822.
- Kettlewell J.R., Raymond C.S. and Zarkower D. (2000) Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* 26, 174-178.
- Kim S., Kettlewell J.R., Anderson R.C., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2003) Sexually dimorphic expression of multiple *doublesex*-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr. Patterns* 3, 77-82.
- Kim S., Namekawa S.H., Niswander L.M., Ward J.O., Lee J.T., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2007a) A mammal-specific *Doublesex* homolog associates with male sex chromatin and is required for male meiosis. *PLoS Genet.* 3 (4), e62.
- Kim S., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2007b) Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation. *Dev. Biol.* 307, 314-327.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M.C., Poulat F., Behringer R.R., Lovell-Badge R. and Capel B. (2006) *Fgf9* and *Wnt4* Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *Plos Biol.* 4 (6) 1000-9.
- 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 galloprovincialis*. *Zoological science* 13 (3), 393-402.
- Klinbunga S., Amparyup P., Khamnamtong B., Hirono I., Aoki T. and Jarayabhand P. (2009) Isolation and characterization of testis-specific DMRT1 in the tropical abalone (*Haliotis asinina*). *Biochem. Genet.* 47 (1-2), 66-79.
- Kondo M., Froschauer A., Kitano A., Nanda I., Hornung U., Volf J.N., Asakawa S., Mitani H., Naruse K., Tanaka M., Schmid M., Shimizu N., Schartl M. and Shima A. (2002) Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* 295, 213-222.

- Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shimizu N., Mitani H., Schmid M., Shima A. and Schartl M. (2003) Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Curr. Biol.* 13, 416-420.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. and Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117-121.
- Kuntz S., Chardard D., Chesnel A., Grillier-Vuissoz I. and Flament S. (2003) Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet Genome Res.* 101 (3-4), 283-8.
- Kuntz S., Chesnel A., Flament S. and Chardard D. (2004) Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. *J. Mol. Endocrinol.* 33 (3), 717-27.
- Kuwabara P.E. and Perry M.D. (2001) It ain't over till it's ova: germline sex determination in *C. elegans*. *Bioessays.* 23 (7), 596-604.

**-L-**

- Lacham-Kaplan O. (2004) In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction* 128 (2), 147-52.
- Lagos D., Ruiz M.F., Sánchez L. and Komitopoulou K. (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348, 111-21.
- Lakhal B., Laissue P., Elghèzal H. and Fellous M. (2008) Genetic analysis of premature ovarian failure: role of *forkhead* and TGF-beta genes. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 36 (9), 862-71.
- Lalli E., Ohe K., Latorre E., Bianchi M.E. and Sassone-Corsi P. (2003) Sexy splicing: regulatory interplays governing sex determination from *Drosophila* to mammals. *J Cell Sci.* 116 (3), 441-5.
- Lango-Reynoso F., Chavez-Villalba J., Cochard J.C. and Le Pennec M. (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lecointre G. and Le Guyader H. (2001) La classification phylogenetique du vivant. *Natures Sciences Societes*. Belin 3<sup>ème</sup> édition.
- Lee Y.H., Du J.L., Yueh W.S., Lin B.Y., Huang J.D., Lee C.Y., Lee M.F., Lau E.L., Lee F.Y., Morrey C., Nagahama Y., Chang C.F. (2001) Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J. Exp. Zool.* 290 (7), 715-26.
- Lehmann O.J., Sowden J.C., Carlsson P., Jordan T. and Bhattacharya S.S. (2003) Fox's in development and disease. *Trends Genet.* 19, 339-344.

- Lei N., Hornbaker K.I., Rice D.A., Karpova T., Agbor V.A. and Heckert L.L. (2007) Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. *Biol. Reprod.* 77, 66-475.
- Lelong C., Badariotti F., Le Quéré H., Rodet F., Dubos M.P. and Favrel P. (2007) Cg-TGF- $\beta$ , a TGF- $\beta$ /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immun.* 31, 30-38.
- Li K., Osada M. and Mori K. (2000) Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66, 502-508.
- Li L. and Guo X. (2004) AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Mar. Biotechnol.* 6, 26-36.
- Lints R. and Emmons S.W. (2002) Regulation of sex-specific differentiation and mating behavior in *C. elegans* by a new member of the DM domain transcription factor family. *Genes Dev.* 16 (18), 2390-402.
- Liu J., Liu S., Tao M., Li W. and Liu Y. (2007) Isolation and expression analysis of testicular type Sox9b in allotetraploid fish. *Mar. biotechnol.* 9 (3), 329-34.
- Liu X., Liang B. and Zhang S. (2004) cDNA cloning, tissue distribution and mRNA transcription of DMRT1 gene in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*. *Zool. Res.* 25, 158-161.
- Loffler K.A., Zarkower D. and Koopman P. (2003) Etiology of Ovarian Failure in Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Inversus Syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinol.* 144, 3237-3243.
- Lu H., Huang X., Zhang L., Guo Y., Cheng H. and Zhou R. (2007) Multiple alternative splicing of mouse *Dmrt1* during gonadal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (3), 630-4.
- Lubet P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les Pectinidés (Mollusques Bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. Fr.* 23, 387-548.
- Lum D., Kuwabara P., Zarkower D. and Spence A. (2000) Direct protein-protein interaction between the intracellular domain of TRA-2 and the transcription factor tra-1A modulates feminizing activity in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14, 3153-3165.

## -M-

- Magie C.R., Pang K. and Martindale M.Q. (2005) Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 215 (12), 618-30.
- Manolakou P., Lavranos G. and Angelopoulou R. (2006) Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 59-81.

- Marchand O., Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Lareyre J., Bernot A., Laudet V. and Guiguen Y. (2000) DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1493, 180–187.
- Marín I and Baker B.S. (1998) The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* 281(5385), 1990-4.
- Marteil L. (1976) La conchyliculture française. 2<sup>ème</sup> Partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40 (2), 149-346.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S. and Sakaizumi M. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417 (6888), 559-63.
- Matsumoto T., Osada M., Osawa Y. and Mari K. (1997) Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 118, 811-817.
- Matsumoto T., Nakamura A., Mori K. and Kayano T. (2003) Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool. Sci.* 20, 37-42.
- Matsumoto T., Nakamura A.M., Mori K., Akiyama I., Hirose H. and Takahashi Y. (2007) Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151 (2), 195-201.
- Matsushita Y., Oshima Y. and Nakamura M. (2007) Expression of DMRT Genes in the Gonads of *Rana rugosa* During Sex Determination. *Zool. Sci.* 24, 95-99.
- McClive P.J., Hurley T.M., Sarraj M.A., Van Den Bergen J.A. and Sinclair A.H. (2003) Subtractive hybridisation screen identifies sexually dimorphic gene expression in the embryonic mouse gonad. *Genesis* 37 (2), 84-90.
- Meng A., Moore B., Tang H., Yuan B. and Lin S. (1999) A *Drosophila doublesex-related gene, terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development* 126, 1259-1268.
- Miller S.W., Hayward D.C., Bunch T.A., Miller D.J., Ball E.E., Bardwell V.J., Zarkower D. and Brower D.L. (2003) A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. *Evol. Dev.* 5, 251–258.
- Morrison T.B., Weis J.J. and Wittwer C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24 (6), 954-962.
- Murphy M.W., Zarkower D. and Bardwell V.J. (2007) Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. *BMC. Mol. Biol.* 2, 8:58.

**-N-**

- Naimi A., Martinez A.S., Specq M.L., Mrac A., Diss B., Mathieu M. and Sourdain P. (2009) Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol, A*. 152, 189-196.
- Nakamoto M., Matsuda M., Wang D.E., Nagahama Y. and Shibata N. (2006) Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Commun.* 344, 353-361.
- Nanda I., Shan Z., Schartl M., Burt D., Koehler M., Nothwang H., Grutzner F., Paton I., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T. and Schmid M. (1999) 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet* 21,258-259.
- Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M. and Schartl M. (2002) A duplicated copy of *DMRT1* in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11778-11783.
- Narendra U., Zhu L., Li B., Wilken J. and Weiss M.A. (2002) Sex-specific gene regulation. The Doublesex DM motif is a bipartite DNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 277 (45), 43463-73.
- Nishioka M., Miura I. and Saitoh K. (1993) Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Horoshima Univ.* 12, 55-81.

**-O-**

- Orlando E.F., Katsu Y., Miyagawa S. and Iguchi T. (2006) Cloning and differential expression of estrogen receptor and aromatase genes in the self-fertilizing hermaphrodite and male mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *J. Mol. Endocrinol.* 37 (2), 353-65.
- Oshima Y., Uno Y., Matsuda Y., Kobayashi T. and Nakamura M. (2008) Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159 (2-3), 170-177.
- Ottolenghi C. and McElreavey K. (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol. Genet. Metab.* 71 (1-2), 397-404.
- Ottolenghi C., Fellous M., Barbieri M. and McElreavey K. (2002) Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. *Genomics* 79 (3), 333-43.

Ottolenghi C., Omari S., Garcia-Ortiz J.E., Uda M., Crisponi L., Forabosco A., Pilia G. and Schlessinger D. (2005) Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 14 (14), 2053-62.

Ottolenghi C., Uda M., Crisponi L., Omari S., Cao A., Forabosco A. and Schlessinger D. (2007a) Determination and stability of sex. *Bioessays* 29 (1), 15-25

Ottolenghi C., Pelosi E., Tran J., Colombino M., Douglass E., Nedorezov T., Cao A., Forabosco A. and Schlessinger D. (2007b) Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 16 (23), 2795-804.

## -P-

Pannetier M., Mandon-Pépin B., Copelli S. and Fellous M. (2004) Molecular aspects of female and male gonadal development in mammals. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 1 (3), 274-87.

Pannetier M., Fabre S., Batista F., Kocer A., Renault L., Jolivet G., Mandon-Pépin B., Cotinot C., Veitia R. and Pailhoux E. (2006) FOXL2 activates *P450 aromatase* gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J. Mol. Endocrinol.* 36 (3), 399-413.

Pask A.J., Behringer R.R. and Renfree M.B. (2003) Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis--from marsupials to mice. *Cytogenetic and genome research* 101(3-4), 229-236.

Passamaneck Y. and Halanych K.M. (2006) Lophotrochozoan phylogeny assessed with LSU and SSU data: Evidence of lophophorate polyphyly. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 20-28.

Passamaneck Y.J., Schander C. and Halanych K.M. (2004) Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 25-38.

Paz M., Torrado M., Korochkin L.I. and Mikhailov A.T. (2005) Esterase-like and fibronectin-like polypeptides share similar sex-cell-biased patterns in the gonad of hermaphroditic and gonochoric species of bivalve mollusks. *Cell. Tissue Res.* 322 (3), 475-89.

Peterson K.J., Cameron R.A. and Davidson E.H. (2000) Bilaterian origins: significance of new experimental observations. *Developmental Biology* 219, 1-17.

Peterson K.J., Lyons J.B., Nowak K.S., Takacs C.M., Wargo M.J. and McPeck M.A. (2004) Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6536-6541.

Pffalf M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9), 2002-2007.

- Pffalf M.W., Horgan G.W. and Dempfle L. (2002), Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9), 1-10.
- Pieau C. and Dorizzi M. (2004) Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J. Endocrinol.* 181 (3), 367-77.
- Pisarska M.D., Bae J., Klein C. and Hsueh A.J. (2004) Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 145 (7), 3424-33.
- Pohl B.S., Rössner A. and Knöchel W. (2004) The Fox gene family in *Xenopus laevis*: *FoxI2*, *FoxM1* and *FoxP1* in early development. *Int. J. Dev. Biol.* 49 (1), 53-8.
- Proestou D.A., Goldsmith M.R. and Twombly S. (2008) Patterns of male reproductive success in *Crepidula fornicata* provide new insight for sex allocation and optimal sex change. *Biol. Bull.* 214 (2), 194-202.
- Prueitt R.L. and Zinn A.R. (2001) A fork in the road to fertility. *Nature Genetic* 27, 132-134.

**-R-**

- Raymond C.S., Shamu C.E., Shen M.M., Seifert K.J., Hirsch B., Hodgkin J. and Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391, 691-695.
- Raymond C.S., Parker E.D., Kettlewell J.R., Brown L.G., Page D.C., Kusz K., Jaruzelska J., Reinberg Y., Flejter W.L., Bardwell V.J., Hirsch B. and Zarkower D. (1999a) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8, 989-996.
- Raymond C.S., Kettlewell J., Hirsch B., Bardwell V. and Zarkower D. (1999b) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215, 208-220.
- Raymond C.S., Murphy M., O'Sullivan M., Bardwell V. and Zarkower D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14, 2587-2595.
- Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M. and Henikoff S. (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26, 1628-1635.
- Russell L.D., Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P. and Clegg E.D. (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press*.

**-S-**

- Saccone G., Pane A. and Polito L.C. (2002) Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica* 116, 15-23.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson AR. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74 (12), 5463-5467.
- Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schartl M. (2004a) Sex chromosome evolution in nonmammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 634-641.
- Schartl M. (2004b) A comparative view on sex determination in medaka. *Mech. Dev.* 121, 639-645.
- Schmidt D., Ovitt C.E., Anlag K., Fehsenfeld S., Gredsted L., Treier A.C. and Treier M. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933-942.
- Schultheis C., Zhou Q., Froschauer A., Nanda I., Selz Y., Schmidt C., Matschl S., Wenning M., Veith A.M., Naciri M., Hanel R., Braasch I., Dettai A., Böhne A., Ozouf-Costaz C., Chilmunczyk S., Ségurens B., Couloux A., Bernard-Samain S., Schmid M., Schartl M. and Volff J.N. (2006) Molecular analysis of the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Zebrafish* 3(3), 299-309.
- Schütt C. and Nöthiger R. (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127 (4), 667-77.
- Seo K.W., Wang Y., Kokubo H., Kettlewell J.R., Zarkower D.A. and Johnson R.L. (2006) Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor Dmrt2 reveals an essential role in somite patterning. *Dev. Biol.* 290, 200-210.
- Shen M.M. and Hodgkin J. (1988) mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell.* 54, 1019-1031.
- Shibata K., Takase M. and Nakamura M. (2002) The Dmrt1 expression protein in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 27, 232-241.
- Siegal M.L. and Baker B.S. (2005) Functional conservation and divergence of intersex, a gene required for female differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol.* 215 (1), 1-12.

- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R. and Goodfellow P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346 (6281), 240-4.
- Smith C.A. and Sinclair A.H. (2001) Sex determination in the chicken embryo. *J Exp Zool.* 290 (7), 691-9.
- Smith C.A. and Sinclair A.H. (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26, 120-132.
- Smith C.A., McClive P.J., Western P.S., Reed K.J. and Sinclair A.H. (1999) Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402, 601–602.
- Smith C.A., Hurley T.M., McClive P.J. and Sinclair A.H. (2002) Restricted expression of *DMRT3* in chicken and mouse embryos. *Gene Expr. Patterns* 2 (1-2), 69-72.
- Specq M.L. (2008) Expression de *Cg-DM1*, *Cg-Foxl2* et d'une EST de *Sox*, facteurs potentiels de la différenciation gonadique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Mémoire de stage de MII, Université de Caen-Basse Normandie*, 30p.
- Steele S. and Mulcahy M.F. (1999) Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 70, 673-686.
- Steinke D., Hoegg S., Brinkmann H. and Meyer A. (2006) Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC Biology* 4, 16.
- Sugita J., Takase M. and Nakamura M. (2001) Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene* 280 (1-2), 67-74.
- Suzuki M.G., Ohbayashi F., Mita K. and Shimada T. (2001) The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1201-1211.

**-T-**

- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tompson J.D., Higgins D.J. and Gibson T.J. (1994), CLUSTALW, improving the sensitive of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.* 22, 4673-4680.
- Torres-Maldonado L.C., Landa Piedra A., Moreno Mendoza N., Marmolejo Valencia A., Meza Martýneza A. and Merchant Larios H. (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129, 20-26.

Tu Q., Brown C.T., Davidson E.H. and Oliveri P. (2006) Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. *Dev. Biol.* 300 (1), 49-62.

**-U-**

Uhlenhaut N. H. and Treier M. (2006) Foxl2 function in ovarian development. *Molecular Genetics and Metabolism* 88, 225-234.

**-V-**

Valenzuela N., Adams D.C. and Janzen F.J. (2003) Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *Am. Nat.* 161 (4), 676-83.

Van Dongen M.J., Cederberg A., Carlsson P., Enerback S. and Wikstrom M. (2000) Solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the adipocyte-transcription factor FREAC-11. *J. Mol. Biol.* 296, 351-359.

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

Veith A.M., Froschauer A., Korting C., Nanda I., Hanel R., Schmid M., Scharl M. and Volff J.N. (2003) Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* 317, 59-66.

Veith A.M., Klattig J., Dettai A., Schmidt C., Englert C. and Volff J.N. (2006) Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less *Dmrt8* genes in the mouse. *Genomics* 88, 185-195.

Volff J.N., Zarkower D., Bardwell V.J. and Scharl M. (2003) Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J. Mol. Evol.* 57, 1-9.

**-W-**

Wang D., Kobayashi T., Zhou L. and Nagahama Y. (2004) Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 320, 83-89.

Wang D.S., Kobayashi T., Zhou L.Y., Paul-Prasanth B., Ijiri S., Sakai F., Okubo K., Morohashi K. and Nagahama Y. (2007) Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21 (3), 712-25.

Warner D.A., Lovern M.B. and Shine R. (2007) Maternal nutrition affects reproductive output and sex allocation in a lizard with environmental sex determination. *Proc Biol Sci.* 274 (1611), 883-90.

- Waters P.D., Wallis M.C. and Marshall Graves J.A. (2007) Mammalian sex Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18 (3), 389-400.
- Weigel D. and Jackle H. (1990) The fork head domain, a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors. *Cell* 63 (3), 455-6.
- Wibbels T., Bull J.J. and Crews D. (1991a) Synergism between temperature and estradiol: a common pathway in turtle sex determination? *J. Exp. Zool.* 260 (1), 130-4.
- Wibbels T., Bull J.J. and Crews D. (1991b) Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool.* 260 (3), 371-81.
- Wilhelm D. (2007) R-spondin1--discovery of the long-missing, mammalian female-determining gene? *BioEssays* 29, 314-318.
- Winkler C., Hornung U., Kondo M., Neuner C., Duschl J., Shima A and Scharl M. (2004) Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal dmrt genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* 121, 997-1005.
- Winnepenninckx B., Backeljau T. and De Wachter R. (1996) Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1306–1317.
- Wittbrodt J., Meyer A. And Scharl M. (1998) More genes in fish? *Bioessays* 20, 511-515.
- Wolffe A.P. and Matzke M.A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286 (5439), 481-6.
- Wotton K.R., French K.E.M. and Shimeld S.M. (2007) The developmental expression of foxl2 in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Gene Expr. Patterns* 7 (7), 793-797.
- Wu G.C., DU J.L., Lee Y.H., Lee M.F. and Chang C.F. (2005) Current status of genetic and endocrine factors in the sex change of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* (Teleostean). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 206-14.
- Wu S., Skolnick J. and Zhang Y. (2007) Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biology*, 5, 17-27.
- Wylie C. (1999) Germ cells. *Cell* 96, 165-174.

**-X-**

- Xia W., Zhou L., Yao B., Li C.J. and Gui J.F. (2007) Differential and spermatogenic cell-specific expression of DMRT1 during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 263, 156–172.

**-Y-**

- Yamaguchi A., Lee K.H., Fujimoto H., Kadomura K., Yasumoto S. and Matsuyama M. (2006) Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 1, 59-68.
- Yamaguchi T., Yamaguchi S., Hirai T. and Kitano T. (2007) Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 935-940.
- Yamamura Y., Aoyama S., Oshima Y., Kato T., Osawa N. and Nakamura M. (2005) Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* WT1 and Fgf9. *Zoolog Sci.* 22 (9), 1045-50.
- Yao H.H., DiNapoli L. and Capel B. (2004) Cellular mechanisms of sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Mech. Dev.* 121 (11), 1393-401.
- Yi W. and Zarkower D. (1999) Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development* 126, 873-81.
- Ying M., Chen B., Tian Y., Hou Y., Li Q., Shang X., Sun J., Cheng H. and Zhou R. (2007) Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin- $\beta$ . *Biochem. Biophys. Acta*, 1773, 804-813.
- Yoshimoto S., Okada E., Oishi T., Numagami R., Umemoto H., Tamura K., Kanda H., Shiba T., Takamatsu N. and Ito M. (2006) Expression and promoter analysis of *Xenopus DMRT1* and functional characterization of the transactivation property of its protein. *Dev. Growth Differ.* 48 (9), 597-603.
- Yu Z. and Guo X. (2003) Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica Gmelin*. *Biol Bull.* 204, 327-338.
- Yu Z. and Guo X. (2004) Genetic Analysis of Selected Strains of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica Gmelin*) Using AFLP and Microsatellite Markers. *Mar. Biotechnol.* 6: 575-586.

**-Z-**

- Zarkower D. (2001) Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat. Rev. Genet.* 2, 175-185.
- Zhang Y. (2007) Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*, 8, 108-117.
- Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40-48.

- Zhang W., Li B., Singh R., Narendra U., Zhu L., Weiss M.A. (2006) Regulation of sexual dimorphism: mutational and chemogenetic analysis of the doublesex DM domain. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2), 535-47.
- Zhao Y., Lu H., Yu H., Cheng H. and Zhou R. (2007) Multiple alternative splicing in gonads of chicken DMRT1. *Dev. Genes Evol.* 217 (2), 119-26.
- Zhou X., Li Q., Lu H., Chen H., Guo Y., Cheng H. and Zhou R. (2008) Fish specific duplication of *Dmrt2*: characterization of zebrafish *Dmrt2b*. *Biochimie* 90 (6), 878-87.
- Zhu L., Wilken J., Phillips N.B., Narendra U., Chan G., Stratton S.M., Kent S.B. and Weiss M.A. (2000) Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.* 14, 1750-1764.
- Zuckerlandl E. and Pauling L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8 (2), 357-366.

# Liste des publications et communications personnelles

## Publications scientifiques

- Hanquet-Dufour A.C , Kellner K., Heude C., **Naimi A.**, Mathieu M., Poncet J.M. (2006) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity. *Cryobiology* 53: 28-36.
- **Naimi A.**, Martinez A.S., Specq M.L., Mrac A., Diss B., Mathieu M., Sourdain P., (2009) Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology* 152, 189-196.
- **Naimi A.**, Martinez A.S., Diss B., Mathieu M., Sourdain P., 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 A: Molecular and Integrative Physiology*. (Article soumis).

## Communications en congrès et séminaires

- Dufour A.C., **Naimi A.**, Kellner K., Heude C. et Mathieu M. 19 Mars 2004. Poster : Cryopréservation de cellules de Mollusques. Application à l'étude de la gestion des réserves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* élevée en milieux trophiques riche et pauvre. Journée Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie, CAEN.
- **Naimi A.**, Martinez A.S., Mrac A., Mathieu M. et Sourdain P. 17 Mars 2006. Poster : Etude du déterminisme sexuel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : recherche d'un facteur conservé de la cascade moléculaire. Journée Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie, ROUEN.
- **Naimi A.**, Martinez A.S., Mrac A., Diss B., Mathieu M. et Sourdain P. 6-9 Août 2007. Poster: Expression of *Cg-DMI* in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. 11<sup>th</sup> Meeting of International Society of Invertebrate Reproduction and Development (ICIRD 2007), Panama City, Panama.
- Martinez A.S., **Naimi A.**, Mrac A., Diss B., Mathieu M. et Sourdain P. 6-9 Août 2007. Talk: Identification of factors of the DM family in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. 11<sup>th</sup> Meeting of International Society of Invertebrate Reproduction and Development (ICIRD 2007), Panama City, Panama.
- **Naimi A.**, Martinez A.S., Mrac A., Diss B., Mathieu M. et Sourdain P. 1-4 Septembre 2008. Poster: Identification and expression of *Cg-DMI*, a factor of the DM family, in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Physiomar 08, Brest, France.
- Martinez A.S., **Naimi A.**, Mrac A., Diss B., Mathieu M. et Sourdain P. 1-4 Septembre 2008. Talk: *In situ* expression of *Cg-DMI*, a factor of the DM family, in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Physiomar 08, Brest, France.