

THESE

Présentée par

Mlle Christelle SANTERRE

Et soutenue

le 4 Décembre 2012

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 : sa cascade moléculaire, sa fenêtre
temporelle et ses régulations potentielles chez l'adulte
et lors du développement



MEMBRES du JURY

Mme Sylvie DUFOUR,	Directrice de recherche CNRS, Université de Paris VI	Rapporteur
Mr Jean-François BAROILLER,	Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier	Rapporteur
Mr Pierre BOUDRY,	Directeur de recherche IFREMER, Plouzané	
Mr Michel MATHIEU,	Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	
Mlle Anne-Sophie MARTINEZ,	Maître de conférence, Université de Caen Basse-Normandie	
Mr Pascal SOURDAINE,	Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	Directeur de thèse

Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'école doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE) au laboratoire Biologie des Organismes Marins et des Ecosystèmes associés (BioMEA), FRE3484 CNRS INEE sous la direction du professeur Pascal SOURDAINE et du docteur Anne-Sophie MARTINEZ.



Cette thèse a été financée par une allocation de recherche du Ministère de l'Education Nationale (MESR), par le Conseil Régional de Basse-Normandie, la Société Atlantique de MARiculture (SATMAR), le fond européen pour la pêche, l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) "Gamétogènes" et le projet Européen FP7 "Reproseed".



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse le professeur Pascal Sourdain pour m'avoir permis de mener à bien ce travail, pour sa confiance et la grande liberté de travail qu'il m'a accordée.

Je remercie particulièrement le Docteur Anne-Sophie Martínez pour son encadrement tout au long de ces années de master puis de thèse. Un grand merci pour tes conseils, ta disponibilité, pour ton soutien sans faille dans les bons comme les moins bons moments et pour tout le temps passé à relire ce manuscrit.

J'adresse toute ma gratitude au Docteur Sylvie Dufour et au Docteur Jean-François Baroiller qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi qu'au docteur Pierre Boudry et au Professeur Michel Mathieu qui ont accepté de participer à ce jury de thèse.

Je souhaite également remercier le professeur Pascal Farrel pour son accueil au sein de l'équipe PhyMR.

Je remercie sincèrement les membres du laboratoire BioM&A, professeurs, maîtres de conférences, personnels techniques et administratifs dont le travail quotidien a permis le bon déroulement de ces travaux et particulièrement

Béatrice Adeline qui m'a appris toutes les bases de l'histologie. Merci pour les innombrables coupes et colorations et surtout pour avoir accepté de partager ton savoir-faire avec patience.

Les docteurs Christophe Lelong et Guillaume Rivière pour leurs nombreux conseils et pour leur accueil au sein de la salle de Biologie Moléculaire.

Les docteurs Clothilde Heude et Kristell Kellner pour leurs conseils pour la cytométrie en flux et l'immunohistochimie.

Aude Jouaux et Marie-Pierre Dubos pour leur aide dans l'échantillonnage.

Je souhaite remercier le Dr Benoît Bernay et Marion Berthelot pour leur aide et leurs conseils lors des expérimentations sur la plateforme Proteogen.

Je remercie également Mme Jeanne Mathieu pour son implication dans toutes les démarches administratives.

Je tiens à remercier le Dr René Robert pour m'avoir permis de travailler au sein de la station FREMER d'Argenton pour effectuer mes conditionnements de naissains ainsi qu'à Christian Minguant, Luc Lebrun, Isabelle Queau et Nicolas Marc pour leur aide lors de ce projet.

Merci à Maria, Arnaud et Mathieu, étudiants en licence/maîtrise pour leur travail notamment dans la préparation des échantillons.

Merci à mes collègues (doctorants ou non) pour tous ces bons moments passés ensemble : Adrien (pour avoir accepté de partager parfois le grand chef), Alban (pour tous tes conseils), Alexou (pour les petites attentions à chaque fois que tu venais au bureau), Anne-Flore, Antoine S, Antoine M, Aude, Bertrand, Camille, Cécile, Cécilou (Disney Power), Charles, Elmina, Emilie, Georges (pas si différent que ça), Jéhane, Jérémy (Miaou), Karine, Laetitia, Marie, Martin, Maxine (C'est fini je peux te répondre maintenant), Michael, Nolwenn, Pauline, Rémi, Sami, Stéphanie, Sutin, Thomas (prends bien soin de Katie), Yalérie et j'en oublie sûrement...

Un remerciement spécial à Virginie (pour nos soirées raclette et fondue !) et à Nadège (avec qui je vais partager mes soirées Pizza Mentalist & Cie désormais ?).

A Céline pour son soutien à tout point de vue au cours de ces quatre dernières années. Merci pour ces aprem dissections et ces week-end dilutions. Merci pour toutes les aprem de détente: à la mer, à cheval, au spa... Merci pour les sorties courses et pour tous les repas partagés sauf pour une certaine soirée nutella... Merci pour ton amitié

Un merci à tous mes amis qui m'ont soutenue même si je les ai négligé lors de mon exil caennais, Caro, Cora, Marina. Je compte bien me rattraper ! Merci à Marc pour nos soirées lors de mes travaux à Brest. Un merci particulier à Domi et Marie amies depuis peu pour leur soutien lors de la dernière ligne droite.

Je ne peux terminer ces remerciements sans penser à ma famille pour leur aide lors de ces longues études, promis c'est fini ! Merci à Julien, pour ton soutien ces 7 dernières années, je n'aurai sans doute pas réussi sans toi vivement les 30 ans !

Introduction générale

I. L'huître creuse.....	3
1. Ecologie et Biologie	3
✓ Ecologie : mode de vie et contraintes	3
✓ Biologie	3
2. Importance économique.....	5
3. Importance phylogénétique.....	6
4. Développement et reproduction	8
✓ Développement de l'huître et mise en place de la gonade	8
✓ Reproduction : hermaphrodisme, anatomie de l'aire gonadique et cycle gamétogénétique.....	10
II. Les modes de déterminisme sexuel dans le règne animal.....	12
1. Le déterminisme sexuel chez les vertébrés	12
✓ Le déterminisme sexuel génétique (GSD).....	13
✓ Le déterminisme sexuel environnemental (ESD et GSD+ESD).....	15
2. Le déterminisme sexuel chez les invertébrés	17
✓ Le déterminisme sexuel dose-dépendant	17
✓ Le déterminisme sexuel à un locus complémentaire	19
✓ Le déterminisme sexuel environnemental	19
✓ Le déterminisme sexuel chez les mollusques dont l'huître <i>C. gigas</i>	19
III. Les principaux acteurs du déterminisme sexuel.....	23
1. Les cascades du déterminisme sexuel mâle.....	24
✓ Chez les mammifères.....	24
✓ Chez les autres espèces	28
2. Les cascades du déterminisme sexuel femelle	33
✓ Chez les mammifères.....	33
✓ Chez les autres espèces	38
IV. L'hermaphrodisme	41
1. Généralités	41
2. Données moléculaires	42

V. Régulation de la reproduction et du déterminisme sexuel par les ARN anti-sens naturels (NATs)	45
1. Définitions	45
2. Les NATs liés à la reproduction	46
3. Les NATs liés au déterminisme sexuel	47
VI. Objectifs.....	48

Matériel et Methodes

I. Matériel biologique.....	53
1. Animaux.....	53
2. Prélèvement d'échantillons biologiques.....	55
II. Techniques histologiques	55
1. Préparation et coupe des échantillons biologiques.....	55
2. Coloration au trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968).....	56
III. Analyse de la ploïdie des échantillons	56
IV. Techniques classiques de biologie moléculaire	57
1. Préparation des ARN	57
✓ Extraction des ARN totaux.....	57
✓ Qualité et quantification des ARN	57
✓ Purification des ARN polyadénylés à partir des ARN totaux	58
✓ Traitement à la DNase.....	59
2. Synthèse d'ADN complémentaire par transcription inverse	59
3. Choix des amorces.....	59
4. Réactions de PCR.....	59
5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	60

V. Extension de l'ADNc par RACE-PCR.....	62
1. Synthèse du 1 ^{er} brin d'ADNc.....	62
2. Synthèse du 2 ^{ème} brin d'ADN.....	63
3. Ligation des adaptateurs.....	63
4. Amplification par PCR.....	63
VI. Détection de duplex ARN/ARN : <i>RNAse protection-based approach</i>.....	64
VII. Sous-clonage et séquençage.....	66
1. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose.....	66
2. Sous-clonage des fragments d'ADN.....	66
3. Transformation de bactéries électro-compétentes.....	66
4. Extraction de l'ADN plasmidique.....	67
5. Séquençage.....	67
VIII. Analyses informatiques des séquences.....	67
IX. RT-PCR quantitative en temps réel (<i>real time qRT-PCR</i>).....	68
1. Principe.....	68
2. Validation et efficacité des couples d'amorces.....	68
3. Préparation des plaques et amplification.....	70
4. Analyse statistiques des résultats.....	70
X. Hybridation <i>in situ</i>.....	71
1. Synthèse des sondes.....	71
✓ Synthèse des sondes.....	71
✓ Vérification de la spécificité de fixation de l'anticorps à la sonde.....	71
2. Hybridation des sondes et révélation.....	72

XI. Techniques classiques de protéomique utilisées pour les résultats en annexes.....74

1. Immunohistochimie en fluorescence indirecte (Cg- β -caténine)	74
2. Immunohistochimie classique (Cg-Foxl2)	75
3. <i>Western Blotting</i> , immunoprécipitation et spectrométrie de masse en tandem MS/MS (Cg-Foxl2)	76
✓ <i>Western Blotting</i>	76
✓ Immunoprécipitation	77
✓ Spectrométrie de masse en tandem MS/MS	78

XII. Observations et prises de vues78

Chapitre 1 : Sélection des acteurs du déterminisme sexuel les plus pertinents à étudier
--

I. Comparaison des profils d'expressions par puces à ADN et en PCR en temps réel.....81

II. Sélection de nouveaux acteurs potentiels du déterminisme sexuel chez l'huître83

1. ESTs de Wnt-4, GATA-4 et Fem	84
2. ESTs de SoxB1 et SoxE	86
3. ESTs de Dax-1 et de la β -caténine	87

Chapitre 2 : Cg-SoxE et Cg-β-caténine, deux nouveaux acteurs du déterminisme sexuel chez l'huître ?

I. Introduction91

1. Objectifs de l'étude	91
2. Résultats	91

II. Publication93

III. Annexe : Expression de la protéine de la Cg- β -caténine chez l'adulte par immunofluorescence.....129

Chapitre 3 : Une régulation épigénétique du sexe chez l'huître ? Caractérisation d'un ARN anti-sens naturel de Cg-Foxl2

I. Introduction	135
1. Objectifs de l'étude	135
2. Résultats	135
II. Publication	138
III. Annexe : Expression de la protéine de Cg-Foxl2 chez l'adulte	151

Chapitre 4 : Une influence de l'environnement sur le déterminisme sexuel de l'huître ? Effet de la température lors de la première mise en place gonadique chez le naissain

I. Introduction	155
1. Objectifs de l'étude	155
2. Résultats	155
II. Publication	157

Discussion générale & Perspectives

I. Cascade de la différenciation gonadique / du déterminisme sexuel mâle et femelle chez l'huître adulte	189
1. Modèle proposé	189
2. Comment valider ce modèle ?	191
II. Cascade de la différenciation gonadique / du déterminisme sexuel mâle et femelle au cours du développement de <i>C. gigas</i>	194
1. Modèle proposé	194
2. Comment valider ce modèle ?	195

III. Comment le déterminisme sexuel est-il régulé chez l'huître?196

1. Quels facteurs environnementaux interviennent ? 196
2. Existe-il une influence hormonale ? 198
3. Quelles sont les régulations épigénétiques du sexe ? 198

IV. Comment identifier d'autres facteurs impliqués dans le déterminisme sexuel chez l'huître ?199

Références bibliographiques

Références bibliographiques205

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie générale de <i>Crassostrea gigas</i>	4
Figure 2 : Productions conchylicoles annuelles mondiale et française	5
Figure 3 : Phylogénie des métazoaires détaillant les lophotrochozoaires	7
Figure 4 : Aire gonadique composée d'un tissu de réserve, de canaux collecteurs et de tubules gonadiques, sites de la gamétogenèse	10
Figure 5 : Cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> adulte.....	11
Figure 6 : Chronologie du déterminisme sexuel et de la différenciation gonadique	12
Figure 7 : Modes de déterminisme sexuel retrouvés dans le règne animal.....	13
Figure 8 : Principaux gènes majeurs du déterminisme sexuel identifiés dans le règne animal.	15
Figure 9 : Déterminisme sexuel température-dépendant chez la tortue <i>Trachemys scripta</i> ..	17
Figure 10 : Déterminisme sexuel dose-dépendant chez la drosophile <i>D. melanogaster</i>	18
Figure 11 : Déterminisme du sexe à un seul locus complémentaire chez les hyménoptères.	19
Figure 12 : Modèle du déterminisme sexuel chez l'huître creuse.	21
Figure 13 : Principaux acteurs du déterminisme sexuel ainsi que leur localisation cellulaire chez les mammifères.....	24
Figure 14 : Cascade simplifiée de la différenciation testiculaire chez les mammifères.	25
Figure 15 : Expression spatiale de la protéine Sox9 dans les gonades mâles (A-B) et femelles (C-D) chez le xénope <i>X. tropicalis</i> (A et C) et chez le pleurodèle <i>P. Waltl</i> (B et D)	30
Figure 16 : Expression de l'ARNm de Sox9a et Sox9b dans les gonades mâle (A) et femelle (B) chez le poisson zèbre.	30
Figure 17 : Mab-3 et Dsx, orthologues de Dmrt1 dans les cascades moléculaires du déterminisme sexuel respectivement chez la drosophile et le nématode.....	32
Figure 18 : Cascade simplifiée de la différenciation ovarienne chez les mammifères.	35
Figure 19 : Expression des ARNm de la Rspo1 dans la gonade en développement chez le poisson zèbre femelle (A) et mâle (B)	39
Figure 20 : Expression de la protéine Foxl2 dans l'ovaire adulte du poisson médaka (A) et dans l'ovaire de têtard de la grenouille <i>Rana rugosa</i> (B).....	41

Figure 21 : (A) Structure de l'ovotestis chez le m\u00e9rou <i>Epinephelus merra</i> lors du changement de sexe femelle vers m\u00e2le. (B) Expression de Foxl2 mesur\u00e9e par qPCR lors de ce m\u00eame changement de sexe	44
Figure 22 : Transcrits anti-sens naturels cis- et trans-	45
Figure 23 : Principaux niveaux de r\u00e9gulation par des ARN anti-sens naturels	46
Figure 24 : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) de Foxl2 et Foxl2os dans les cellules de la granulosa chez la souris.....	47
Figure 25 : (A) Vue d'ensemble du syst\u00e8me exp\u00e9rimental d'\u00e9levage \u00e0 flux ouvert de naissain de la station exp\u00e9rimentale IFREMER d'Argenton. (B) Gros plan sur une structure cylindro-conique de 500 ml maintenue \u00e0 25\u00b0C et contenant du naissain \u00e2g\u00e9 de 46 jpf. (C) Photo de lots de naissain \u00e2g\u00e9 de 46 jpf conditionn\u00e9s \u00e0 l'une des quatre temp\u00e9ratures entre 18\u00b0C et 28\u00b0C.	54
Figure 26 : Evaluation de la qualit\u00e9 des ARN.	58
Figure 27 : Principe de la technique de RACE-PCR \u00e0 l'aide du kit <i>Advantage\u2122 cDNA PCR Kit & Polymerase Mix</i> (Clontech\u2122).	62
Figure 28 : Protocole de la d\u00e9tection de duplex ARN/ARN par <i>RNase protection-based approach</i>	65
Figure 29 : (A) Exemple de courbe d'amplification. (B) Courbe d'efficacit\u00e9 d'amplification par qRT-PCR. Un coefficient de corr\u00e9lation (R^2) proche de 1 atteste de l'efficacit\u00e9 d'amplification. (C) D\u00e9riv\u00e9e de la courbe de fusion des amplicons. Elle permet de v\u00e9rifier qu'il y a absence de dim\u00e9risation des amorces.	69
Figure 30 : Photo de l'automate EpiMotion 5070 permettant la pr\u00e9cision de remplissage des plaques de PCR.....	70
Figure 31 : Exemple de <i>Dot Blot</i> des sondes pour l'hybridation <i>in situ</i>	72
Figure 32 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i>	73
Figure 33 : Principe de l'immunohistochimie en fluorescence indirecte.....	74
Figure 34 : Expression gonadique de Cg-Foxl2 (A) et de Cg-DMI (B) par puces \u00e0 ADN sur un cycle gam\u00e9tog\u00e9n\u00e9tique adulte.....	82
Figure 35 : Expression gonadique de Cg-DMI par PCR en temps r\u00e9el chez les stades 0, III m\u00e2le et III femelle.....	83
Figure 36 : Expressions gonadiques de Wnt-4 (A), de GATA-4 (B) et de 7 EST de Fem (C) par puces \u00e0 ADN sur un cycle gam\u00e9tog\u00e9n\u00e9tique adulte	84

Figure 37 : Expressions gonadiques de SoxE (A) et de SoxB1 (B) par puces à ADN sur un cycle gamétogénétique adulte.....	86
Figure 38 : Expressions gonadiques de Dax-1 (A) et de la β -caténine (B) par puces à ADN sur un cycle gamétogénétique adulte.....	87
Figure 39 : Comparaison et identités de séquences entre la protéine Cg- β -caténine et l'épitope reconnu par l'anticorps anti- β -caténine humaine.....	129
Figure 40 : Expression de la Cg- β -caténine dans les tubules gonadiques de l'huître chez la femelle (A) et chez le mâle (B) au stade II.....	130
Figure 41 : Expression de Cg-Foxl2 en <i>Western Blotting</i>	152
Figure 42 : Expression de Cg-Foxl2 dans l'aire gonadique d'huîtres femelles en stade III en immunohistochimie.	152
Figure 43 : Modèle de cascade du déterminisme sexuel chez l'adulte.	191
Figure 44 : Genotypes possibles associés aux quatre phénotypes gamétogénétiques définis chez les huîtres triploïdes.....	192
Figure 45 : Expression par puces à ADN de la Cg- β -caténine pour les quatre phénotypes gamétogénétiques définis chez les huîtres triploïdes.....	193
Figure 46 : Schéma de cascade du déterminisme sexuel lors de la première différenciation gonadique chez le naissain élevé à 18°C dans des conditions optimales de nourriture.	195

Liste des tableaux

Tableau 1 : Développement et mise en place de la gonade chez l'huître élevée en nurserie à 25°C pour les stades larvaires puis à 18°C après la métamorphose	9
Tableau 2 : Profils des sexes selon la température environnementale au cours du développement chez des espèces dont le déterminisme sexuel est température-dépendant.	16
Tableau 3 : Expression temporelle et/ou cellulaire de Sox9 chez des vertébrés non-mammaliens qui présentent des modes de déterminisme sexuel GSD, TSD ou GSD+TSD.....	29
Tableau 4 : Expression temporelle et/ou cellulaire de Foxl2 chez des vertébrés non-mammaliens qui présentent des modes de déterminisme sexuel GSD, TSD ou GSD+TSD.....	40
Tableau 5 : Facteurs moléculaires de la différenciation gonadique ou du déterminisme sexuel caractérisés chez les poissons hermaphrodites.....	43
Tableau 6 : Organisation des prélèvements pour chaque température de conditionnement.	54
Tableau 7 : Liste et séquences des amorces utilisées	61

Liste des Abréviations

Amh : Hormone anti-müllérienne	Fst : Follistatine
BMP-2 : <i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>	GATA-4 : <i>GATA binding protein 4</i>
Cg-β-caténine : <i>C. gigas</i> β-caténine	GnRH : <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
Cg-Dax-1 : <i>C. gigas</i> Dax-1	GSD : Déterminisme Sexuel Génétique
Cg-DMI : <i>C. gigas</i> DM like	HIS : Hybridation <i>In Situ</i>
Cg-SoxB : <i>C. gigas</i> Sry-box family B	IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Cg-SoxE : <i>C. gigas</i> Sry-box family E	IHC : Immunohistochimie
Cg-Foxl2 : <i>C. gigas</i> Forkhead box L2	M-MLV RT : <i>Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase</i>
CGP/PGC(s) : Cellule(s) Germinale(s) Primordiale(s)	MPT /TPM : Température produisant des mâles
CGS : Cellule(s) Germinale(s) Souche(s)	NAT : <i>Natural Antisense Transcript</i>
CNC : Comité National de la Conchyliculture	Oyvlg : <i>Oyster vasa like gene</i>
Dax-1 : <i>Dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital-critical region of the X chromosome gene 1</i>	PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
DEPC : DiéthylPyroCarbonate	qRT-PCR : <i>quantitative Real Time PCR</i>
Dmrt : <i>Doublesex and mab-3 related transcription factor</i>	RNase free : <i>Ribonucléase free</i>
DM-W : <i>DM-W linked</i>	RNasin : Inhibiteur de RNase
DNase I RQ1 : <i>Desoxyribonuclease I RNA-Qualified I</i>	Rspo1 : <i>R-spondin 1</i>
dNTP : Désoxyribonucléoside tri-phosphate	SDS-PAGE : <i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Dsx : <i>Doublesex</i>	Sf1 : <i>Steroidogenic factor 1</i>
EF1-α : <i>Elongation factor 1-α</i>	Sox : <i>Sry-box</i>
ER : Récepteur aux Estrogènes	Sry : <i>Sex-determining region on Y chromosome</i>
ESD : Déterminisme Sexuel dépendant de l'Environnement	StAR : <i>Steroidogenic Acute Regulatory protein</i>
EST : <i>Expressed Sequence Tag</i>	Sxl : <i>Sex-Lethal</i>
FAO : <i>Food and Agriculture Organization</i>	TESCO : <i>TEStis-specific enhancer COre</i>
fem : <i>Feminizer</i>	TSD : Déterminisme du Sexe Température-dépendant
Fgf9 : <i>Fibroblast Growth Factor 9</i>	TSP : Période thermosensible
Foxl2 : <i>Forkhead box L2</i>	Tra : <i>Transformer</i>
FPT/TPF : Température produisant des femelles	Wnt : <i>Wingless-related MMTV integration site</i>
	Wt1 : <i>Wilm's tumour 1</i>
	Xol : <i>Xo lethal</i>

Introduction générale

I. L'huître creuse

1. Ecologie et Biologie

✓ **Ecologie : mode de vie et contraintes**

L'huître creuse est un organisme planctonique aux stades embryonnaires et larvaires qui vit fixé sur un substrat toute sa vie adulte. Elle doit donc développer des adaptations pour tolérer les contraintes de son environnement, notamment pour s'assurer une bonne reproduction et survie. Les facteurs abiotiques (température, photopériode, salinité ...) et biotiques (nourriture ...) auxquels est soumise une huître peuvent ainsi varier selon les périodes de l'année, sa localisation sur le littoral, sa position dans la colonne d'eau, sa situation sur l'estran et par conséquent, son temps d'immersion (KORPELAINEN 1990 ; RUESINK *et al.* 2003). De nombreuses études dans des écosystèmes tempérés ont montré que la concentration en plancton avait une influence sur l'effort de reproduction ainsi que sur la qualité des gamètes (ENRIQUEZ-DIAZ *et al.* 2009 ; BERNARD 2011). La température impacte également la reproduction de l'huître notamment le déclenchement de différentes phases du cycle de reproduction : le repos sexuel, la maturation et la ponte (CHAVEZ-VILLALBA *et al.* 2002 ; FABIoux *et al.* 2005 ; BERNARD *et al.* 2011). Ainsi, à des températures basses de 8°C, la maturation des cellules germinales peut avoir lieu avec un allongement de la durée du cycle de 4 mois (FABIoux *et al.* 2005) alors que le déclenchement de la ponte nécessite des températures de 19°C (MANN 1979).

✓ **Biologie**

L'huître est un animal à corps mou recouvert d'une coquille à deux valves asymétriques maintenues par un muscle adducteur (Figure 1). Les organes sont enveloppés dans un manteau dont les deux lobes sont soudés entre eux et qui délimite la cavité palléale. Dans sa partie antérieure, le manteau forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche. Sa fonction première est de sécréter la coquille mais il a aussi, notamment, un rôle dans les fonctions sensorielles et dans le stockage des réserves.

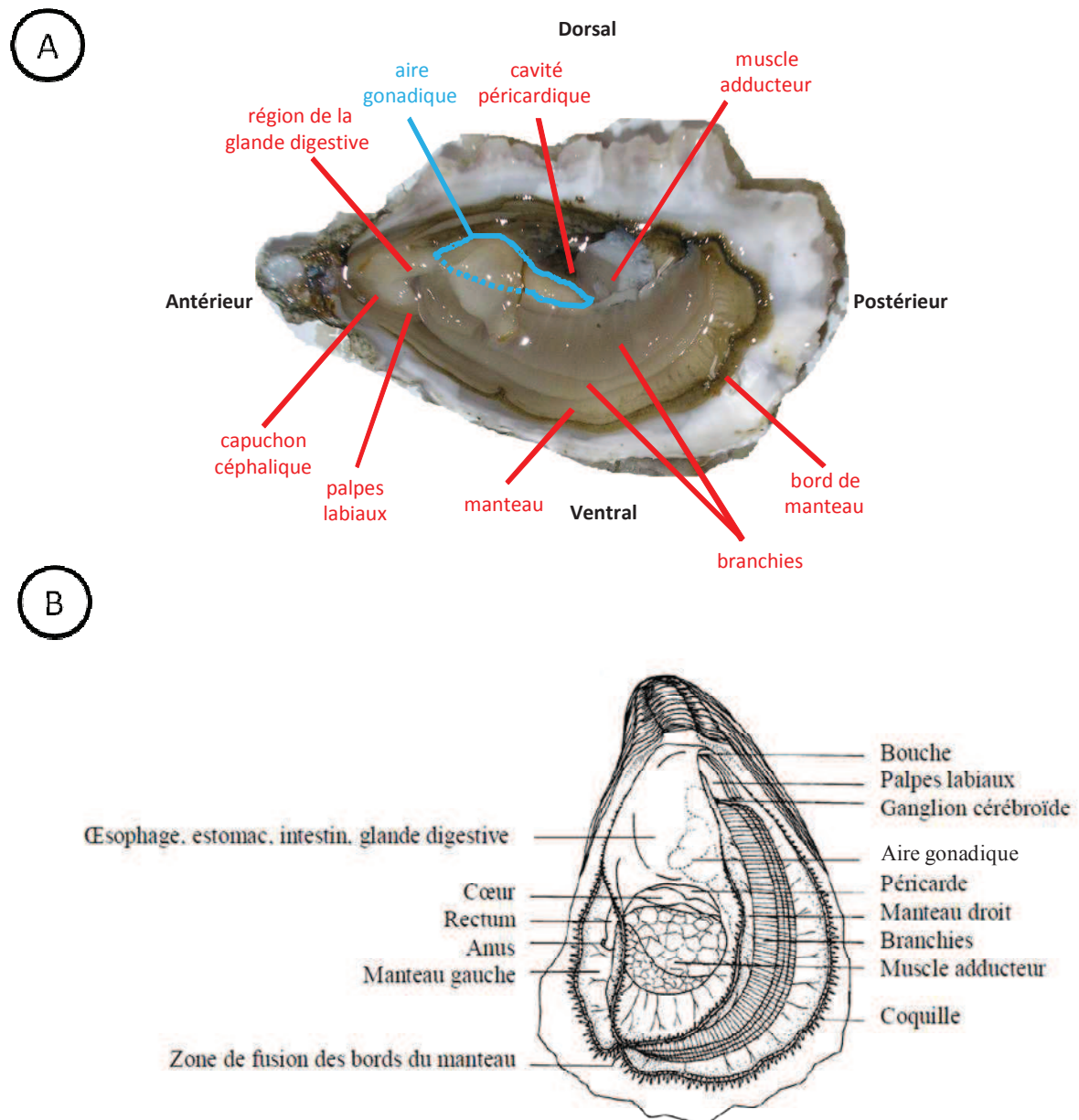


Figure 1 : Anatomie générale de *Crassostrea gigas*.

Photo (A) et dessin (B, d'après GALTISOFF 1964) illustrant l'anatomie de l'huître.

Le système digestif de l'huître est adapté à la consommation de phytoplancton. Il est composé de la bouche, d'un court oesophage, d'un estomac avec une fonction de tri de particules et de digestion extracellulaire mécanique et chimique, ainsi que d'une glande digestive très volumineuse où aura lieu la digestion intracellulaire. Enfin les aliments passent dans l'intestin qui débouche sur l'anus. Les branchies assurent une double fonction de respiration et de nutrition. Elles permettent à l'animal de retenir les particules alimentaires afin de les transporter jusqu'aux palpes labiaux puis à la bouche. Le système circulatoire est partiellement clos et composé de vaisseaux et de sinus coelomiques. Le cœur, situé près du

muscle adducteur, comporte un ventricule et deux oreillettes. Le ventricule envoie l'hémolymphe dans les organes par l'intermédiaire des artères et des artérolles puis l'hémolymphe est épurée par le rein avant de repartir vers les oreillettes. Le système nerveux est réduit à une paire de ganglions cérébroïdes et à une paire de viscères.

2. Importance économique

L'huître *Crassostrea gigas* est le mollusque le plus cultivé au monde avec une production mondiale annuelle de 4,2 millions de tonnes en 2009 (Figure 2A, source: FAO 2011). Originnaire du Japon, elle a été introduite en France à partir de 1971 après les mortalités observées de l'huître endémique *Ostrea edulis* et de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (GRIZEL 1985 ; GRIZEL et HERAL 1991). Elle est depuis cultivée quasiment en monoculture (95 %), ce qui implique une grande vulnérabilité de l'ostréiculture face à un nouveau cas d'épizootie.

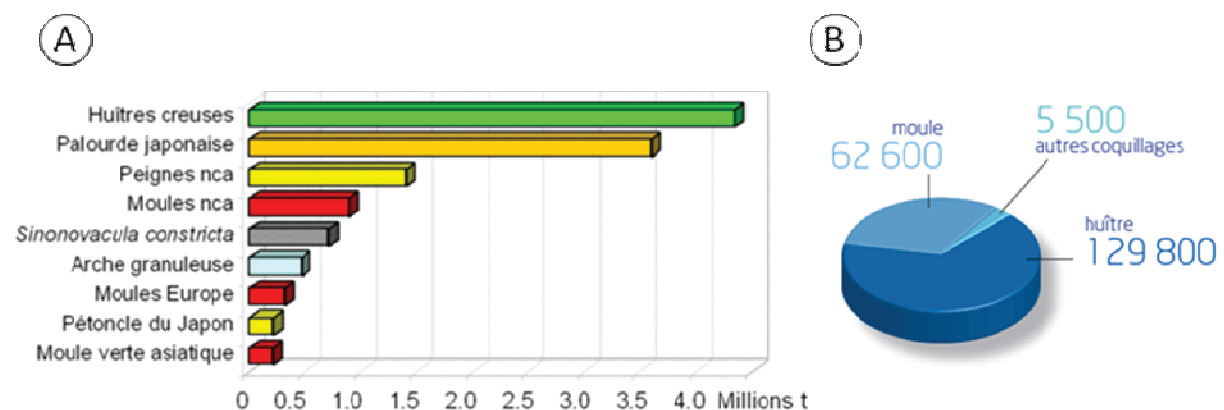


Figure 2 : Productions conchylicoles annuelles mondiale et française.

(A) Production mondiale. Les 9 espèces citées assurent 85 % de la production mondiale et les huîtres creuses représentent un tiers de la production conchylicole (Source: FAO 2011, données 2010). (B) Production Française. Annuellement, 129 800 tonnes d'huîtres sont produites en France (Source: CNC 2011, données 2009).

En dehors des pays d'origine de *Crassostrea gigas*, la France est le principal pays de production dans le monde avec presque 130 000 tonnes vendues en 2009 (Figure 2B, source: CNC 2011). L'ostréiculture est la première activité aquacole tant en chiffre d'affaires qu'en emplois dans de nombreuses régions littorales françaises. La Basse-Normandie est la troisième région française de production avec 27 000 tonnes d'huîtres (source: CNC 2011). L'importance économique de cette espèce nécessite donc une bonne maîtrise de sa

production en masse. Cela implique un approvisionnement suffisant des ostréiculteurs en naissain. Le captage dans le milieu naturel étant irrégulier d'une année à l'autre, le naissain de captage laisse de plus en plus la place à du naissain produit en éclosion. L'approvisionnement de la production ostréicole française repose selon les années pour 20 ou 30% sur la production de naissain en éclosion (Source: IFREMER, 2011). Pour satisfaire la demande des ostréiculteurs, les éclosiers doivent donc non seulement maîtriser leurs stocks de géniteurs mâles et femelles mais aussi améliorer la qualité du naissain qui présente des mortalités élevées lors du développement de sa gonade. Il faut pour cela mieux comprendre la physiologie de la reproduction de cette espèce, notamment son déterminisme sexuel, tant au cours du développement que chez l'adulte.

3. Importance phylogénétique

L'analyse des ARNr 18S et 28S a permis depuis quelques années de préciser les relations existant entre les différents phyla, auparavant essentiellement basées sur les similarités morphologiques. Ainsi, deux grands clades se distinguent au sein des bilatériens, les deutérostomiens et les protostomiens regroupant les ecdyzoaires et les lophotrochozoaires. L'huître creuse se classe parmi les lophotrochozoaires caractérisés par la présence d'un stade larvaire nommé trochophore possédant une couronne de cils autour de la bouche nommée lophophore. Des études récentes (PAPS *et al.* 2009) ont permis d'affiner la phylogénie des lophotrochozoaires (Figure 3). Ainsi les lophotrochozoaires *sensu stricto* peuvent être divisés en 2 clades. Les mollusques sont classés dans le premier qui regroupe des phyla à clivage radial (les brachiozoaires) et des phyla à clivage spiral (les annélides, les siponcles, les échiuriens et les németes). Le second clade regroupe les bryozoaires, les cyclophores, les entoproctes et les plathelminthes.

Contrairement aux ecdyzoaires qui font l'objet de nombreuses études, notamment sur les organismes modèles *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, peu de connaissances sont disponibles chez les lophotrochozoaires en général et les mollusques en particulier, qui ne disposent pas encore d'organismes modèles. Pourtant l'embranchement des mollusques est l'un des plus importants du règne animal, après les arthropodes, en termes de diversité morphologique et physiologique ainsi qu'en nombre d'espèces (environ 117 000). Ainsi de par sa position phylogénétique, la récente caractérisation de son génome

(ZHANG *et al.* 2012) mais aussi son mode de reproduction hermaphrodite et, *Crassostrea gigas* représente un organisme d'intérêt pour enrichir la phylogénie moléculaire du déterminisme sexuel et la génomique comparée de la reproduction.

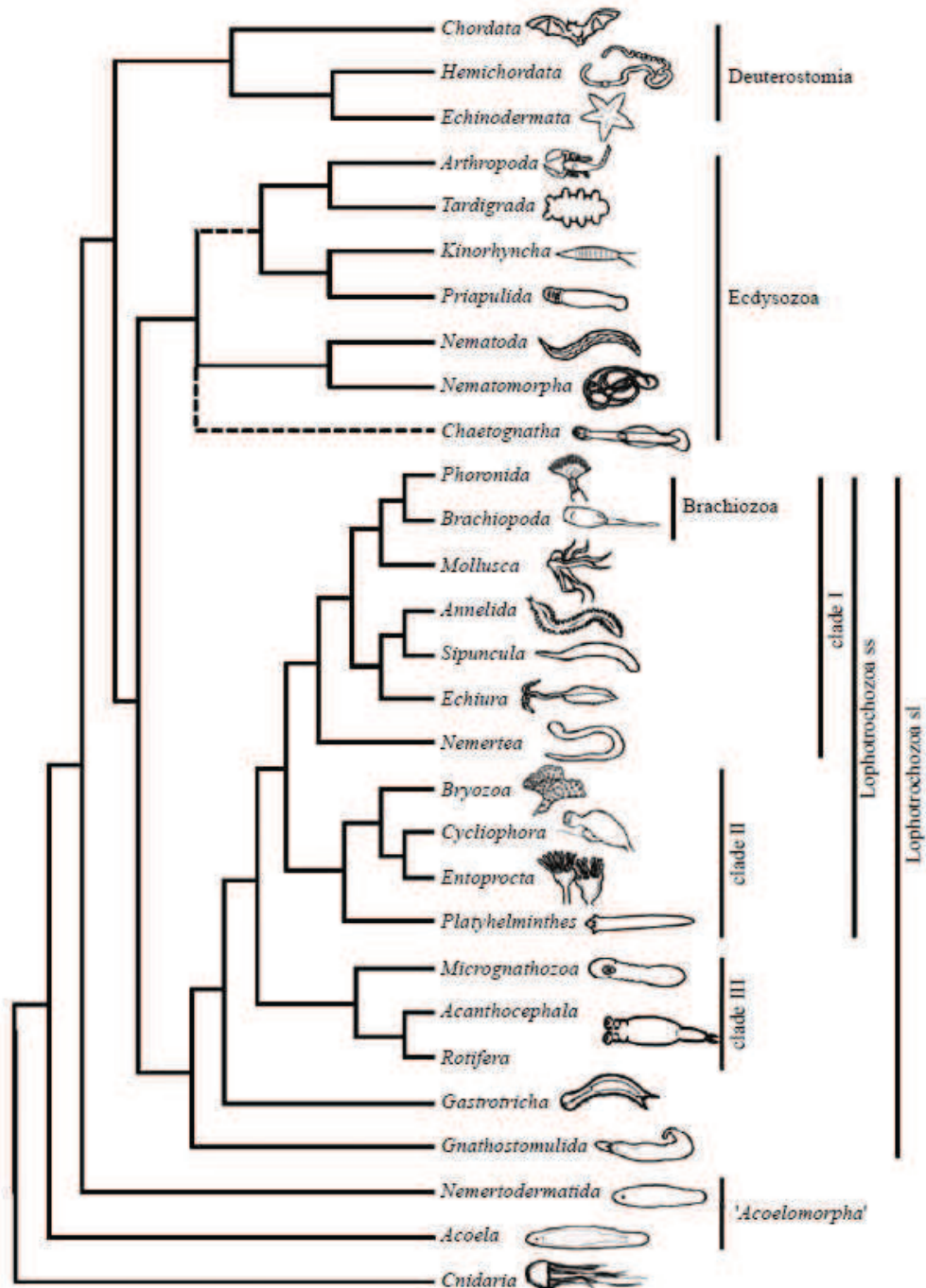


Figure 3 : Phylogénie des métazoaires détaillant les lophotrochozoaires.

Ss : *Sensu stricto* ; Sl : *Sensu lato* (d'après PAPS *et al.* 2009).

4. Développement et reproduction

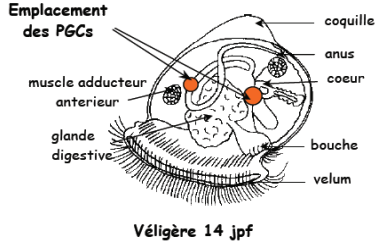
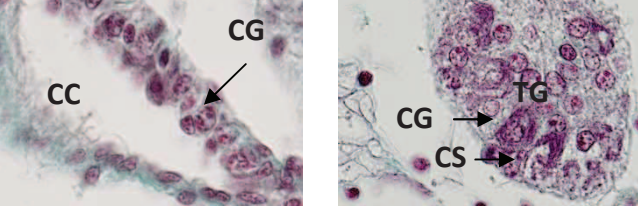
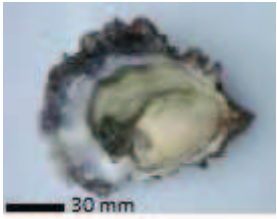
✓ Développement de l'huître et mise en place de la gonade

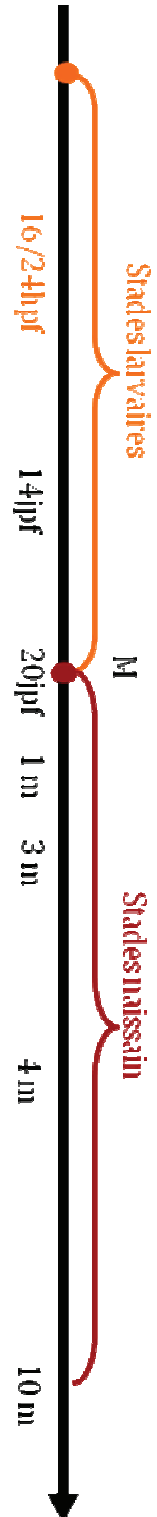
Chez l'huître, la fécondation est externe et le développement post-embryonnaire se poursuit par une phase larvaire planctonique. Vingt-quatre heures après la fécondation, la larve de type trochophore devient une larve veligère D dénommée ainsi à cause de la forme de sa coquille (Tableau 1). A ce stade, la larve présente aussi un vélum qui sert à la nutrition et à la locomotion. Lorsque la larve atteint 250 μm , un organe photosensible appelé 'œil' apparaît et elle est alors nommée larve véligère oeuillée. Au stade pédiveligère, à environ 15 jours post-fécondation (jpf) à 25°C, apparaît un pied qui permet une fixation au substrat et donc le début de la vie benthique de l'huître. A 20 jpf a lieu la métamorphose et le plan d'organisation du jeune naissain est mis en place.

La première mise en place de la gonade et sa différenciation ont lieu au cours de la première année de vie des huîtres, selon une cinétique influencée par les conditions d'élevage. Malgré le peu de données actuellement disponibles, la caractérisation chez l'huître du gène *Oyvlg* (*Oyster vasa-like gene*) a permis de disposer d'un marqueur germinal et de préciser ainsi les événements précoces de la mise en place gonadique au cours du développement embryonnaire et larvaire (FABIOUX *et al.* 2004a ; b). La localisation de l'ARNm d'*Oyvlg* de l'ovocyte à la larve véligère suggère ainsi la présence de cellules germinales primordiales (CGPs) au stade gastrula puis leur migration le long de la masse viscérale. Au stade larve véligère, les CGPs sont présentes de part et d'autre de la glande digestive. Chez le naissain, il n'existe actuellement aucune donnée expérimentale sur la migration et la différenciation des CGPs en cellules germinales souches (CGS). Ainsi, au stade juvénile, seuls quelques travaux anciens (GALTSOFF 1964 ; TARDY 1970 ; LUBET 1976 ; LUBET *et al.* 1976) et une thèse (FABIOUX 2004) mentionnent qu'un ou deux groupe(s) de CGPs serai(en)t localisé(s) dans la zone péricardique et se différencieraient en CGSs avant le premier cycle de reproduction. Des cellules germinales seraient visibles dans les canaux collecteurs et tubules gonadiques dès le stade naissain âgé de 3-4 mois à 18°C et nourri *ad libitum* (NAIMI *et al.* 2009b). La première maturité sexuelle est observée vers 10 mois d'âge pour des huîtres élevées en nurserie ou en claires ostréicoles.

Tableau 1 : Développement et mise en place de la gonade chez l'huître élevée en nurserie à 25°C pour les stades larvaires puis à 18°C après la métamorphose.

(CGPs/PGCs: cellules germinales primordiales ; h/jpf: heure/jour post-fécondation ; M : métamorphose ; m : mois).

Âge	Taille	Description
16-24 hpf	50-60 μm	Larve trochophore. Apparition de cils. Vie pélagique en pleine mer.
24 hpf-14 jpf	70-250 μm	<p>Larve véligère. Apparition de la future coquille et d'un vélum permettant le déplacement. Cellules germinales primordiales (PGCs) réparties en deux masses de part et d'autre de la glande digestive (FABIOUX <i>et al.</i> 2004b). Apparition d'un organe photosensible appelé oeil.</p> 
14-20 jpf	250-700 μm	Larve pédivéligère. Apparition d'un pied.
20 jpf	700 μm -1 mm	Métamorphose. Fixation sur le substrat. Transformation en naissain.
1-3 mois	≈ 2 mm	Naissain. Migration des CGPs vers les canaux collecteurs et différenciation en CGSs.
3-4 mois	3-4 mm	<p>Naissain. Formation des tubules gonadiques. Apparition des cellules germinales (CG) et des cellules somatiques (CS) au sein des canaux collecteurs (CC) et des tubules gonadiques (TG) (NAIMI <i>et al.</i> 2009b).</p> 
≈ 10 mois	≈ 70 mm	<p>Naissain mature</p>  <p>(DEGREMONT, 2003)</p>



✓ **Reproduction : hermaphrodisme, anatomie de l'aire gonadique et cycle gamétogénétique**

L'huître creuse est un hermaphrodite successif irrégulier à tendance protandre ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors des premières saisons de reproduction puis qu'elle change de sexe de manière irrégulière (Guo *et al.* 1998). Une faible proportion d'individus hermaphrodites simultanés (0,8%) est également observée dans les populations naturelles de *C. gigas* (STEELE et MULCAHY 1999).

L'aire gonadique se développe autour de la glande digestive et est composée de deux compartiments imbriqués, les tubules gonadiques et le tissu de réserve (Figures 4A et B). Les tubules gonadiques sont délimités par les cellules myoépithéliales et contiennent les cellules de la lignée germinale et les cellules somatiques associées (Figure 4A et B) (FRANCO *et al.* 2008, 2011b). Ils s'ouvrent sur les canaux collecteurs (Figure 4A) bordés par un épithélium cilié sur leur face externe et un épithélium germinatif sur leur face interne. Ces canaux se prolongent par des gonoductes situés entre le manteau et l'aire gonadique et qui convergent vers un gonopore situé en arrière du muscle adducteur (GALTSOFF 1964). Le tissu de réserve (Figure 4A et B) est constitué de cellules vésiculeuses et de lacunes hémolymphatiques. Au cours de la gamétogenèse, les tubules gonadiques se développent au dépend de ce tissu (HEUDE-BERTHELIN *et al.* 2001).

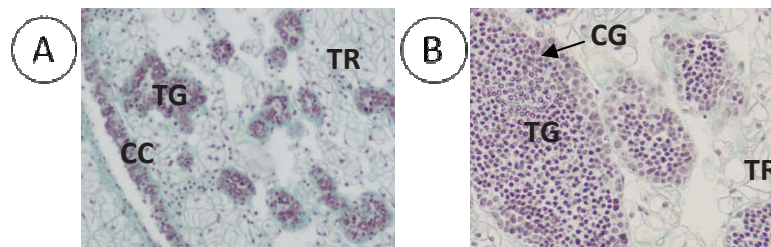


Figure 4 : Aire gonadique composée d'un tissu de réserve, de canaux collecteurs et de tubules gonadiques, sites de la gamétogenèse.

CC : canal collecteur ; CG : cellules germinales ; TG : tubules gonadiques ; TR: tissu de réserve. (A) stade précoce. (B) stade tardif.

Le cycle de reproduction de *C. gigas* suit un rythme saisonnier annuel en 4 phases (HEUDE-BERTHELIN *et al.* 2001) (Figure 5). Au stade 0 de repos sexuel, l'aire gonadique est composée de peu de tubules gonadiques enchâssés dans du tissu de réserve en reconstruction. Ils contiennent quelques cellules germinales souches et des cellules somatiques. Au stade I, les tubules sont bien développés, les gonies prolifèrent et le sexe devient identifiable à la fin du stade. La méiose et la maturation des cellules germinales ont

lieu au stade II. Les tubules gonadiques sont alors bien développés et contiennent, chez les mâles des spermatogonies, des spermatocytes, des spermatides et quelques spermatozoïdes. Chez les femelles, ils contiennent des ovogonies, des ovocytes en pré-vitellogenèse et en vitellogenèse et quelques ovocytes matures. Le stade III correspond chez les deux sexes à un stade de maturité sexuelle (IIIA). Les tubules sont alors majoritaires au sein de l'aire gonadique et ne contiennent pratiquement que des gamètes matures, des spermatozoïdes chez les mâles et des ovocytes chez les femelles. C'est également à ce stade qu'a lieu l'émission des gamètes (IIIB) lors des pontes qui peuvent être totales ou partielles, notamment dans les régions où la température est plus froide comme en Normandie (ENRIQUEZ-DIAZ *et al.* 2009). Les gamètes résiduels sont ensuite lysés par des hémocytes (IIID). Les réserves de l'huître sont reconstituées à l'automne, avant la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction.

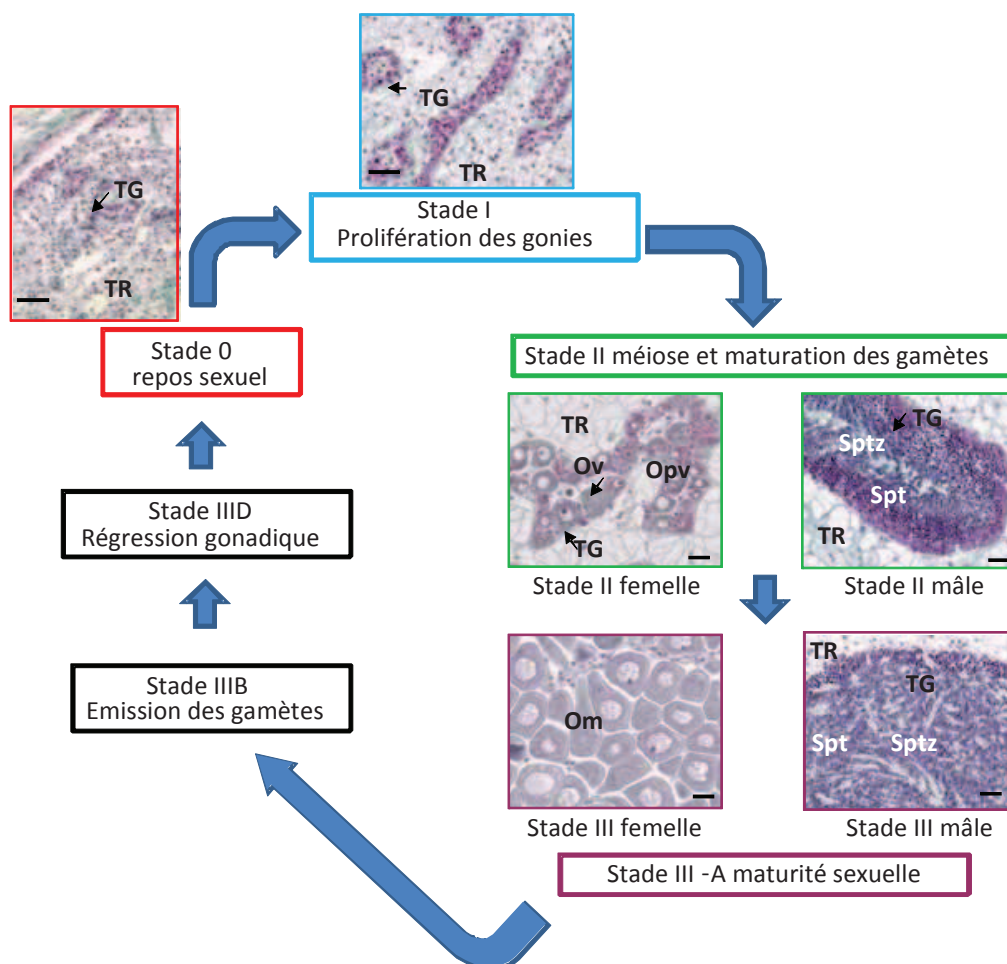


Figure 5 : Cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* adulte.

Om : ovocyte mature ; Opv : ovocyte en pré-vitellogenèse ; Ov : ovocyte en vitellogenèse ; Spt : spermatide ; Sptz : spermatozoïdes TG : tubule gonadique ; TR : tissu de réserve. Barres d'échelles: 20 μ m.

II. Les modes de déterminisme sexuel dans le règne animal

Le déterminisme du sexe correspond à la période critique qui permet l'engagement de la gonade indifférenciée dans une voie de différenciation aboutissant à la formation d'un testicule ou d'un ovaire (Figure 6). Cet engagement a lieu sous l'action d'un gène majeur et/ou de l'environnement. Ensuite, malgré cet engagement, le sexe gonadique reste encore labile un moment. La différenciation gonadique est alors sous le contrôle de gènes secondaires qui peuvent être régulés de façon à poursuivre la différenciation ou induire sa réversion. Passé ce stade réversible, aucune réversion sexuelle n'est possible sans entraîner une stérilité. Cette différenciation s'achève avec l'établissement d'un dimorphisme gonadique définitif et l'acquisition de la capacité reproductive (GEORGES *et al.* 2010).

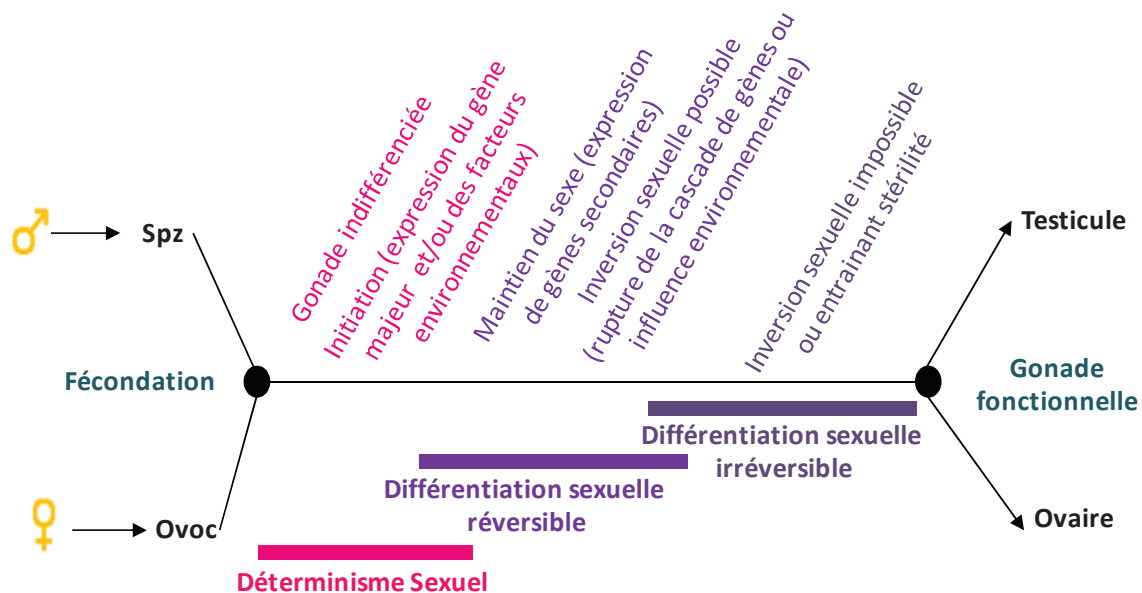


Figure 6 : Chronologie du déterminisme sexuel et de la différenciation gonadique.

1. Le déterminisme sexuel chez les vertébrés

Les modes de déterminisme sexuel sont variables entre les différents phyla et au sein d'un même phylum comme illustré, par exemple, pour les vertébrés sur la Figure 7 (GAMBLE et ZARKOWER 2012).

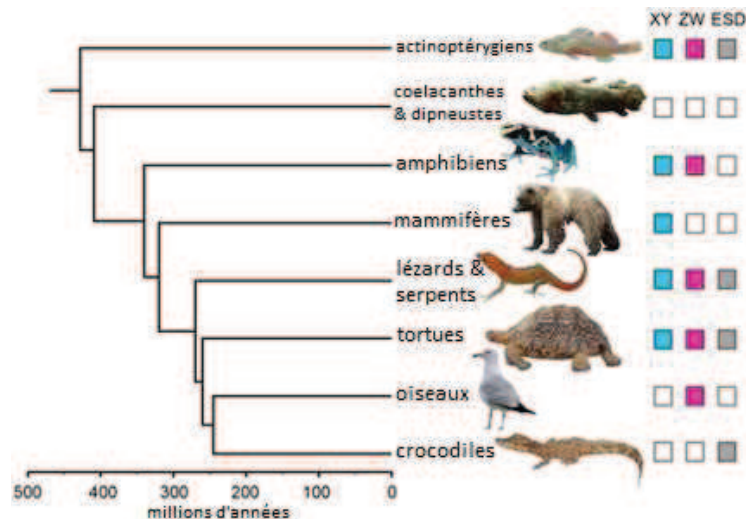


Figure 7 : Modes de déterminisme sexuel retrouvés dans le règne animal

ESD: Déterminisme Sexuel dépendant de l'Environnement. XY et ZW : Déterminisme sexuel génétique (modifié d'après GAMBLE et ZARKOWER 2012).

Ainsi, chez de nombreuses espèces de vertébrés, le sexe est déterminé par la présence de chromosomes sexuels, X, Y, Z et/ou W. On parle alors de déterminisme sexuel génétique (GSD). Associée ou non au déterminisme génétique, la détermination du sexe peut être influencée par l'environnement. On parle alors de déterminisme sexuel environnemental (ESD) ou de déterminisme sexuel génétique et environnemental (GSD+ESD).

✓ Le déterminisme sexuel génétique (GSD)

Chez de nombreuses espèces de vertébrés, le sexe est déterminé par la présence de chromosomes sexuels : on distingue l'hétérogamétie mâle (XX/XY) retrouvée notamment chez les mammifères ou l'hétérogamétie femelle (ZZ/ZW) retrouvée chez les oiseaux. Certains actinoptérygiens présentent même un déterminisme sexuel avec trois chromosomes X, W et Y (VEITH *et al.* 2003). Les individus d'un même phylum peuvent également présenter des modes de détermination sexuelle différents. C'est notamment le cas des amphibiens qui peuvent présenter un déterminisme sexuel ZZ/ZW chez *Xenopus tropicalis* et de type XX/XY chez *Rana rugosa* (NAKAMURA 2009). Certains lézards comme *Bassiana duperreyi* (QUINN *et al.* 2009) et quelques rares tortues comme *Chelodina longicollis* (EZAZ *et al.* 2006) possèdent un déterminisme sexuel de type XX/XY alors que certains serpents comme *Thamnophis sirtalis* ou *Daboia russellii* (MODI et CREWS 2005) et lézards comme *Pogona vitticeps* (EZAZ *et al.* 2005) en ont un de type ZZ/ZW. La même diversité est

retrouvée chez les poissons téléostéens avec parfois un déterminisme sexuel différent au sein même d'un genre. Ainsi, les poissons du genre *Oryzias* présentent un déterminisme sexuel de type XX/XY chez les espèces *dancena* et *latipes* et ZZ/ZW chez l'espèce *hubbsi* (TAKEHANA *et al.* 2007).

Chez tous ces vertébrés, le déterminisme sexuel serait sous contrôle d'un gène dominant qui n'est pas nécessairement porté par le chromosome en singulet et qui initierait la différenciation gonadique (MATSON et ZARKOWER 2012) chez de nombreuses espèces. Chez les mammifères (Figure 8A), il s'agit du gène *Sry* (*Sex-determining Region on Y chromosome*) qui code un facteur de transcription qui entraîne la différenciation des gonades embryonnaires en testicules (KOOPMAN *et al.* 1991). Chez le médaka *Oryzias latipes* (Figure 8B), poisson gonochorique dont les mâles sont XY, le gène majeur du déterminisme sexuel mâle serait *Dmrt1bY* (*Double sex and mab-3 related transcription factor 1b on chromosome Y*) également appelé DMY. Ce gène code un facteur de transcription, membre de la famille des facteurs à domaine DM. Cette espèce présente également un autre facteur, *Dmrt1* (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*), initialement identifié chez la drosophile et le nématode sous les noms respectifs *Dsx* (*Double-sex*) et *Mab-3* (*Male abnormal family number 3*) et découvert par homologie chez l'homme (RAYMOND *et al.* 1998). Chez le médaka, *Dmrt1* est exprimé après la différenciation testiculaire et aurait un rôle plus tardif. Chez le poulet (Figure 8C), le gène *Dmrt1* porté par le chromosome Z serait le facteur déterminant mâle avec un effet dose-dépendant. Lorsqu'il est présent en double exemplaire chez les mâles ZZ, son niveau d'expression est alors suffisant pour induire une différenciation testiculaire. En simple exemplaire chez les femelles ZW, son niveau d'expression ne permet pas d'inhiber la différenciation ovarienne (SMITH *et al.* 2009). Chez l'amphibien *Xenopus laevis* (Figure 8D), dont la détermination du sexe est également du type ZZ/ZW, *Dmrt1*, porté par le chromosome Z serait responsable de la différenciation testiculaire, alors que *DM-W* (*W-linked*), serait responsable de la différenciation ovarienne (YOSHIMOTO et ITO 2011). Toutes ces études chez des non-mammaliens suggèrent un rôle conservé de *Dmrt1* dans l'initiation de la différenciation testiculaire (MATSUDA *et al.* 2007) mais également dans le développement du testicule. D'ailleurs *Dmrt1* et ses orthologues sont à l'heure actuelle les seuls facteurs du déterminisme sexuel conservés des invertébrés aux vertébrés.

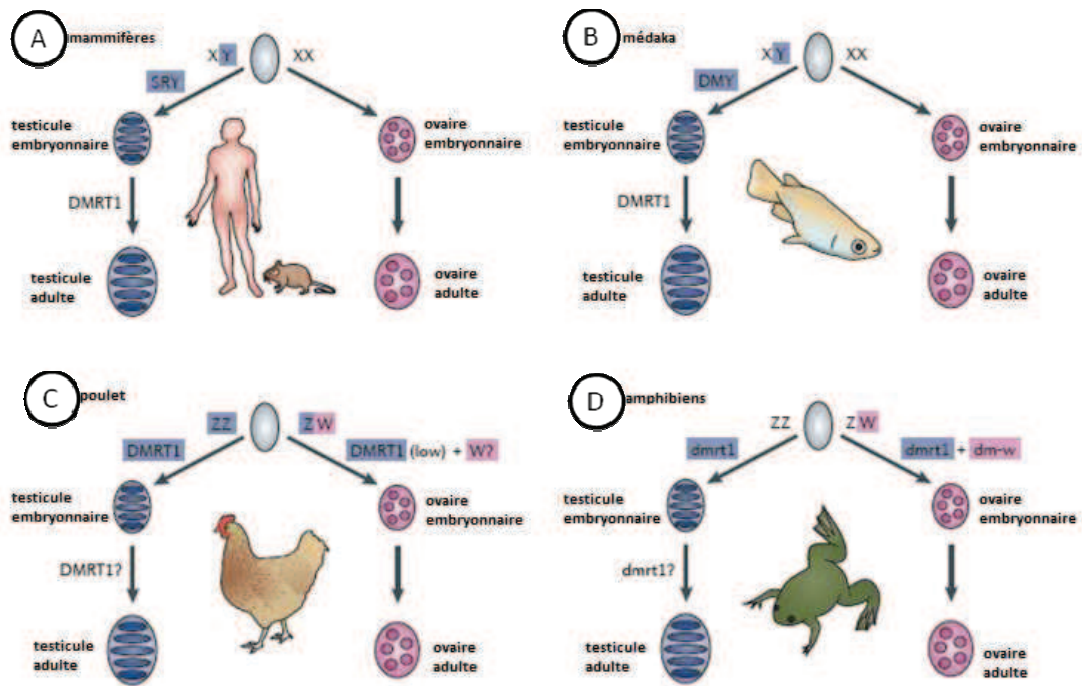


Figure 8 : Principaux gènes majeurs du déterminisme sexuel identifiés dans le règne animal.

(A) mammifères. (B) médaka. (C) poulet. (D) amphibiens (modifié d'après MATSON et ZARKOWER 2012).

Il existerait néanmoins, en plus de Sry et de Dmrt1, d'autres gènes majeurs du déterminisme sexuel au sein du règne animal, notamment parmi les TGF β , comme cela a été récemment mentionné chez les poissons. Ainsi Gsdf^Y (*Gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome*) aurait supplanté DMY en tant que gène majeur chez *Oryzias luzonensis* (MYOSHO *et al.* 2012). Une copie de l'Amh (*Hormone anti-müllérienne*) présente uniquement chez les individus XY jouerait ce rôle chez le "pejerrey" *Odontesthes hatcheri* (HATTORI *et al.* 2012). Chez la truite, le gène majeur serait sdY (*sexually dimorphic on the Y chromosome*) qui ne présente aucune homologie avec des gènes connus du déterminisme sexuel (YANO *et al.* 2012).

✓ Le déterminisme sexuel environnemental (ESD et GSD+ESD)

Contrairement aux espèces présentant un déterminisme sexuel purement génétique, peu de données sont actuellement disponibles à propos des mécanismes moléculaires impliqués dans le déterminisme sexuel environnemental (ESD) ou le déterminisme sexuel combiné (GSD+ESD) (KATO *et al.* 2011). Ainsi, pour ce dernier, aucun gène majeur n'a été identifié (RADDER *et al.* 2008).

Bien que le système GSD soit le plus fréquemment retrouvé chez les animaux, le système ESD est très répandu dans divers groupes d'invertébrés comme les rotifères, les nématodes, les crustacés, les mollusques ou encore les insectes, mais aussi parmi les vertébrés comme les reptiles ou les poissons (KORPELAINEN 1990). Les principaux facteurs alors impliqués sont la température, la nutrition, le pH ou encore la densité de la population. Ainsi, par exemple chez certaines tortues, certains lézards et chez tous les crocodiliens et sphénodons, c'est uniquement la température d'incubation des oeufs qui détermine le futur sexe de l'animal (BERGERON *et al.* 1998). Pour le déterminisme sexuel GSD+ESD, la température se superpose à un déterminisme génétique et provoque l'inversion sexuelle de l'un des deux sexes. C'est le cas par exemple chez quelques amphibiens comme *Triturus cristatus* ou *Pleurodeles waltl* (EGGERT 2004) et chez de nombreux poissons (BAROILLER et D'COTTA 2001). Chez ces derniers, le déterminisme sexuel, bien documenté, serait également déterminé par des facteurs sociaux comme la densité de population.

Dans les cas où la température influence le sexe [on parle de sexe dépendant de la température (TSD)], ses effets sont différents selon les espèces (Tableau 2). Ainsi, chez certaines, une élévation de la température conduit à une féminisation du sexe (profil Ia) alors que chez d'autres elle induira une masculinisation (profil Ib). Chez d'autres encore, les profils sont plus atypiques (II et III), avec des femelles aux températures extrêmes et des mâles aux températures intermédiaires (II) ou avec deux alternances de sexes lorsque la température augmente (III).

Tableau 2 : Profils des sexes selon la température environnementale au cours du développement chez des espèces dont le déterminisme sexuel est température-dépendant. M : mâle ; F : femelle.

Profils des sexes Faible T (°C) → Forte T (°C)	Animaux	Références
Ia: M→F	Quelques tortues La plupart des lézards	(MATSUMOTO et CREWS 2012) (HULIN <i>et al.</i> 2009) (RADDER <i>et al.</i> 2008)
Ib: F→M	La plupart des tortues, tuataras Quelques crocodiles Poissons	(SHOEMAKER et CREWS 2009) (VALENZUELA <i>et al.</i> 2003) (OSPINA-ÁLVAREZ et PIFERRER 2008)
Ila: F→M→F	La plupart des crocodiles Quelques tortues Quelques lézards	(SHOEMAKER et CREWS 2009) (NEUWALD et VALENZUELA 2011)
III: F→M→F→M	Lézard <i>Calotes versicolor</i>	(INAMDAR-DODDAMANI <i>et al.</i> 2012)

Quels que soient l'espèce et le type de déterminisme sexuel (TSD ou GSD+TSD), la température ne peut influencer sur la différenciation gonadique d'un individu qu'à une période précise du développement qui est appelée "période sensible à la température" ou "période thermosensible" (TSP). Cette dernière est variable selon les espèces (MANOLAKOU *et al.* 2006). Par exemple chez la tortue *Trachemys scripta* (Figure 9), la période thermosensible se situe entre 15 et 21 jours post-fécondation. Une incubation à une température de 26°C favorise le sexe mâle alors qu'à 31°C le sexe devient femelle. La gonade s'engage vers l'un des 2 sexes gonadiques dès 18 jours mais un changement de température peut entraîner une réversion sexuelle jusqu'à 21 jours, âge à partir duquel la différenciation gonadique est alors irréversible.

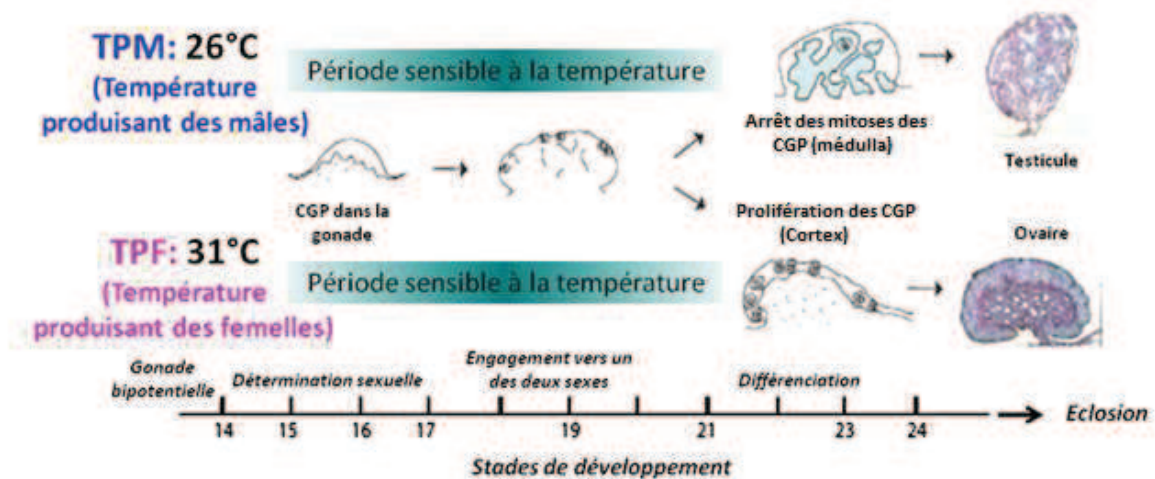


Figure 9 : Déterminisme sexuel température-dépendant chez la tortue *Trachemys scripta*.

La gonade bipotentielle contient des cellules germinales primordiales (CGP) qui se différencient, à la période thermosensible, soit en cellules germinales femelles à 31°C (TPF) soit en mâles à 26°C (TPM) (modifié d'après MATSUMOTO et CREWS 2012).

2. Le déterminisme sexuel chez les invertébrés

✓ Le déterminisme sexuel dose-dépendant

Chez certaines espèces comme la drosophile *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans*, le déterminisme sexuel est défini par le nombre de chromosomes sexuels par rapport au nombre d'autosomes (Ratio X/A). Chez le nématode qui ne présente pas de chromosome Y, un ratio XX/AA (2:2) produit des individus hermaphrodites émettant des ovocytes à l'âge adulte alors qu'un ratio X0/AA (1:2) produit des individus mâles fertiles. Chez la drosophile (Figure 10) qui possède 4 paires de chromosomes dont une paire de chromosomes sexuels, c'est également le ratio X/A qui

détermine le sexe. Ainsi, un individu XX qui présente un ratio XX/AA (2:2) sera femelle tandis qu'un individu avec un ratio XY/AA (1:2) sera mâle. Ce déterminisme sexuel est lié à la présence de protéines à domaine bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) qui ne jouent un rôle de facteurs de transcription que lorsqu'elles sont sous forme de dimères. Ces protéines sont codées par des gènes portés soit par le chromosome X ("numérateur" ou NUM) soit par un autosome ("dénominateur" ou DEM). Ce déterminisme sexuel est dit dose-dépendant car le sexe de l'animal est déterminé par le rapport entre le nombre de sous-unités NUM et DEM (CLINE 1988). Ces sous-unités sont capables de former des homo- ou des hétéro-dimères aléatoirement mais seuls les dimères NUM-NUM sont capables d'activer la transcription de *Sxl* (*Sex lethal*) dont la protéine active la voie du déterminisme sexuel femelle.

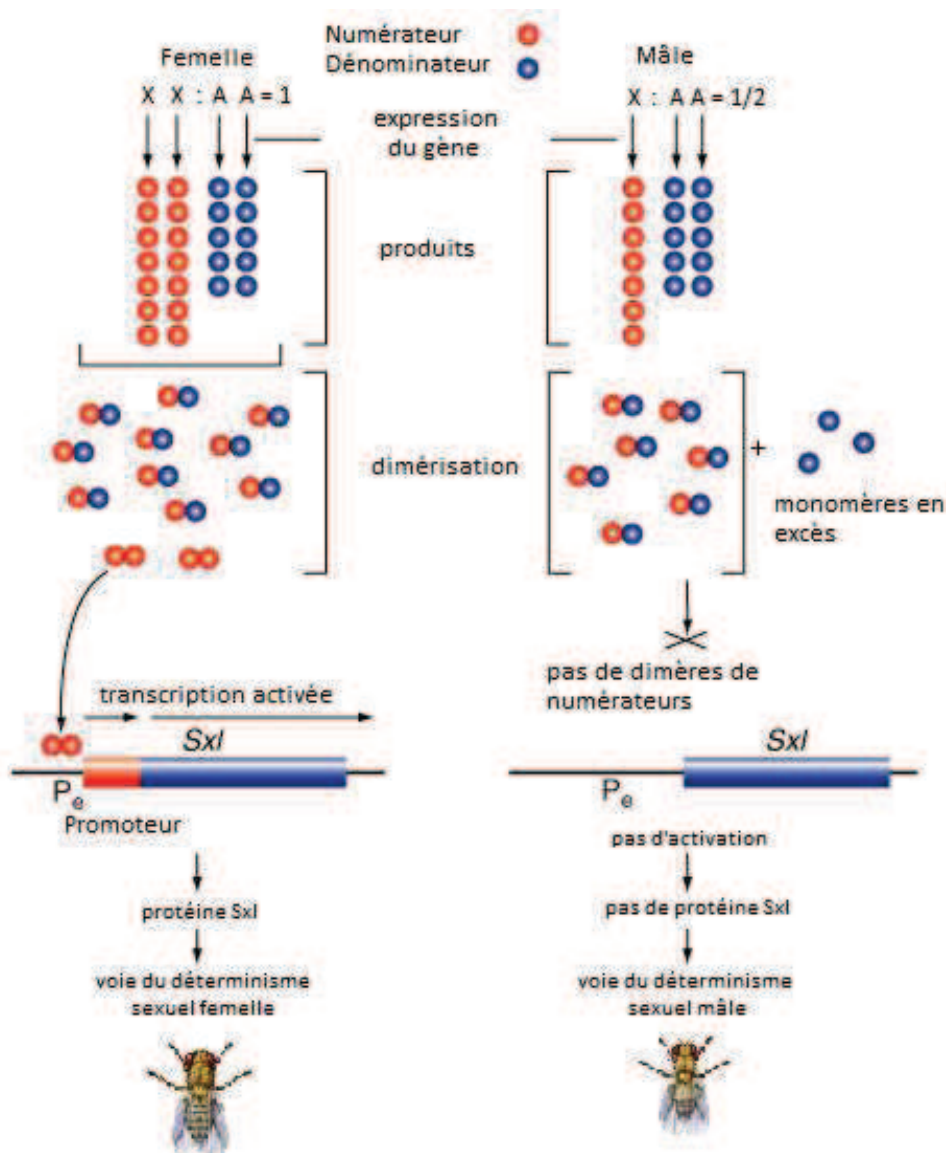


Figure 10 : Déterminisme sexuel dose-dépendant chez la drosophile *D. melanogaster*.
 Pe: promoteur ; *Sxl* : gene *Sex lethal* (modifié d'après GRIFFITHS *et al.* 2000)

✓ Le déterminisme sexuel à un locus complémentaire

Le déterminisme sexuel haplo-diploïde est représenté dans plusieurs taxa du règne animal mais est majoritaire chez les hyménoptères (Figure 11). Ces derniers présentent une parthénogenèse arrhénotoque où les oeufs se développent qu'ils soient fécondés ou pas, les premiers se développant en femelles et les seconds en mâles. Ce déterminisme sexuel à un locus complémentaire serait dépendant de la présence d'un allèle (oeuf non fécondé) ou de deux (oeuf fécondé) du gène *csd* (*complementary sex determiner*). Les abeilles hétérozygotes pour *csd* (A1/A2) se développent en femelles avec un épissage vers la forme femelle de *Dsx* et les hémizygotés A1 ou A2 en mâles avec l'épissage de la forme mâle de *Dsx*. Les homozygotes (A1/A1) sont stériles et non viables (HEIMPEL et DE BOER 2008).

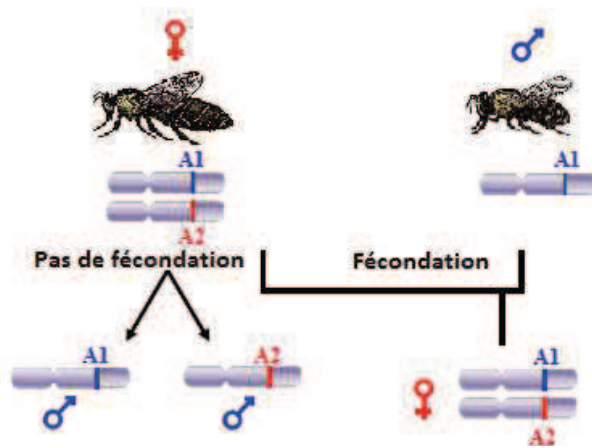


Figure 11 : Déterminisme du sexe à un seul locus complémentaire chez les hyménoptères.

A1 A2: allèles du gène *csd* (*complementary sex determiner*) (NAIMI 2009).

✓ Le déterminisme sexuel environnemental

Chez les invertébrés, l'environnement peut aussi, comme chez les vertébrés, influencer le déterminisme sexuel. Un des cas les plus étudiés est celui des nématodes de la famille des mermithidés, vers parasites d'arthropodes comme *Aedes vexans*. Dans des hôtes peu infectés, seules des femelles naissent tandis que dans des hôtes fortement infectés, seuls des mâles sont produits (HARLOS *et al.* 1980 ; HAAG 2005). A des densités intermédiaires, le sexe-ratio est équilibré.

✓ Le déterminisme sexuel chez les mollusques dont l'huître *C. gigas*

Les mollusques présentent des modes de reproduction très variés pouvant aller du gonochorisme à l'hermaphrodisme simultané et successif en passant par la parthénogenèse (HELLER 1993). Les modes de détermination du sexe seraient également très divers mais les travaux à ce sujet sont peu nombreux et essentiellement basés sur des croisements de

populations et sur l'analyse de triploïdes (YUSA 2007). Ainsi par un exemple, (i) un système X/Y est retrouvé proposé pour de nombreux gastéropodes (VITTURI *et al.* 1998) ou la mactre naine *Mulinia lateralis* (GUO *et al.* 1994), (ii) un système X/0 existerait chez les escargots *Theodoxus* et *Littorina* sp (VITTURI et CATALANO 1988 ; VITTURI *et al.* 1988, 1995) ou encore (iii) un système dose-dépendant X/A est mentionné pour la mye commune *Mya arenaria* (ALLEN JR *et al.* 1986). Chez *Crassostrea virginica*, un système multi-loci a été suspecté il y a déjà quelques années mais n'a pas fait l'objet de plus d'études (HALEY 1977 ; HALEY 1979). Chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis*, un modèle de déterminisme sexuel ZW/ZO a été proposé (KIYOMOTO *et al.* 1996 ; BRAKE *et al.* 2004). Des études plus récentes évoquent un système où le génome mitochondrial influencerait le sexe de l'animal. En effet, dans le règne animal, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est transmis de façon maternelle mais chez certains bivalves comme des mytilidés d'eau douce, une transmission par les deux parents est observée. Ces ADNmt sont identiques pour l'arrangement des gènes mais hautement divergents au niveau des séquences nucléotidiques et protéiques entre les mâles et les femelles. Ainsi, chez ces mytilidés, la gonade aurait une différenciation mâle ou femelle selon l'apport de l'ADNmt paternel ou maternel (BRETON *et al.* 2007, 2009, 2010).

Chez les mollusques, le déterminisme sexuel pourrait aussi être influencé par des facteurs environnementaux abiotiques (température, photopériode) ou biotiques (disponibilité de la nourriture, parasitisme, facteurs sociaux) (KORPELAINEN 1990 ; YUSA 2007 ; DUTERTRE *et al.* 2009). Les travaux qui suggèrent cette hypothèse sont essentiellement basés sur des observations de sexe-ratios. Ainsi, chez l'huître tropicale *Cortez corteziensis*, les mâles semblent favorisés à des températures proches de 18 °C et les femelles à 9°C (CHAVEZ-VILLALBA *et al.* 2008 ; RODRIGUEZ-JARAMILLO *et al.* 2008). Chez la moule *Mytella charruana*, STENYAKINA et collaborateurs (2010) observent un sexe-ratio en faveur des mâles après un mois de régime alimentaire à faible niveau trophique. La taille jouerait également un rôle chez la crépidule *Crepidula fornicata* chez qui les petits individus qui se fixent sur des gros deviennent mâles alors que les solitaires deviennent femelles (HOAGLAND 1978). Les contaminants et le stress semblent aussi biaiser les sexe-ratios chez les mollusques (SAUCEDO *et al.* 2001 ; HELLOU et LAW 2003 ; ORTIZ-ZARRAGOITIA et CAJARAVILLE 2010). SAUCEDO et collaborateurs (2001) mentionnent par exemple que des greffes chez l'huître perlière *Pinctada mazatlanica* induiraient un sexe-ratio en faveur des femelles.

L'huître creuse, ne présente pas de chromosome sexuels identifiés parmi ses 10 paires de chromosomes (THIRIOT-QUIEVREUX 1984) et ne présente pas de dimorphisme sexuel visible chez l'adulte. Des biopsies d'aires gonadiques, bien qu'invasives, associées à des observations instantanées sous microscope photonique permettent néanmoins de déterminer rapidement le sexe des animaux matures sans les tuer (FRANCO *et al.* 2011b). Cependant, elles ne permettent pas de sexer des animaux précoces, en tout début de cycle de reproduction, car les tubules gonadiques ne sont alors remplis que de cellules germinales indifférenciées. L'acquisition de données moléculaires peut alors s'avérer utile pour permettre une identification précoce du sexe gonadique chez l'huître dont le déterminisme sexuel reste encore peu connu. Celui-ci résulterait de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (GUO *et al.* 1998, 2012 ; HEDRICK et HEDGECKOCK 2010). Ainsi, des études de croisements contrôlés ont montré que le sexe-ratio serait déterminé par le père, ce qui suggère un contrôle génétique du sexe chez l'huître (GUO et ALLEN JR. 1997 ; GUO *et al.* 1998). Un premier modèle de déterminisme sexuel basé sur l'existence d'un seul locus a été proposé avec un allèle mâle dominant (M) et un allèle protandrique (F) et deux génotypes possible : des mâles MF ne changeant pas de sexe et des individus FF pouvant évoluer en mâles ou femelles sous le contrôle de gènes secondaires ou de l'environnement (Guo *et al.* 1998). Ce modèle ne pouvant expliquer toute l'hétérogénéité des sexe-ratios observés chez les descendants, il a récemment été supplanté par un modèle à 3 génotypes (Figure 12) (HEDRICK et HEDGECKOCK 2010). Un gène majeur serait sous forme de deux allèles (M ou F) et induirait l'existence de 3 génotypes: des huîtres FF et MM qui seraient respectivement de vraies femelles et de vrais mâles et des huîtres FM qui seraient des mâles susceptibles de devenir des femelles sous l'action de l'environnement ou de facteurs inhibant un développement mâle et/ou activant un développement femelle.

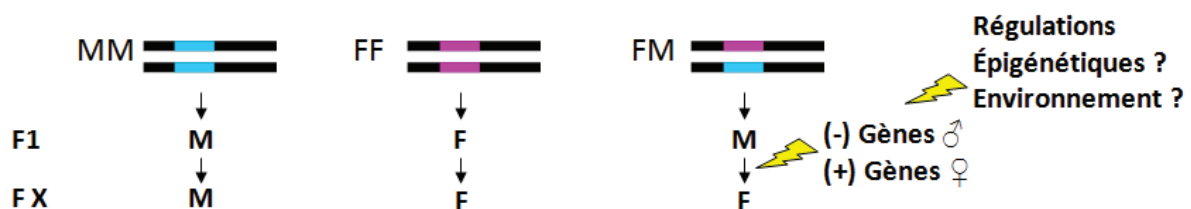


Figure 12 : Modèle du déterminisme sexuel chez l'huître creuse.
(d'après HEDRICK et HEDGECKOCK 2010)

Une influence de l'environnement, notamment de la température et de l'alimentation, sur le sexe de *C. gigas* est également envisagée depuis de nombreuses années (Guo *et al.* 1998) sans qu'aucune étude ne cible directement ses effets sur le déterminisme sexuel. Ainsi, il a été rapporté que de faibles températures (8°C) conduisent à un sexe-ratio en faveur des mâles (1 : 1,6) (FABIOUX *et al.* 2005). A l'inverse, le sexe-ratio est biaisé en faveur des femelles (1 : 1,7) quand les niveaux trophiques sont les plus élevés (LANGO REYNOSO 1999 ; CHAVEZ-VILLALBA *et al.* 2011) comme observé chez la moule (STENYAKINA *et al.* 2010). Ceci favoriserait notamment le stockage de réserve glucidiques et lipidiques, plus important chez les individus qui développent une lignée germinale femelle (SOLETCHNIK *et al.* 1997).

Les premières études des acteurs moléculaires du déterminisme sexuel chez *C. gigas* sont assez récentes (NAIMI *et al.* 2009a ; b). Au moment de ces travaux, ne disposant que de peu d'ESTs mais ni du génome de l'huître, ni d'études transcriptomiques, les auteurs ont caractérisé des acteurs potentiels des cascades du déterminisme sexuel chez l'huître sur la base de comparaisons avec des facteurs conservés des cascades moléculaires des invertébrés et des vertébrés. Cela a permis l'identification de 2 facteurs. Le premier Cg-DML (*C. gigas DM-like*), est un orthologue d'un facteur de la famille à domaine DM, à laquelle appartient Dmrt1, facteur de la différenciation testiculaire. Son expression tissulaire mesurée en PCR en temps réel est ubiquiste. Dans l'aire gonadique, elle est maximale en stade III chez les mâles, c'est-à-dire juste avant la reprise d'un nouveau cycle gamétogénétique (NAIMI *et al.* 2009a) et les auteurs ont suggéré un rôle dans la prolifération cellulaire et/ou dans la différenciation de la gonade. Le second est Cg-Foxl2 (*C. gigas Forkhead box L2*), facteur orthologue de Foxl2 qui contient un domaine conservé *Forkhead* de liaison à l'ADN et qui est connu pour jouer un rôle dans le développement ovarien chez les vertébrés. Chez l'huître, son expression est retrouvée principalement dans la gonade femelle aux stades II et III, ce qui peut laisser supposer un rôle dans la vitellogenèse et la maturation gonadique et/ou dans le déterminisme du sexe pour préparer le cycle suivant. Une expression est également retrouvée chez certains mâles au stade III et peut potentiellement traduire un futur changement de sexe. En hybridation *in situ*, Cg-Foxl2 est retrouvé dans les cellules germinales des deux sexes avec les sondes anti-sens et sens, ce qui suggérerait l'existence d'un ARN anti-sens naturel (NAIMI *et al.* 2009b). De plus, l'expression

de Cg-Foxl2 et Cg-DML au cours du développement montre une fenêtre d'expression intéressante aux alentours du stade naissain élevé à 18°C et âgé de 1,5 mois, période qui pourrait correspondre au déterminisme sexuel lors de la première mise en place de la gonade.

III. Les principaux acteurs du déterminisme sexuel

Nous avons choisi ici de détailler principalement les cascades du déterminisme sexuel chez les mammifères pour plusieurs raisons : (i) un grand nombre d'acteurs moléculaires ont été identifiés chez ces derniers même s'ils sont également souvent retrouvés chez les oiseaux ou les poissons ; (ii) ces cascades ont été peu étudiées chez les invertébrés, en dehors de la drosophile, du nématode et des hyménoptères ; (iii) les facteurs identifiés chez ces 3 modèles sont peu conservés entre invertébrés et ne sont, en général, retrouvés ni chez les mammifères ni chez l'huître.

La Figure 13 résume les principaux facteurs intervenant dans le déterminisme sexuel chez les mammifères ainsi que leurs interactions et leur localisation cellulaire. Le gène Sry active la voie de différenciation testiculaire en activant la transcription du facteur de transcription Sox9 [*Sry (Sex determining Region Y)-box 9*] qui lui-même active l'expression du gène Fgf9 (*Fibroblast Growth Factor-9*). La protéine de ce dernier maintient en retour l'expression de Sox9 dans les cellules de Sertoli. Chez les femelles, la différenciation ovarienne est sous le contrôle de deux voies indépendantes, la voie Foxl2 et la voie Wnt-4/Rspo1 (*Wingless-related MMTV integration site 4/R-spondin 1*). Ainsi, les facteurs de ces deux voies sont co-exprimés dans les cellules somatiques localisées dans le cortex ovarien et associées aux cellules germinales alors que les cellules somatiques de la médulla n'expriment que la voie Foxl2. Ces deux voies inhiberaient l'expression des facteurs de la différenciation testiculaire tels Sox9 et Fgf9 lors de la différenciation femelle et, à l'inverse, elles seraient inhibées par Sox9, Fgf9, et probablement Sry, lors de la différenciation mâle.

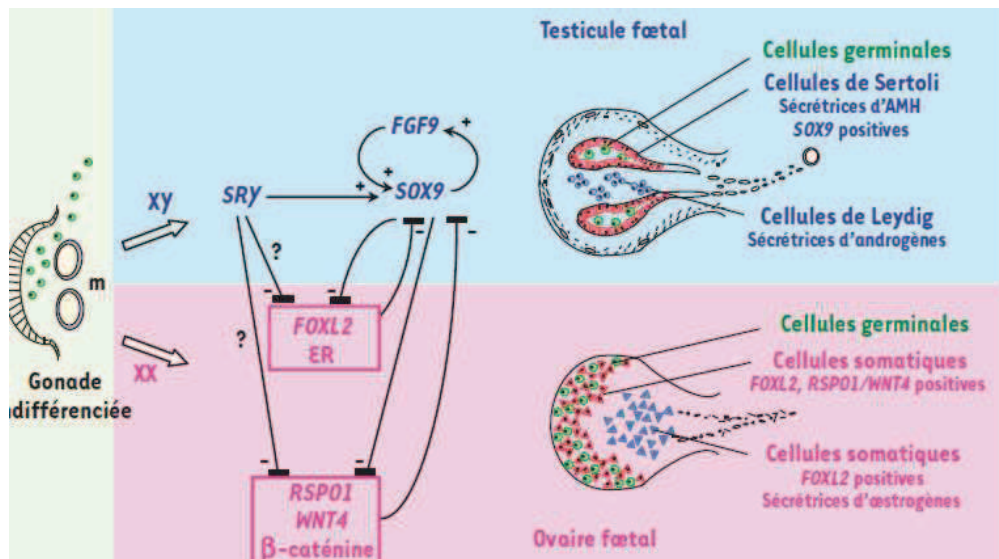


Figure 13 : Principaux acteurs du déterminisme sexuel ainsi que leur localisation cellulaire chez les mammifères.

(PANNETIER et PAILHOX 2010).

1. Les cascades du déterminisme sexuel mâle

✓ Chez les mammifères

Sox9 [*Sry (Sex determining Region Y)-box 9*]

Les facteurs Sox constituent une famille de facteurs de transcription identifiés par homologie avec Sry, regroupés en huit familles (*Sry-box A à G*) selon leurs homologies de séquences, et qui interviennent dans de nombreux processus du développement (BOWLES *et al.* 2000).

Sox9 est un facteur de transcription de la famille *Sry-box E* qui possède un domaine conservé de liaison à l'ADN, le domaine HMG, un domaine de dimérisation ainsi que deux domaines de transactivation principaux. Il possède également deux signaux indépendants de localisation nucléaire et un signal d'exportation nucléaire qui permettent sa translocation entre le cytoplasme et le noyau afin d'assurer ses fonctions (GASCA *et al.* 2002). Chez les mammifères, il est exprimé dans la gonade bipotentielle des deux sexes génétiques puis, au moment du déterminisme sexuel, il est surexprimé dans la gonade XY et sous-exprimé dans la gonade XX (JAKOB et LOVELL-BADGE 2011). Il reste exprimé chez l'adulte dans le testicule même si une expression ubiquiste est alors retrouvée, notamment dans le cerveau (SOTTILE *et al.* 2006) et dans le cartilage (ZHAO *et al.* 1997). Facteur clé de la différenciation testiculaire chez les mammifères, Sox9 est la cible de nombreuses régulations chez les deux sexes (Figure 14).

Ainsi, de récentes recherches montrent que Sry et Sf1 (*Steroidogenic factor 1*) peuvent se lier à l'élément régulateur TESCO (*Testis-specific enhancer of Sox9*) du gène de Sox9 entraînant ainsi sa régulation positive (SEKIDO et LOVELL-BADGE 2008). De plus des transfections *in vitro* suggèrent que Sox9 pourrait également s'autoréguler par son association à Sf1 à la place de Sry en activant TESCO (SEKIDO et LOVELL-BADGE 2008). Comme pour Sry, l'expression de Sox9 est aussi activée par GATA-4 (*GATA-binding protein 4*) lorsque ce dernier est complexé avec Sf1 et Fog2 (*Friend Of GATA-2*) (MIYAMOTO *et al.* 2008 ; VIGER *et al.* 2008). De récentes études montrent que Fgf9 et Pgd2, *via* leurs voies de signalisation, maintiennent l'expression de Sox9 (KIM *et al.* 2006) en favorisant son accumulation dans le noyau (MONIOT *et al.* 2009). Sox9 active lui-même directement ces deux facteurs en retour (KIM *et al.* 2006 ; WILHELM *et al.* 2007). Enfin, Dmrt1 participe au maintien du sexe mâle en contrôlant également le maintien de l'expression de Sox9 (MATSON *et al.* 2012). Sox9 quant à lui joue un rôle direct dans la transcription de l'Amh, l'hormone anti-müllérienne lors de la différenciation testiculaire (ARANGO *et al.* 1999). Il réprime également la voie Wnt/ β -caténine (Figure 14) en entraînant la phosphorylation de cette dernière (TOPOL *et al.* 2009). Une répression de Foxl2 par Sox9 est suggérée mais n'a pas encore été démontrée (EGGERS et SINCLAIR 2012).

Sox 3 et 8 [*Sry (sex determining region Y)-box 3 et 8*]

Le facteur Sox8, qui appartient également à la famille SoxE, présente une expression spécifique dans les cellules de Sertoli dont la cinétique est comprise entre celle de Sox9 et de l'Amh (SCHEPERS *et al.* 2003) (Figure 14). Mais l'absence de Sox8 n'entraîne que des modifications morphologiques mineures chez l'embryon, notamment une réduction de la taille de la gonade (O'BRYAN *et al.* 2008). Ceci suggère que la présence de ce facteur pourrait être partiellement compensée par celle d'un autre membre de la famille SoxE. En effet, Sox8 et Sox9 peuvent tous les deux, en association avec Sf1, se fixer sur le promoteur de l'Amh pour activer sa transcription *in vitro* (SCHEPERS *et al.* 2003). Cette fonction redondante des deux facteurs chez l'embryon a été confirmée chez des souris *knock-out* chez qui il apparaîtrait que Sox8 renforcerait la fonction de Sox9 dans la différenciation testiculaire (CHABOISSIER *et al.* 2004). Cependant chez l'adulte, sa fonction semble essentielle puisque son

absence entraîne un dérèglement de la spermiation et par conséquent une infertilité (O'BRYAN *et al.* 2008).

Le facteur Sox3, qui appartient à la famille SoxB, a été beaucoup moins étudié et son implication dans le déterminisme sexuel n'a été mise en évidence que très récemment (SUTTON *et al.* 2011). Sox3 et Sry semblent interchangeable dans leurs effets sur le déterminisme sexuel via Sox9 (Figure 14) et ces auteurs suggèrent que Sry aurait évolué à partir de Sox3.

Fgf9 (Fibroblast Growth Factor 9)

Fgf9 appartient à la famille des facteurs Fgf. Comme de nombreux membres de cette famille, Fgf9 joue un rôle dans des processus cellulaires multiples comme la prolifération, la survie, la migration ou encore la différenciation. Sa surexpression est importante à l'établissement de la voie testiculaire, notamment par la répression de l'expression d'un facteur clé de la voie femelle, Wnt-4 (KIM *et al.* 2006) (Figure 14). Dans la gonade d'individus génétiquement mâles, il est exprimé juste après Sry, et serait impliqué dans la spécification des cellules de Sertoli (WILLERTON *et al.* 2004). Dans le testicule embryonnaire, il est exprimé uniquement dans les cordons testiculaires. En l'absence de Fgf9, l'expression de Sox9 n'est pas maintenue, les cellules sertoliennes ne se différencient pas et l'appareil reproducteur devient phénotypiquement femelle (COLVIN *et al.* 2001). De plus, chez des souris Sox9^{-/-}, l'expression de Fgf9 est fortement diminuée. Ces travaux indiquent que l'expression de Sry n'est pas suffisante pour réguler Fgf9 en l'absence de Sox9. Ainsi, Sox9 est essentiel à l'expression de Fgf9 qui en retour maintient l'expression de Sox9 générant une boucle d'amplification (KIM *et al.* 2006) (Figure 14).

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

Un autre acteur important de la cascade du déterminisme sexuel mâle chez les mammifères est le facteur Dmrt1. Il possède un domaine de liaison à l'ADN, le domaine DM, caractéristique de la famille des facteurs de transcription Dmrt qui sont bien conservés au cours de l'évolution (VOLFF *et al.* 2003). Au cours de l'embryogenèse précoce de la souris, Dmrt1 est exprimé dans les crêtes génitales des embryons XX et XY avec des niveaux similaires d'ARNm. Vers 13 jours *post-coïtum* (jpc) à une période où les gonades mâles et

femelles sont morphologiquement distinctes, une différence d'expression de *Dmrt1* est observée avec une expression marquée dans les cordons testiculaires et très diffuse dans les ovaires. Après 13,5 jpc, les niveaux s'intensifient dans le testicule et disparaissent dans l'ovaire. Ce dimorphisme d'expression suggère un rôle prédominant dans le développement sexuel mâle (LEI *et al.* 2007). D'ailleurs, des patients humains *Dmrt1*^{+/-} présentent un pseudo-hermaphrodisme masculin avec une dysgénie gonadique c'est-à-dire un phénotype femelle. *Dmrt1* aurait également un rôle dans le maintien du sexe mâle, en empêchant notamment une réversion du testicule post-natal en ovaire (EGGERS et SINCLAIR 2012). Cette action de *Dmrt1* passe par le maintien de l'expression de *Sox9* (Figure 14) mais aussi par une inhibition de *Foxl2* (MATSON *et al.* 2011).

✓ Chez les autres espèces

Sox9

Chez de nombreuses espèces de vertébrés non-mammaliens et invertébrés, des profils d'expressions de *Sox9* dimorphiques mais souvent tardifs (Tableau 3) suggèrent un rôle conservé au cours de l'évolution dans la différenciation testiculaire mais pas dans le déterminisme sexuel, contrairement aux mammifères.

Ainsi chez le poulet et l'alligator *Alligator mississippiensis*, représentants respectifs des déterminismes sexuels GSD et (GSD+TSD), *Sox9* est exprimé après l'*Amh* uniquement chez les mâles, à une période où les cellules de Sertoli s'organisent pour former les cordons testiculaires, suggérant ainsi un rôle lors de ce processus (OREAL *et al.* 1998 ; WESTERN *et al.* 1999).

Chez les tortues, les profils d'expression de *Sox9* sont variables selon les espèces, avec par exemple chez *L. olivacea* une expression précoce, similaire aux mammifères et compatible avec un rôle dans le déterminisme sexuel, alors que chez *T Scripta*, *Sox9* exprimé lors de la différenciation sexuelle tardive jouerait plutôt un rôle dans le maintien de la différenciation des cellules sertoliennes (TORRES MALDONADO *et al.* 2002 ; SHOEMAKER *et al.* 2007).

Tableau 3 : Expression temporelle et/ou cellulaire de Sox9 chez des vertébrés non-mammaliens qui présentent des modes de déterminisme sexuel GSD, TSD ou GSD+TSD.

Cinétique d'expression précoce : expression lors du déterminisme sexuel. Cinétique d'expression tardive : expression lors de la différenciation gonadique.

Espèce (Références)	Mode de déterminisme sexuel	TSD	Cinétique d'expression	Localisation cellulaire de la protéine ou de l'ARNm
Poulet <i>Gallus gallus</i> (OREAL <i>et al.</i> 1998)	ZZ/ZW	Non	Tardive	Embryon: protéine dans les cellules de Sertoli
Alligator <i>Alligator mississippiensis</i> (WESTERN <i>et al.</i> 1999)	Pas de chromosomes sexuels	Oui	Tardive	/
Tortue <i>Lepidochelys Olivacea</i> (TORRES MALDONADO <i>et al.</i> 2002)	Pas de chromosomes sexuels	Oui	Précoce	/
Tortue <i>Trachemys scripta</i> (SHOEMAKER <i>et al.</i> 2007)	Pas de chromosomes sexuels	Oui	Tardive	/
Pleurodèle <i>Pleurodeles Watl</i> (DUMOND <i>et al.</i> 2011)	ZZ/ZW	Oui	Tardive	Embryon : protéine dans le - Noyau des cellules de Sertoli - Cytoplasme des ovocytes en pré-vitellogenèse
Xénope <i>Xenopus tropicalis</i> (EL JAMIL <i>et al.</i> 2008)	ZZ/ZW	Non	Tardive	Embryon : protéine dans le - Noyau des cellules de Sertoli - Cytoplasme des ovocytes en pré-vitellogenèse - Noyau des ovocytes en vitellogenèse
Poisson zèbre <i>Danio rerio</i> (RODRIGUEZ-MARI <i>et al.</i> 2005) (LIEW <i>et al.</i> 2012)	Pas de chromosomes sexuels Polygénique	Non	Tardive	Embryon: - ARNm Sox9a dans les cellules sertoliennes - ARNm Sox9b dans le cytoplasme des ovocytes en pré-vitellogenèse
Médaka <i>Oryzias latipes</i> (YOKOI et POSTLETHWAIT 2011)	XX/XY	Non	Tardive	Adulte : - ARNm Sox9a1 dans l'ovaire Embryon : - ARNm Sox9a2 dans les cellules somatiques intra-tubulaires mâles et femelles
Tilapia <i>Oreochromis aureus</i> (IJIRI <i>et al.</i> 2008)	XX/XY	Oui	Tardive	/
<i>Drosophile</i> <i>Drosophila melanogaster</i> (NANDA <i>et al.</i> 2009) Abeille <i>Apis mellifera</i> (WILSON et DEARDEN 2008)	XX/AA	Non	Tardive	/

Un rôle similaire est suggéré chez les amphibiens comme le xénope *X. tropicalis* et le pleurodèle *P. waltl* chez qui Sox9 est localisé dans le noyau des cellules sertoliennes (Figure 15A-B). Cependant, une localisation de Sox9 est également retrouvée dans le cytoplasme des ovocytes en pré-vitellogenèse chez les deux espèces et dans le noyau des ovocytes en vitellogenèse chez le xénope (Figure 15C-D), suggérant ainsi un rôle encore inconnu dans l'ovogenèse (EL JAMIL *et al.* 2008 ; DUMOND *et al.* 2011).

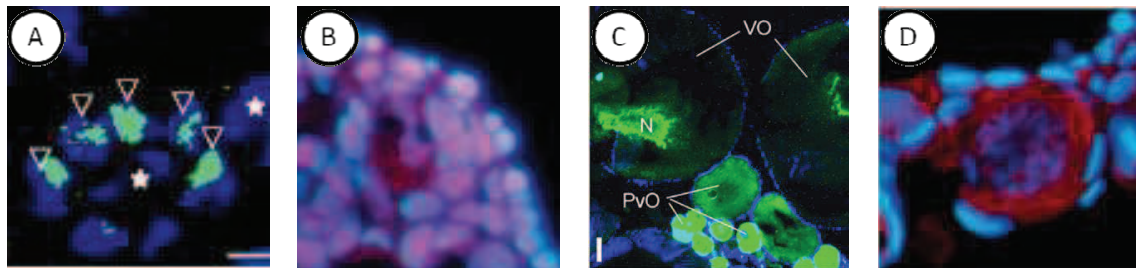


Figure 15 : Expression spatiale de la protéine Sox9 dans les gonades mâles (A-B) et femelles (C-D) chez le xénope *X. tropicalis* (A et C) et chez le pleurodèle *P. Waltl* (B et D). PvO : ovocytes en pré-vitellogenèse ; VO : ovocytes en vitellogenèse. Les flèches indiquent les cellules de Sertoli et les étoiles les cellules germinales (d'après EL JAMIL *et al.* 2008 ; DUMOND *et al.* 2011).

Chez le poisson zèbre qui ne présente pas de chromosomes sexuels et qui aurait un déterminisme sexuel polygénique, il existe, comme chez de nombreuses espèces de poissons, deux orthologues de Sox9, Sox9a et Sox9b (LIEW *et al.* 2012). L'ARNm de Sox9a est localisé dans les cellules de Sertoli à la périphérie des cystes testiculaires (Figure 16A) et l'ARNm de Sox9b est retrouvé uniquement dans l'ovaire, au niveau des ovocytes pré-vitellogéniques puis son expression diminue au cours de la vitellogenèse sous l'action de l'aromatase (Figure 16B)(RODRIGUEZ-MARI *et al.* 2005). L'Amh s'exprime juste après le pic d'expression de Sox9a dans le testicule, comme chez les mammifères.

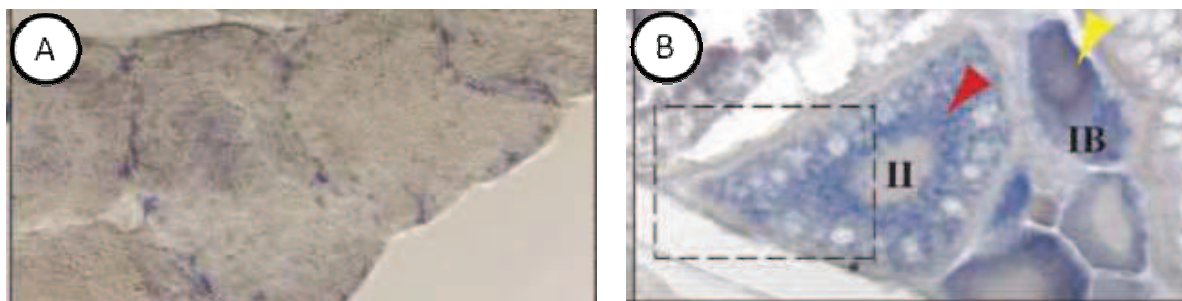


Figure 16 : Expression de l'ARNm de Sox9a et Sox9b dans les gonades mâle (A) et femelle (B) chez le poisson zèbre. A. Marquage dans les cellules de Sertoli à la périphérie des cystes ; B. IB : ovocyte pré-vitellogénique ; II: ovocyte en vitellogenèse. Les flèches précisent les cellules marquées (d'après RODRIGUEZ-MARI *et al.* 2005).

Chez les poissons gonochoriques médaka et tilapia, Sox9a et Sox9b sont tous deux exprimés lors de la différenciation sexuelle tardive (IJIRI *et al.* 2008 ; YOKOI et POSTLETHWAIT 2011). Ainsi, chez le médaka un premier orthologue de Sox9, Sox9a1 (YOKOI *et al.* 2002) présente une expression en hybridation *in situ*, uniquement dans l'ovaire adulte alors que Sox9a2, orthologue du Sox9a du poisson zèbre, présente au cours du développement précoce, une expression similaire dans les cellules somatiques entourant les cellules germinales des gonades indifférenciées des individus XX et XY. Pendant la différenciation gonadique, son expression diminue dans la gonade femelle et augmente dans la gonade mâle (NAKAMOTO *et al.* 2005). Chez le tilapia, Sox9, orthologue du Sox9a2 du médaka, présente le même profil d'expression temporel que chez ce dernier (KOBAYASHI et NAGAHAMA 2009), suggérant ainsi que chez ces deux espèces, Sox9 n'interviendrait pas dans le déterminisme sexuel précoce mais plutôt dans le développement des tubules gonadiques (IJIRI *et al.* 2008).

Chez les invertébrés ecdyzozoaires, quelques facteurs orthologues de Sox9 ont été caractérisés mais leur rôle reste peu étudié. Seules deux études rapportent une expression testiculaire de AmSoxE chez l'abeille *Apis mellifera* (WILSON et DEARDEN 2008) et de Sox100B chez la drosophile (NANDA *et al.* 2009), ce qui suggère leur implication dans le développement testiculaire.

Dmrt1

Des orthologues de Dmrt1 ont été identifiés chez les vertébrés non-mammaliens comme le poulet (NANDA *et al.* 2000), les reptiles (SMITH *et al.* 1999), les amphibiens (SHIBATA *et al.* 2002) et les poissons (GUAN *et al.* 2000 ; MARCHAND *et al.* 2000). Chez ces derniers, sa localisation cellulaire a été assez peu étudiée mais il est toujours exprimé dans la gonade de façon plus importante chez les mâles et que chez les femelles. Chez le poulet et le xénope, il pourrait être le gène majeur du déterminisme sexuel (SMITH *et al.* 2009 ; YOSHIMOTO et ITO 2011). Chez les poissons gonochoriques, il jouerait un rôle plus tardif, dans le maintien du sexe mâle chez le médaka (MASUYAMA *et al.* 2012) et durant la spermatogenèse et lors de la préparation de l'émission des gamètes chez le poisson chat *Clarias gariepinus*, la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et le silure *Silurus meridionalis* (HERPIN et SCHARTL 2011). Le rôle de Dmrt1 a également été étudié chez de nombreuses espèces présentant une différenciation sexuelle liée à la température. Son expression est régulée positivement aux

température promouvant un développement mâle chez des tortues, des alligators ou des salamandres (KETTLEWELL *et al.* 2000 ; TORRES MALDONADO *et al.* 2002 ; FERGUSON-SMITH 2007 ; RHEN *et al.* 2007 ; HOSHI et NAKAO 2008) mais les auteurs sont plutôt en faveur d'un rôle dans une différenciation tardive comme évoquée chez la plupart des poissons.

Chez les invertébrés comme la drosophile et le nématode, même si les cascades moléculaires du déterminisme sexuel sont très différentes de celles des mammifères, on y retrouve les orthologues de Dmrt1, Dsx chez la drosophile et Mab-3 chez le nématode (Figure 17). Chez ce dernier, chez les futurs hermaphrodites, Mab-3 est inhibé en fin de cascade du fait de l'inactivation en amont de Xol-1 (*XO lethal*). Chez les futurs mâles, Mab-3 n'est pas inhibé par tra-1 et induit une différenciation mâle. Chez la drosophile l'expression de Sxl uniquement chez la femelle entraîne, par l'intermédiaire d'une régulation en cascade de plusieurs gènes, l'induction de la forme femelle de Dsx.

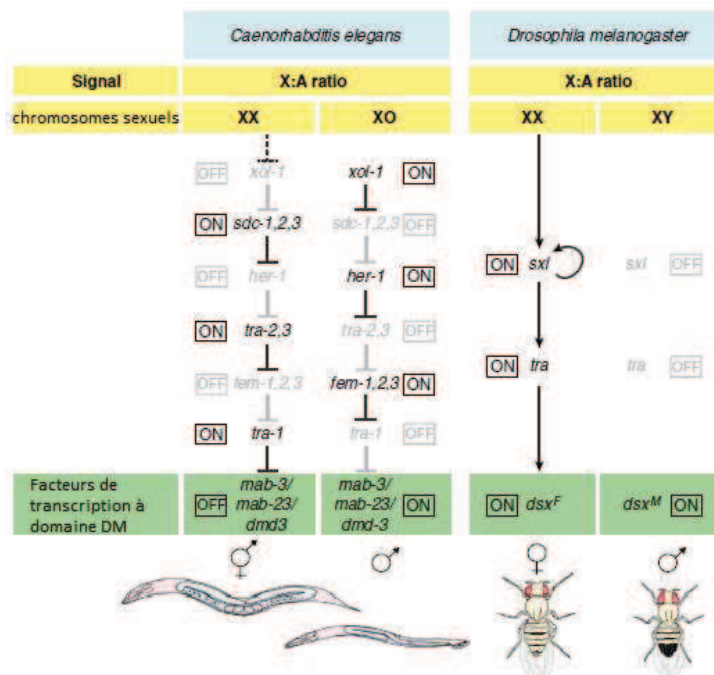


Figure 17 : Mab-3 et Dsx, orthologues de Dmrt1 dans les cascades moléculaires du déterminisme sexuel respectivement chez la drosophile et le nématode.

dmd : DM-domain gene ; dsx^{F/M} : double-sex forme femelle ou mâle ; her-1 : hermaphrodite 1 ; fem : feminizer ; mab : male abnormal ; sdc : syndecan ; sxl : sex lethal ; tra : transformer ; xol-1: XO lethal 1 (modifié d'après GAMBLE et ZARKOWER 2012).

Les autres facteurs

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle éventuel des facteurs secondaires de la cascade du déterminisme sexuel orthologues des mammifères chez d'autres vertébrés. Ainsi des orthologues de *Fgf9* n'ont été identifiés que chez l'amphibien *Rana rugosa* (YAMAMURA *et al.* 2005) et la tortue *Chelydra Serpentina* (RHEN *et al.* 2007). Ils ne montrent pas d'expression sexuellement dimorphique au cours du déterminisme sexuel ce qui suggère qu'ils ne seraient pas impliqués dans ce processus ou dans la différenciation gonadique précoce chez ces espèces. Par ailleurs, aucun orthologue de *Fgf9* n'a été retrouvé chez les poissons (SUN *et al.* 2012).

2. Les cascades du déterminisme sexuel femelle

✓ Chez les mammifères

Contrairement aux premières idées reçues, la voie femelle du déterminisme sexuel ne serait pas une voie passive (NEF et VASSALLI 2009). Bien qu'elle soit moins connue que la cascade du déterminisme sexuel mâle, plusieurs facteurs clés ont été identifiés ces dernières années chez les mammifères et sont mentionnés sur la Figure 18. Ils se répartissent en deux voies principales indépendantes mais qui conduisent à l'activation d'une même cible, la follistatine (*Fst*) : la voie *Wnt-4/Rspo1/β-caténine* et celle faisant intervenir *Foxl2*, *BMP-2* et l'aromatase (NEF et VASSALLI 2009).

La voie *Rspo1/Wnt-4/β-caténine*

De manière générale, des facteurs *Wnt* initient la signalisation *via* des récepteurs *Frizzled* (*Fz*). Le signal *Wnt* est relayé par 2 cascades principales en aval. La première, la voie canonique principale, implique la β -caténine qui a une double fonction selon sa localisation. Associée aux cadhérines membranaires et au cytosquelette d'actine, elle participe à l'ancrage cellulaire. Sous sa forme libre, elle est stabilisée par déphosphorylation dans le cytoplasme, ce qui entraîne sa translocation dans le noyau afin qu'elle participe à l'activation des gènes cibles (HOLMEN *et al.* 2002), notamment par la formation de complexe avec les facteurs transcriptionnels *TCF* (*T-cell factor*) (Nam *et al.* 2006 ; Kim *et al.* 2008). Cette voie est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme l'embryogenèse mais aussi dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches (KATOH et KATOH 2007). Il

existe une deuxième voie Wnt dite non-canonique, indépendante de la β -caténine, qui est beaucoup moins connue et qui intervient notamment dans la formation et la motilité du cytosquelette (SATO *et al.* 2006).

La voie de signalisation canonique Wnt-4 est cruciale pour la différenciation ovarienne chez les mammifères, la régulation de la formation des canaux de Müller (PARR et McMAHON 1998) ou de la stéroïdogenèse (LAPOINTE et BOERBOOM 2011). L'inactivation de Wnt-4 ou de Rspo1 conduit à une masculinisation de la gonade femelle (TOMIZUKA *et al.* 2008) tandis que leur surexpression mène à la féminisation de la gonade mâle du fait de la stabilisation de la β -caténine dans le cytoplasme cellulaire (JORDAN *et al.* 2003). Ils apparaissent donc comme des facteurs clés de cette voie pour la différenciation ovarienne chez les mammifères. Enfin, la voie Wnt est connue pour antagoniser l'expression de Sox9 dans les chondrocytes (AKIYAMA *et al.* 2004) et le même mécanisme pourrait avoir lieu dans la gonade.

Rspo1 (*R-spondin 1*)

La R-spondine 1 appartient à une famille de protéines sécrétées qui interviendraient dans la voie canonique Wnt, notamment en stabilisant la β -caténine dans le cytoplasme des cellules (TOMASELLI *et al.* 2011). Chez la souris et l'homme, elle est fortement exprimée à un moment critique du développement de la gonade (TOMASELLI *et al.* 2011). Son inactivation chez la souris conduit à un développement testiculaire chez des individus XX (TOMASELLI *et al.* 2008). Dans ce cas, aucun changement n'est observé dans les niveaux d'ARNm de la β -caténine mais son expression protéique diminue, de même que celle de l'ARNm de Wnt-4. Ceci suggère que Rspo1 agirait en amont ou en synergie avec Wnt-4 durant le développement ovarien précoce (TOMASELLI *et al.* 2011) (Figure 18). Dans la gonade foetale femelle de souris, Rspo1 initie la signalisation non seulement dans les cellules somatiques mais aussi dans les cellules germinales, induisant alors leur entrée en méiose et ainsi leur différenciation en ovocytes (CHASSOT *et al.* 2008, 2011).

Gonade Bipotentielle → Déterminisme sexuel et Différenciation gonadique → Ovaire embryonnaire

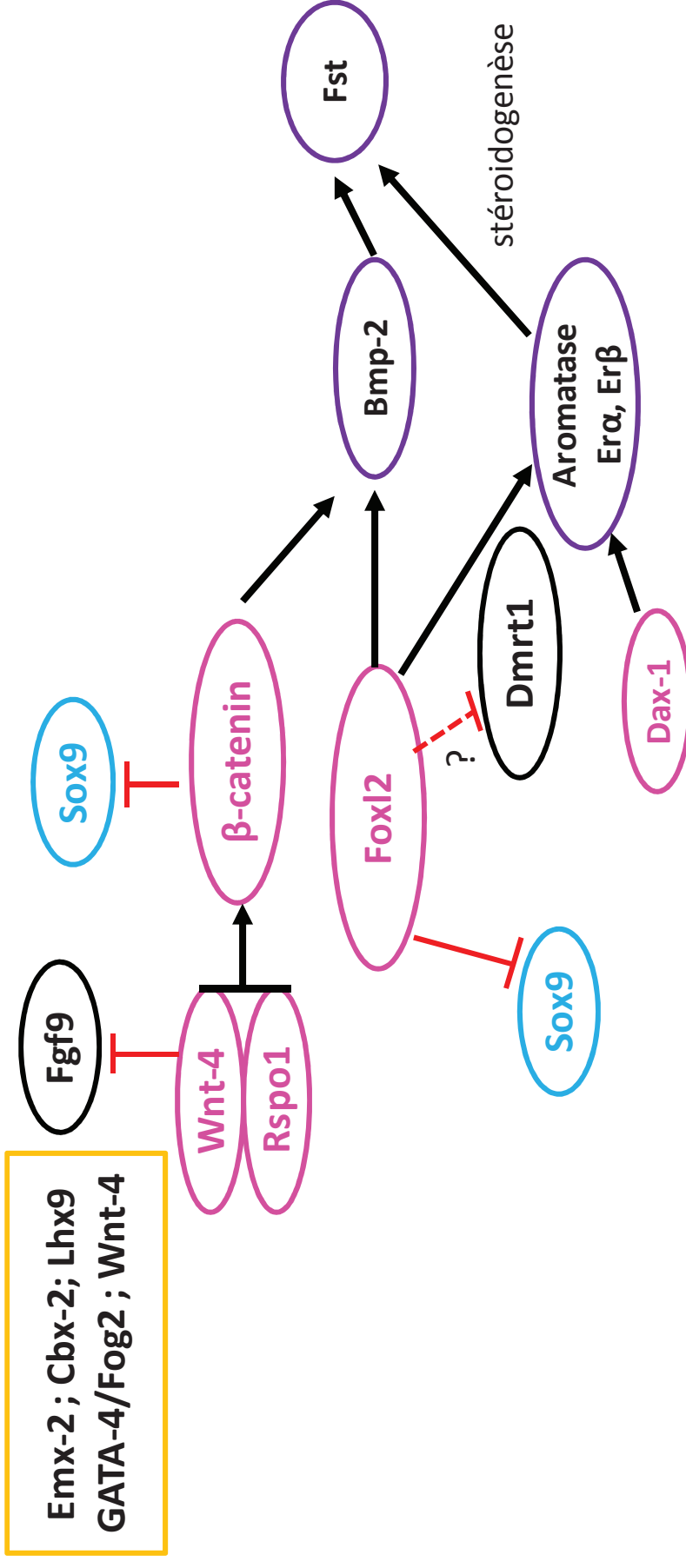


Figure 18 : Cascade simplifiée de la différenciation ovarienne chez les mammifères.

En rose: gènes de la cascade femelle ; en noir: gènes inhibant la voie femelle ; en bleu : Sox9, gène secondaire principal de la voie mâle ; en violet : gènes cibles/effecteurs. Plusieurs facteurs (Emx-2 CBX-2...) encadrés en jaune sont exprimés à un niveau similaire dans les gonades XX et XY et sont nécessaires pour le développement de la gonade bipotentielle. Flèches : activations ; barres rouges: inhibitions ; ? et pointillés : régulation suspectée (d'après SWAIN *et al.* 1996 ; NEF et VASSALLI 2009 ; PANNETIER et PAILHOX 2010 ; EGGERS et SINCLAIR 2012).

Wnt-4 (*Wingless-related MMTV integration site 4*)

Wnt-4 appartient à la famille *Wingless-related MMTV integration site* dont les membres jouent essentiellement un rôle paracrine *via* leur liaison à un récepteur membranaire Frizzled (Fz). Wnt-4 est impliqué dans de nombreux processus lors du développement et notamment dans le développement de la gonade femelle chez les mammifères (BERNARD et HARLEY 2007). Plus précisément, Wnt-4 interviendrait dans la formation des canaux de Müller et dans le développement de l'ovocyte et inhiberait la vascularisation "mâle-spécifique" dans l'ovaire (HEIKKILÄ *et al.* 2005). Il est exprimé dans la gonade bipotentielle des deux sexes puis est dérégulé dans le testicule vers 11,5 jpc alors que son expression persiste dans l'ovaire en développement (VAINIO *et al.* 1999). De plus, des souris Wnt-4^{-/-} montrent une réversion sexuelle partielle, avec un aspect mâle de la gonade mais aucune expression des marqueurs testiculaires (VAINIO *et al.* 1999). Enfin, Wnt-4 interagirait directement avec Fgf9 pour bloquer le maintien de l'expression de Sox9 (KIM *et al.* 2006) (Figures 14 et 18).

β-caténine [*CTNNB1, Catenin (cadherin-associated protein), beta 1*]

La β-caténine est un membre de la famille des protéines Armadillo dont le domaine conservé est spécialisé dans les interactions protéiques (BIENZ et CLEVERS 2003). Elle forme, avec d'autres protéines, comme des cadhérines, des complexes au niveau des jonctions cellulaires d'adhésion (BIENZ 2005). Ces dernières sont indispensables à la formation des épithélia en régulant la croissance cellulaire ainsi que l'adhésion entre les cellules (GUMBINER 2005). Son rôle dans la voie canonique de la différenciation ovarienne n'a été mis en évidence que récemment (CHASSOT *et al.* 2008). Ainsi, des invalidations ciblées de l'expression de la β-caténine dans les cellules somatiques ovariennes conduisent à un défaut de différenciation ovarienne similaire à ce qui est observé dans le cas de *knock-out* de Rspo1 ou de Wnt-4 (TEVOSIAN et MANUYLOV 2008). De plus, la surexpression d'une forme stabilisée de la β-caténine dans des cellules somatiques mâles entraîne l'arrêt du développement testiculaire et provoque une réversion sexuelle (MAATOUK *et al.* 2008). Cependant, cette voie ne serait pas impliquée uniquement durant la différenciation précoce mais interviendrait aussi dans le processus de folliculogénèse nécessaire à la fonction ovarienne (FAN *et al.* 2010). La stabilisation de la β-caténine dans le noyau active la transcription de ses gènes

cibles BMP-2 et la Follistatine, induisant la différenciation ovarienne (MAATOUK *et al.* 2008). Récemment, il a été montré chez l'humain que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine inhibait aussi l'expression de Sox9 (Figure 1418) et de l'Amh mais sans altérer l'expression des ARNs et des protéines de Sry et Sf1 (BERNARD *et al.* 2012). Les auteurs suggèrent que l'activation de la β -caténine empêche la fixation de Sf1 sur l'amplificateur TESCO d'où l'absence d'expression de Sox9 et de la différenciation sertolienne.

Foxl2 (*Forkhead box L2*)

Foxl2 est un membre de la famille *Forkhead*. Il possède un domaine bien conservé de liaison à l'ADN du même nom et est connu pour jouer un rôle durant le développement ovarien chez les mammifères (OTTOLENGHI *et al.* 2005). Il est exprimé précocement dans l'ovaire foetal et reste exprimée à l'âge adulte. Il est impliqué dans la différenciation des cellules de la granulosa lors du développement folliculaire ainsi que dans le maintien de l'ovaire durant la vie fertile. Foxl2 est un activateur transcriptionnel principal du gène de l'aromatase (PANNETIER et PAILHOUX 2010) et indirectement par la transcription de BMP-2 du gène de la follistatine (KASHIMADA *et al.* 2011) (Figure 18). Foxl2 agit parallèlement à la voie canonique Wnt-4 mais de manière indépendante (GARCIA-ORTIZ *et al.* 2009) pour induire le déterminisme sexuel femelle mais aussi probablement maintenir le sexe femelle. Des études récentes ont aussi montré que Foxl2 était capable de réprimer TESCO et de réprimer ainsi la différenciation testiculaire. Il peut également interagir avec le récepteur aux oestrogènes ER α pour amplifier cette répression (UHLENHAUT *et al.* 2009) (Figure 18). De plus, l'inactivation ciblée de Foxl2 dans des ovaires adultes induit une réversion sexuelle pratiquement complète et une augmentation de l'expression de Sox9 accompagnée de celle de marqueurs sertoliens, notamment GATA-4 ou Dmrt1 (OTTOLENGHI *et al.* 2007). Tous ces résultats suggèrent que Foxl2 pourrait inhiber l'expression de Sox9 ou de Dmrt1. Une telle inhibition de Dmrt1 pourrait également avoir lieu lors de la différenciation testiculaire (Figure 18).

Dax-1 (NR0B1, Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1)

Dax-1, également appelé NR0B1, est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. C'est en réalité un facteur commun aux cascades du déterminisme sexuel mâle et femelle chez les mammifères. Dans la gonade, Dax-1 interagit avec d'autres récepteurs

nucléaires comme Sf1 (Figure 14)(NACHTIGAL *et al.* 1998), les récepteurs aux oestrogènes ER α et ER β (Figure 18)(ZHANG *et al.* 2000), le récepteur aux androgènes ou encore celui de la progestérone (HOLTER *et al.* 2002) (Figure 14 et 18). Cependant, il n'est pas exclu que Dax-1 puisse directement réguler l'expression des gènes en se fixant sur l'ADN ou l'ARN (pour revue, LUDBROOK et HARLEY 2004). Durant le développement testiculaire, Dax-1 est exprimé dans les cellules sertoliennes avant l'expression de Sry puis il y est surexprimé à 12,5 jpc. Son expression sertolienne décroît ensuite pour augmenter dans les cellules interstitielles entre 13,5 et 17,5 jpc. Dans l'ovaire en développement, Dax-1 continue à être exprimé jusqu'au moins 14,5 jpc (IKEDA *et al.* 2001). Dans un premier temps, il a été suspecté d'être un facteur pro-ovarian car sa duplication entraînait une réversion sexuelle chez les mâles (SWAIN *et al.* 1996). Cependant, la perte de sa fonction n'affecte que le développement testiculaire (BOUMA *et al.* 2005). Les mécanismes moléculaires conduisant à une fonction pro- ou anti-testiculaire de Dax-1 ne sont pas connus mais il est possible qu'une balance d'expression de son expression puisse entraîner un développement vers l'une ou l'autre des deux voies (LUDBROOK et HARLEY 2004).

✓ Chez les autres espèces

La voie Wnt-4/Rspo1/ β -caténine

Chez les vertébrés non-mammaliens, des études montrent l'implication de la voie canonique Wnt durant la différenciation sexuelle chez des espèces présentant des modes de déterminisme sexuel variés, comme chez les oiseaux (GSD ZZ/ZW) (CHUE et SMITH 2011) ou chez le lézard (ESD) (TRIPATHI et RAMAN 2010). Ceci suggère aussi un rôle conservé de cette voie au sein des vertébrés. Ainsi, chez le poulet, Wnt-4 et Rspo1 présentent une expression précoce, sexuellement dimorphique, de la médulla jusqu'au cortex de la gonade femelle avant la différenciation morphologique en ovaire (SMITH *et al.* 2008). Chez le lézard, Wnt-4 est exprimé uniquement dans les gonades n'exprimant pas Sox9 et Dmrt1, même si son expression débute un peu plus tardivement que ces derniers (TRIPATHI et RAMAN 2010). Chez le médaka, une surexpression de Rspo1 dans des gonades XY induit une réversion sexuelle (ZHOU *et al.* 2009). Enfin, chez le poisson zèbre (ZHANG *et al.* 2010), une expression de l'ARNm de Rspo1 est retrouvée dans les cellules germinales primordiales, dans les ovogonies et les ovocytes pré-vitellogéniques chez la femelle et dans les spermatogonies et spermatocytes

chez les mâles au cours du développement (Figure 19). Cette expression est plus élevée dans les ovaires, en accord avec un rôle dans la différenciation femelle et perdue chez l'adulte. Une expression est également observée dans les cellules somatiques des deux sexes.

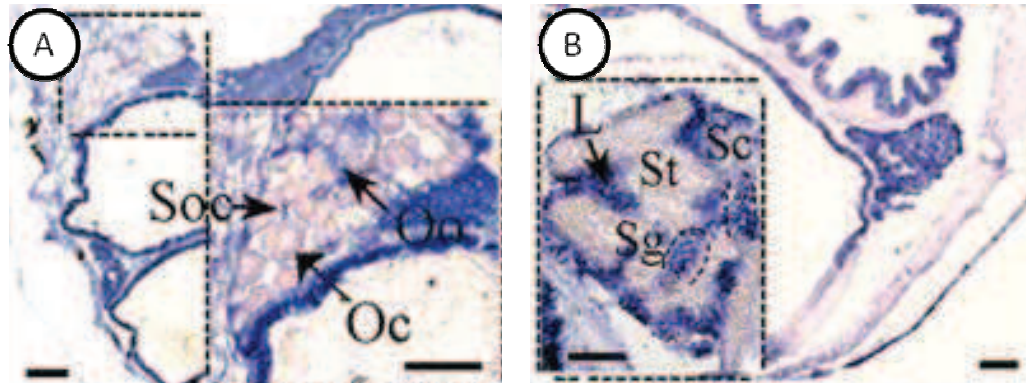


Figure 19 : Expression des ARNm de la *Rspo1* dans la gonade en développement chez le poisson zèbre femelle (A) et mâle (B).

Oc : ovocytes pré-vitellogéniques ; Oo : ovogonies ; Sc : spermatocytes ; Sg : spermatogonies ; Soc : cellules somatiques ; St : spermatides (ZHANG *et al.* 2010).

Foxl2

Comme pour la voie de signalisation Wnt, de nombreuses études ont récemment démontré une implication de Foxl2 dans la différenciation ovarienne chez les vertébrés non-mammaliens qui est résumée dans le Tableau 4. Chez les poissons médaka (NAKAMOTO *et al.* 2006) (Figure 20A), le tilapia *Oreochromis aureus* (WANG *et al.* 2007) ou le flet *Paralichthys olivaceus* (YAMAGUCHI *et al.* 2007), Foxl2 s'exprime, comme chez les mammifères, avec l'aromatase dans les cellules somatiques de la gonade immature juste après l'initiation de la différenciation ovarienne et de l'ovaire adulte. Chez le poulet (HUDSON *et al.* 2005), les amphibiens comme la grenouille *Rana rugosa* (OSHIMA *et al.* 2008), le xénope *X. tropicalis* (OKADA *et al.* 2009) et chez la tortue *T. scripta* (SHOEMAKER-DALY *et al.* 2010), une expression précoce femelle-spécifique de Foxl2 est également retrouvée dans la gonade. Chez le xénope, elle est même observée au moment du déterminisme sexuel, suggérant ainsi une implication dans ce mécanisme. Chez le têtard de *Rana rugosa*, l'expression de Foxl2 apparaît avant la mise en place d'un dimorphisme sexuel. Elle diminue une fois le sexe établi et augmente de nouveau dans l'ovaire différencié où elle est observée dans les cellules somatiques entourant les ovocytes (Figure 20B) (OSHIMA *et al.* 2008). A noter que chez deux des espèces présentant un déterminisme sexuel influencé par l'environnement, la tortue

(TSD) et le flet (GSD +TSD), une diminution des niveaux d'expression de Foxl2 est observée lors d'une incubation aux températures favorisant les mâles, suggérant ainsi un rôle dans l'initiation de la différenciation ovarienne chez ces espèces (YAMAGUCHI *et al.* 2007 ; SHOEMAKER-DALY *et al.* 2010).

Tableau 4 : Expression temporelle et/ou cellulaire de Foxl2 chez des vertébrés non-mammaliens qui présentent des modes de déterminisme sexuel GSD, TSD ou GSD+TSD.

Cinétique d'expression précoce : expression lors du déterminisme sexuel. Cinétique d'expression tardive : expression lors de la différenciation gonadique.

Espèce (Références)	Mode de déterminisme sexuel	TSD	Cinétique d'expression	Localisation cellulaire de la protéine
Médaka <i>Oryzias latipes</i> (NAKAMOTO <i>et al.</i> 2006)	XX/XY	Non	Précoce	- Embryon: cellules somatiques de la gonade femelle - Adulte: cellules folliculaires en pré- et vitellogenèse
Tilapia <i>Oreochromis aureus</i> (WANG <i>et al.</i> 2007)	XX/XY	Oui	Précoce	-Embryon: cellules somatiques de la gonade femelle -Adulte: cellules folliculaires en pré- et vitellogenèse ; cellules de la granulosa
Flet <i>Paralichthys olivaceus</i> (YAMAGUCHI <i>et al.</i> 2007)	XX/XY	Oui	Précoce ↳ quand FPT -> MPT	/
Poulet <i>Gallus gallus</i> (HUDSON <i>et al.</i> 2005)	ZZ/ZW	Non	Précoce	/
Xénope <i>Xenopus tropicalis</i> (OKADA <i>et al.</i> 2009)	ZZ/ZW	Non	Précoce	/
Grenouille <i>Rana rugosa</i> (OSHIMA <i>et al.</i> 2008)	XY/ZZ ou ZZ/ZW suivant l'origine	Non	Précoce	Embryon: cellules somatiques de la gonade femelle
Tortue <i>Trachemys scripta</i> (SHOEMAKER-DALY <i>et al.</i> 2010)	Pas de chromosomes sexuels	Oui	- Précoce - ↳ quand FPT -> MPT	/

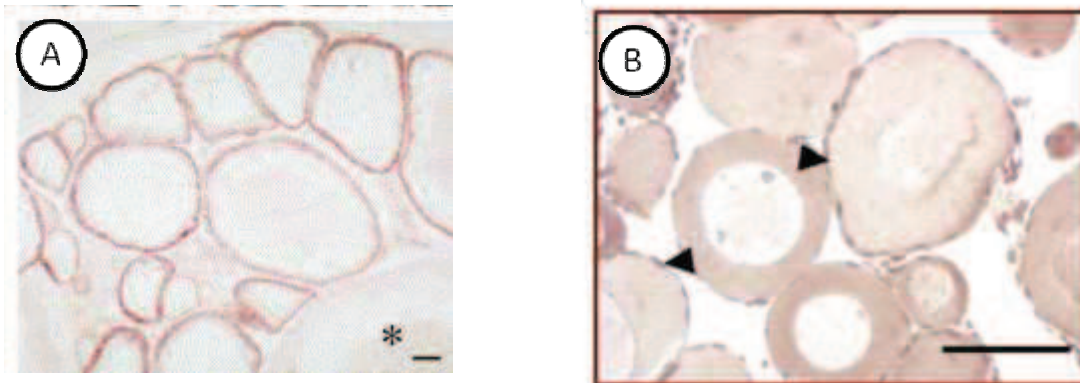


Figure 20 : Expression de la protéine Foxl2 dans l'ovaire adulte du poisson médaka (A) et dans l'ovaire de têtard de la grenouille *Rana rugosa* (B).

Chez les deux espèces, Foxl2 est exprimé dans les cellules folliculaires sauf dans les follicules matures. Les têtes de flèches noires désignent les cellules somatiques exprimant Foxl2. L'étoile désigne un follicule mature (NAKAMOTO et al. 2006 ; OSHIMA et al. 2008).

Dax-1

Dax-1, même s'il a fait l'objet de peu de travaux, présente, chez le poulet, le même profil d'expression que chez les mammifères, à savoir une expression précoce chez les deux sexes qui persiste uniquement dans la gonade femelle (SMITH et SINCLAIR 2004). Cependant, chez le médaka (NAKAMOTO *et al.* 2007) ou la truite arc-en-ciel (VIZZIANO *et al.* 2008), Dax-1 est suspecté de réprimer l'expression de Foxl2 et de l'aromatase induisant alors une différenciation testiculaire.

IV. L'hermaphrodisme

1. Généralités

L'hermaphrodisme est caractérisé par la présence des deux sexes, mâle et femelle, chez un même individu (GHISELIN 1969). Dans le règne animal, l'hermaphrodisme simultané pour lequel un animal possède en même temps les deux types de gonades est rare. C'est le cas chez certaines espèces de plathelminthes (planaires), d'annélides (sangsues, lombrics) ou de mollusques (coquille St-Jacques, escargot). Il n'existe alors qu'une seule glande génitale appelée ovotestis (DAVISON 2006). La plupart des animaux hermaphrodites sont donc successifs, passant au cours de leur vie d'un sexe à l'autre, avec parfois une phase transitoire avec un ovotestis non fonctionnel. Ils présentent souvent des appareils reproducteurs mâles et femelles distincts et successifs, qui ne fonctionnent jamais en même temps (WARNER

1975). Chez les hermaphrodites protogynes/protérogynes, la gonade femelle devient mâle et l'inverse se produit chez les individus protandres. C'est notamment le cas de l'huître creuse qui est généralement mâle lors des premiers cycles de reproduction et devient femelle par la suite (Guo *et al.* 1998). Chez les mollusques bivalves, on retrouve à la fois des animaux hermaphrodites successifs (huître) et simultanés (coquille St Jacques) ainsi que des animaux gonochoriques (moule).

L'hermaphrodisme n'est pas retrouvé que des chez les invertébrés. Il concerne 10% des poissons où il est majoritairement successif, avec 9% d'espèces protogynes [parmi les Labridés (girelles), Sparidés (pagres, pageots), Serranidés (mérours, vieilles), Scaridés (perroquets), Pomacanthidés (poissons-anges), Chétodontidés (poissons-papillons)] et 1% d'espèces protandres [parmi les Sparidés (daurades, sars, bogues, marbrés, saupes) les Pomacentridés (poissons-clown) et beaucoup de poissons abyssaux]. Quelques rares cas d'hermaphrodisme simultané sont néanmoins observés chez les poissons comme chez le serran (*Serranus tigrinus*) et augmentant ainsi les chances de reproduction pour cette espèce solitaire capable d'auto-fécondation. (DE MITCHESON et LIU 2008)

De façon générale, chez les hermaphrodites, la détermination sexuelle s'effectue toujours sous l'influence de facteurs internes (hormones, poids, âge) et/ou externes (nutrition, facteurs sociaux, stress associés) (DEVLIN et NAGAHAMA 2002 ; MUNDAY *et al.* 2006 ; BAROILLER *et al.* 2009 ; MEROT et COLLIN 2012). Par exemple, chez le mérour brun *Epinephelus marginatus*, le sexe ne dépend ni de l'âge ni de la taille des individus mais de la structure de la population, notamment des densités d'individus (ZABALA *et al.* 1997). Chez la crépidule, gastéropode protandre, lors d'un stress lié par exemple à une privation de nourriture, les animaux perdent rapidement leurs attributs mâles pour atteindre une phase de transition asexuée. Cependant quand la nourriture est de nouveau disponible, l'animal acquiert des attributs femelles sans retourner à un stade mâle (MEROT et COLLIN 2012). A l'heure actuelle, aucun gène majeur n'a été identifié chez les hermaphrodites pour lesquels d'ailleurs peu de travaux concernent le déterminisme sexuel.

2. Données moléculaires

L'essentiel des données moléculaires sur l'hermaphrodisme concerne les poissons. Qu'ils soient protogynes ou protandres, les voies de différenciation conduisant à une gonade

mâle ou femelle sont plastiques (ZHOU et GUI 2010). La compréhension de leur déterminisme du sexe chez des espèces hermaphrodites, bien que peu avancée à l'heure actuelle, devient essentielle, notamment pour préserver les espèces qui présentent une fragilité de leur sexe-ratio. Quelques études ont récemment permis d'identifier plusieurs facteurs moléculaires de la différenciation gonadique chez ces espèces (Tableau 5).

Tableau 5 : Facteurs moléculaires de la différenciation gonadique ou du déterminisme sexuel caractérisés chez les poissons hermaphrodites.

Gène	Type d'hermaphrodisme	Espèce	Profils d'expression au changement de sexe	Références
Dmrt1	Protandre	<i>A. schlegeli</i> <i>S. Aurata</i>	∩ (développement ovarien)	(LIARTE <i>et al.</i> 2007 ; SHIN <i>et al.</i> 2009)
	Protogyne	<i>E. coioides</i> <i>E. merra</i> <i>H. tenuispinis</i> <i>M. albus</i>	∪ (développement testiculaire)	(HUANG <i>et al.</i> 2005 ; XIA <i>et al.</i> 2007 ; ALAM <i>et al.</i> 2008 ; JEONG <i>et al.</i> 2009)
Foxl2	Protandre	<i>A. schlegeli</i>	∪ (développement ovarien)	(WU et CHANG 2009)
	Protogyne	<i>E. merra</i>	∩ (développement testicule)	(ALAM <i>et al.</i> 2008)
		<i>H. tenuispinis</i>	pas de variation d'expression	(KOBAYASHI <i>et al.</i> 2010)
Sox9	Protogyne	<i>E. coioides</i>	initiation et maintien du sexe mâle	(LUO <i>et al.</i> 2010)
Sox9a1/ Sox9a2	Protogyne	<i>M. albus</i>	pas de variation d'expression	(ZHOU <i>et al.</i> 2003)
Sox3	Protandre	<i>A. schlegeli</i>	développement testiculaire	(SHIN <i>et al.</i> 2009)
	Protogyne	<i>E. coioides</i>	développement ovarien	(YAO <i>et al.</i> 2007a)
Wnt-4	Protandre	<i>A. schlegeli</i>	développement ovarien	(WU et CHANG 2009)
Dax-1	Protandre	<i>A. schlegeli</i>	développement testiculaire	(Wu et al., 2007)

Le facteur Dmrt1, facteur du déterminisme sexuel mâle conservé des invertébrés aux vertébrés l'est aussi chez de nombreuses espèces d'hermaphrodites (i) protandres comme la daurade noire *Acanthopagrus schlegeli* (HE *et al.* 2003) et la daurade royale *Sparus auratus* (LIARTE *et al.* 2007) ou (ii) protogynes comme les mérours *Epinephelus coioides* et *E. merra* (XIA *et al.* 2007 ; ALAM *et al.* 2008), le labridé *Halichoeres tenuispinis* (JEONG *et al.* 2009) et le symbranchidé *Monopterus albus* (HUANG *et al.* 2005). L'expression de Dmrt1 est alors corrélée au développement ou à la régression du testicule lors du changement de sexe respectivement chez les poissons protandres ou protogynes. Un orthologue de Foxl2 a aussi été caractérisé chez plusieurs espèces hermaphrodites et montre des variations de son expression durant les changements de sexe, une augmentation chez le poisson protandre

Acanthopagrus Schlegeli (Wu *et al.* 2010) et une diminution chez le protogyne *Epinephelus merra* (Figure 21) (ALAM *et al.* 2008). Cependant, aucun dimorphisme d'expression n'est observé durant le changement de sexe chez *Halichoeres tenuispinis* (KOBAYASHI *et al.* 2010).

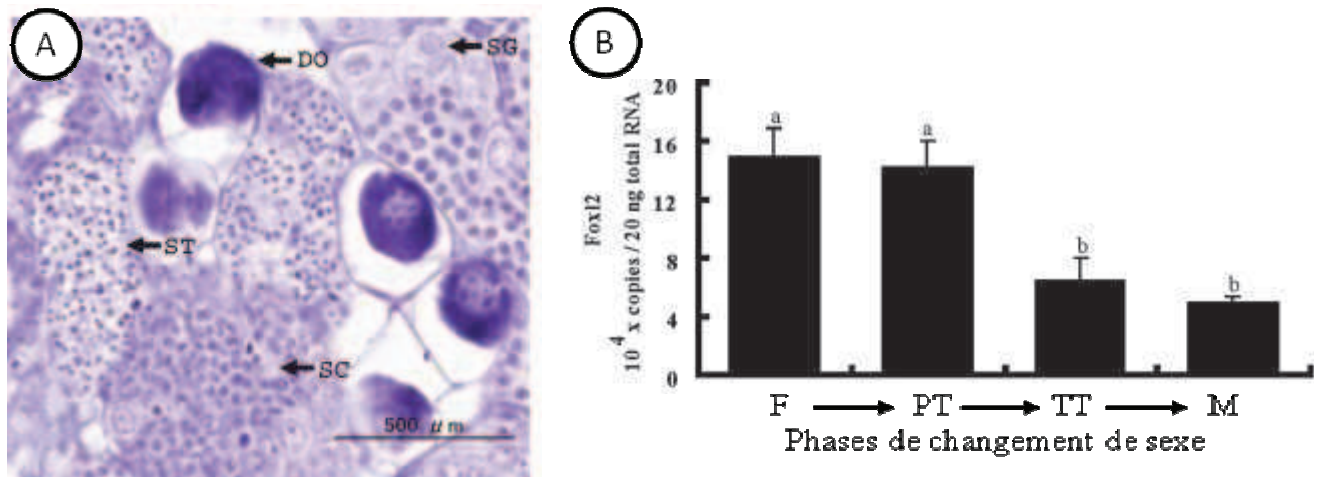


Figure 21 : (A) Structure de l'ovotestis chez le mérou *Epinephelus merra* lors du changement de sexe femelle vers mâle. (B) Expression de Foxl2 mesurée par qPCR lors de ce même changement de sexe.

DO: ovocyte en dégénérescence ; F, femelle ; M, mâle ; PT, période précoce de transition ; SC: spermatocytes ; SG: spermatogonies ; ST: spermatides ; TT, période tardive de transition. Le niveau d'expression des ARNm de Foxl2 diminue significativement lors de la transition de femelle en mâle, c'est-à-dire entre les phases F/PT et TT/ M (ALAM *et al.* 2008).

Des facteurs Sox9 montrent également des variations d'expression chez des poissons hermaphrodites lors des réversions sexuelles. Ainsi, Sox9 augmente avant Dmrt1 lors du passage au sexe mâle chez *Epinephelus coioides* (LUO *et al.* 2010) suggérant ainsi un rôle dans l'initiation et le maintien de ce sexe. Par contre ni Sox9a1 ni Sox9a2 ne semble avoir de rôle dans ce mécanisme chez *Monopterus albus* (ZHOU *et al.* 2003). Sox3 qui présente une expression testiculaire chez *A. Schlegeli* (SHIN *et al.* 2009) et une expression ovarienne chez *Epinephelus coioides*, jouerait un rôle dans la différenciation gonadique (YAO *et al.* 2007). Des orthologues de Wnt-4 et de Dax-1 ont aussi été identifiés chez *A. schlegeli* et les auteurs suggèrent un rôle dans le développement ovarien pour le premier (WU et CHANG 2009) et dans la développement testiculaire pour le second (Wu *et al.* 2008).

V. Régulation de la reproduction et du déterminisme sexuel par les ARN anti-sens naturels

1. Définitions

Les ARN anti-sens naturels (NATs) sont des ARN endogènes simples brins qui sont transcrits à partir du brin de l'ARN ou du brin opposé de l'ADN et qui sont totalement ou partiellement complémentaires à l'ARN sens (BEITER *et al.* 2009). Deux catégories peuvent être distinguées, les cis-NATs qui sont transcrits à partir du même locus et les trans-NATs qui sont transcrits à partir d'un autre locus (par exemple d'un pseudogène) et qui présentent donc une complémentarité partielle (NUMATA et KIYOSAWA 2012) (Figure 22). Deux autres classes de NATs peuvent être notées: les micro ARNs (miARNs) qui inhibent la traduction des ARNm (BRENNECKE *et al.* 2003) et les petits ARN nucléaires (SnARNs) qui guident la modification post-transcriptionnelle des ARNs non-codants (Kiss 2002). De plus, de nombreux vertébrés présentent des ARN avec des séquences répétées très conservées ou des éléments transposables susceptibles de former des NATs (LEHNER *et al.* 2002).

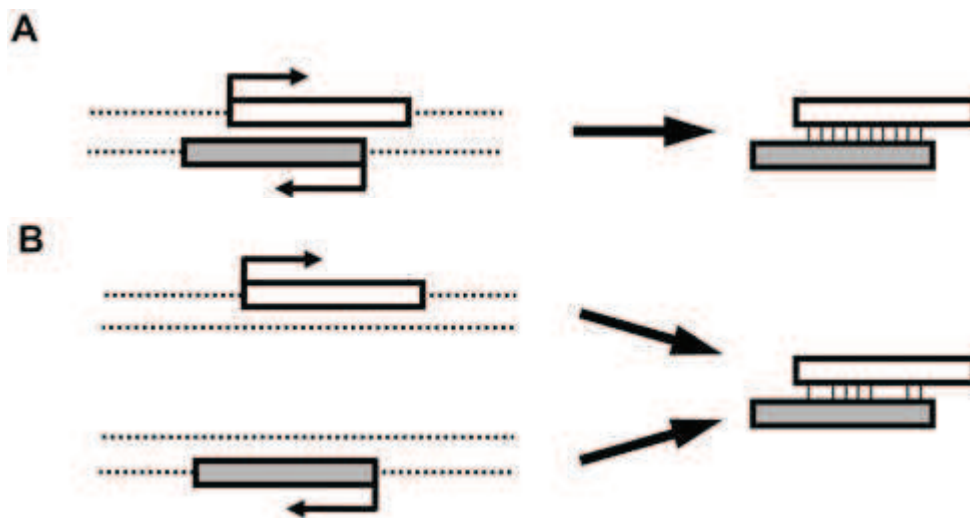


Figure 22 : Transcrits anti-sens naturels cis- et trans-.

(A) *Cis*-NAT. La transcription a lieu avec le brin opposé de l'ADN comme matrice dans la même région chromosomique et les deux brins forment donc une paire parfaite. (B) *Trans*-NAT. La transcription se produit à partir d'un autre locus que le gène cible et l'appariement possède généralement de nombreuses erreurs et peut concerner plusieurs gènes (NUMATA et KIYOSAWA 2012).

Les NATs peuvent réguler au moins en partie l'expression de nombreux gènes à différents niveaux: épissage, maturation, transcription, transport, traduction, dégradation ou

encore stabilisation de l'ARNm cible (Su *et al.* 2010) (Figure 23). Ils peuvent alors agir sur l'ADN génomique, notamment en jouant sur la structure de la chromatine, les méthylations ou en modulant sa transcription. Ils peuvent également réguler l'ARNm cible et la production de sa protéine, soit de manière directe soit par l'intermédiaire de miRNAs qui régulent à la manière d'interférence ARN (COSTA 2005).

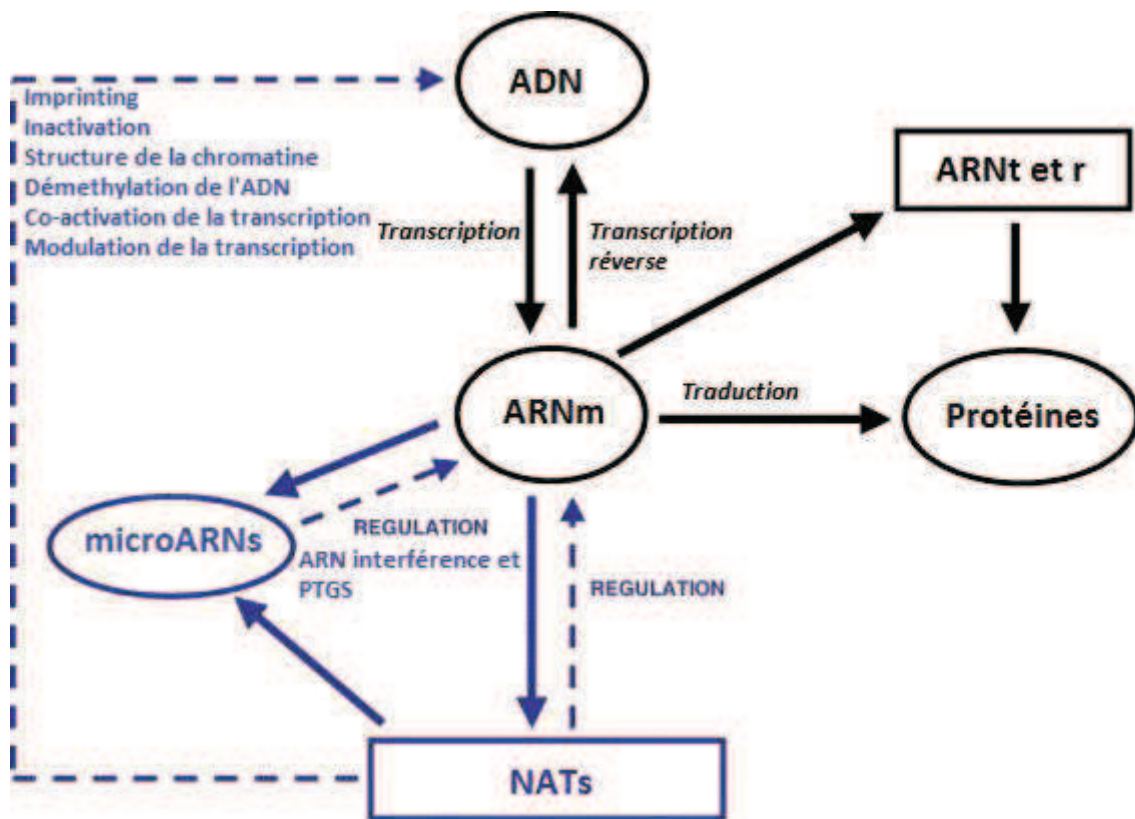


Figure 23 : Principaux niveaux de régulation par des ARN anti-sens naturels.

PTGS : *Post-Transcriptional Gene Silencing* ; NATs : *Natural Antisense Transcript* (modifié d'après COSTA 2005). Flèches pleines : mécanismes classiques de transcription et traduction. Flèches pointillées : régulations de ces mécanismes par les NATs

2. Les NATs liés à la reproduction

Les NATs interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques et notamment dans la reproduction, à des niveaux différents. Par exemple, de nombreux NATs de neuro-hormones comme la GnRH (Hu *et al.* 2007), de récepteurs d'hormones stéroïdiennes comme la progestérone (JANOWSKI *et al.* 2007 ; SCHWARTZ *et al.* 2008) ou encore de protéines de régulation comme la StAR (CASTILLO *et al.* 2011) ont été caractérisés. Chez la carpe, l'ARN anti-sens de la GnRH réduit l'expression et la sécrétion de cette dernière, conduisant ainsi à

une diminution de synthèse de gonadotropines et à un moindre développement gonadique qui rend les poissons stériles (Hu *et al.* 2007). Chez la souris, l'expression de l'ARNm de la protéine StAR est diminuée en lien avec la diminution de la synthèse de la progestérone, ceci par son transcrit anti-sens dans les cellules de Leydig et les tissus stéroïdogènes (CASTILLO *et al.* 2011). Enfin, de récentes études révèlent l'existence de nombreux NATs impliqués dans la spermatogenèse, notamment des miARNs. Ils interviennent dans l'activation ou la répression des mécanismes de régulation post-traductionnelle essentiels au bon déroulement de la spermatogenèse (MCLIVER *et al.* 2012).

3. Les NATs liés au déterminisme sexuel

Si de nombreux ARN anti-sens interviennent lors de la reproduction, plusieurs agissent lors du déterminisme sexuel. Chez les mammifères, le plus connu est Tsix, anti-sens naturel de Xist (*X-inactive specific transcript*), responsable de l'inactivation du chromosome X chez les femelles (SPLINTER *et al.* 2011). Un ARN anti-sens naturel de Foxl2 nommé Foxl2os a également été mis en évidence chez la souris et est co-localisé dans les cellules de la granulosa avec le transcrit sens (Figure 24).

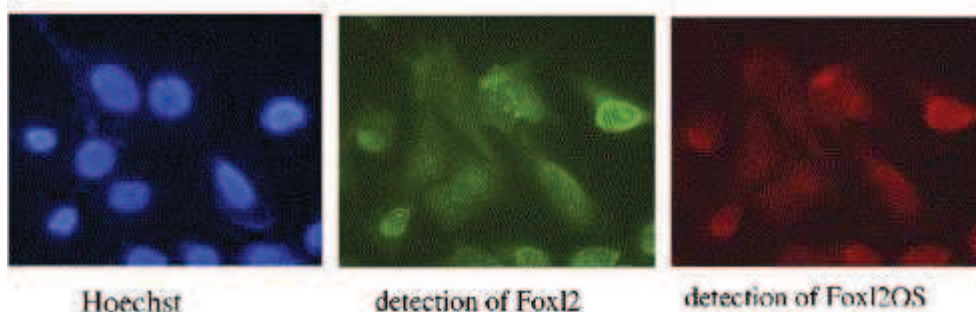


Figure 24 : Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) de Foxl2 et Foxl2os dans les cellules de la granulosa chez la souris.

Les noyaux sont colorés en bleu avec du Hoechst. Foxl2 (en vert) et Foxl2os (en rouge) sont présents dans les mêmes cellules, principalement dans le cytoplasme (COCQUET *et al.* 2005).

VI. Objectifs

Si les éléments des voies du déterminisme sexuel ont été bien caractérisés chez les vertébrés présentant un déterminisme génétique comme les mammifères (EGGERS et SINCLAIR 2012), les données concernant les voies chez les vertébrés dont les modes de déterminisme sexuel sont plus "atypiques" ne sont que partielles. De plus, chez les invertébrés, seules les voies des espèces modèles ecdysozoaires *D. melanogaster* et *C. elegans* ont été bien étudiées et aucune étude ne porte sur les lophotrochozoaires. Chez les hermaphrodites, les données moléculaires, bien que considérablement augmentées ces 5 dernières années, notamment chez les poissons, restent encore fragmentaires.

Chez l'huître, l'étude du déterminisme sexuel est rendue difficile du fait de son mode de reproduction (hermaphrodite successif irrégulier protandre) et des changements de sexe chez l'adulte qui peuvent varier selon les conditions environnementales. De plus, le sexe d'un individu ne peut être identifié que tardivement à un stade où la gonade est déjà avancée en gamétogenèse et avec des méthodes létales (coupes histologiques), stressantes pour l'animal (biopsies) ou coûteuses (IRM). De plus, peu de données concernent la première mise en place de la gonade chez cette espèce, que ce soit du point de vue de la formation des tubules gonadiques, de la gamétogenèse, du déterminisme sexuel ou de la cinétique précise de ces processus. Chez *C. gigas*, le déterminisme sexuel serait génétique (malgré l'absence d'hétérochromosomes sexuels) et également contrôlé par l'environnement. Au début de ce travail de thèse, deux facteurs orthologues de vertébrés, Cg-Foxl2 et Cg-DMI, avaient déjà été caractérisés sur les bases de leurs homologies avec les vertébrés, même si leurs rôles au cours du déterminisme sexuel ou de la différenciation gonadique restaient encore à préciser. Cg-Foxl2 semblait également présenter un ARN naturel anti-sens mais cela restait également à préciser. Les profils d'expression de ces facteurs laissaient supposer une fenêtre temporelle du déterminisme sexuel chez l'adulte au stade III et chez le naissain élevé à 18°C, aux alentours de 1,5 mois d'âge. De plus, comme le génome de l'huître n'a été publié que récemment (ZHANG *et al.* 2012), nous ne disposions alors que de banques d'ESTs. Ces dernières années, ces banques ont été considérablement incrémentées et des approches globales en puces à ADN ont été développées en parallèle, permettant ainsi d'enrichir les données moléculaires chez l'huître, notamment concernant son déterminisme sexuel.

Le premier chapitre de cette thèse présente donc les études 'in silico' qui ont permis de sélectionner, chez *C. gigas*, les facteurs potentiels du déterminisme sexuel les plus pertinents à étudier par la suite. Ces études sont basées (i) sur des homologies de séquences entre des facteurs connus des cascades des vertébrés/invertébrés et les ESTs de l'huître, et (ii) sur des profils d'expressions intéressants (Ex : dimorphiques entre les sexes ou les stades gamétogénétiques) obtenus par puces à ADN chez *C. gigas*.

Dans un second chapitre, deux facteurs sélectionnés, SoxE et la β -caténine ont été caractérisés et leur expression a été étudiée par PCR en temps réel et en hybridation *in situ* chez l'adulte. Afin de préciser la fonction de la β -caténine au cours du cycle gamétogénétique, l'étude de son expression protéique a également été initiée en immunofluorescence. Ce chapitre a ainsi eu comme objectif d'affiner non seulement la cascade moléculaire mais aussi la fenêtre temporelle du déterminisme sexuel chez l'huître adulte.

Comme le déterminisme sexuel était également suspecté d'être régulé de manière épigénétique chez l'huître, l'étude de ces régulations a été entreprise dans un troisième chapitre. Elle concerne plus spécifiquement la caractérisation de Cg-Foxl2os, l'ARN anti-sens naturel de Cg-Foxl2 et l'étude de son expression au cours du développement et chez l'adulte en parallèle de celle de Cg-Foxl2. Les mécanismes potentiels de régulation du transcrit sens par son anti-sens ont aussi été appréhendés. Afin de préciser la fonction de Cg-Foxl2 au cours du cycle gamétogénétique, l'étude de son expression protéique a également été initiée en immunohistochimie avec un anticorps homologue.

Enfin, les régulations environnementales ont été abordées dans un quatrième chapitre. L'impact de la température sur le déterminisme sexuel lors de la première mise en place de la gonade a été étudié chez du naissain placé en conditions contrôlées. Les sexe-ratios, l'expression d'acteurs moléculaires du déterminisme sexuel et les cinétiques de différenciation gonadique et de gamétogenèse ont été précisés. Ceci devait également permettre d'enrichir les données sur la première mise en place gonadique, période critique du développement de l'huître et d'affiner la cascade moléculaire et la fenêtre temporelle du déterminisme sexuel au cours du développement chez *C. gigas*.

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

1. Animaux

Les huîtres *Crassostrea gigas* adultes de calibre 3 (masses comprises entre 65 et 85 g) ou 5 (masses comprises entre 30 et 45 g) proviennent des entreprises ostréicoles bas-normandes "GAEC le Tatihou" (Saint-Vaast-la-Hougue) ou "Lenoir" (Blainville-sur-mer), de la Société Atlantique de Mariculture "SATMAR" (Gatteville) ou encore du Syndicat Mixte pour l'équipement du Littoral "SMEL" (Blainville-sur-mer). La détermination du stade et du sexe des animaux a été effectuée par analyse histologique après sacrifice des animaux.

Les stades de développement utilisés pour la plupart des PCR en temps réel proviennent de la SATMAR. Les larves issues d'une seule fécondation ont été élevées à 27°C et nourries *ad libitum* avec *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* et *Isochrysis sp.* Après métamorphose, dans un premier temps, le naissain de 400 µm à 2 mm (4 à 7 semaines post-métamorphose) a été élevé à 18°C et nourri *ad libitum* avec *C. calcitrans*, *C. gracilis* et *Skeletonema costatum*. Les animaux entre 2 et 7 mm ont ensuite été élevés à température/nourriture naturelles avec éventuellement une supplémentation en *Skeletonema costatum*.

Le naissain utilisé dans le cadre du projet européen FP7 "Reproseed" provient de fécondations contrôlées de géniteurs réalisées à la station expérimentale IFREMER d'Argenton. Les stades larvaires ont été élevés sur place dans des conditions classiques (RICO-VILLA *et al.* 2006) à 25°C et nourris avec un mélange de *C. gracilis* et *I. affinis galbana*. Quinze jours après la fécondation, les larves pédivélégères oillées ont été transférées sur microbrisure afin de permettre leur fixation. Le naissain juste métamorphosé de 28 jours post-fécondation (jpf) a ensuite été filtré sur maille de 500 µm puis conditionné à différentes températures (18°C, 22°C, 25°C et 28°C) dans un système à flux ouvert au sein des structures cylindro-coniques de 500 ml (Figure 25A et B). Les animaux ont alors été nourris avec un mélange de *C. gracilis* et *I. affinis galbana* en biomasses égales et à un volume constant de 1500 µm³/µl. Pour chaque température, des prélèvements ont été effectués à des pas de temps réguliers pendant une durée allant de 11 jours à 1 mois selon la température (Tableau 6). Lors de ces prélèvements, tous les animaux étaient retirés de la structure et leur poids et tailles moyens déterminés (Figure 25C). Ils étaient ensuite replacés dans la structure assurant ainsi un brassage des animaux. Pour chaque température, un dernier prélèvement

a été effectué plus tard afin de déterminer le sexe-ratio de chaque population par histologie (Tableau 6).

Tableau 6 : Organisation des prélèvements pour chaque température de conditionnement.

Température	Pas de temps des prélèvements (j)	Age au dernier prélèvement (jpf)	Age au moment du sexe-ratio (jpf)
18°C	4	56	86
22°C	3	52	56
25°C	2	46	49
28°C	1	39	49

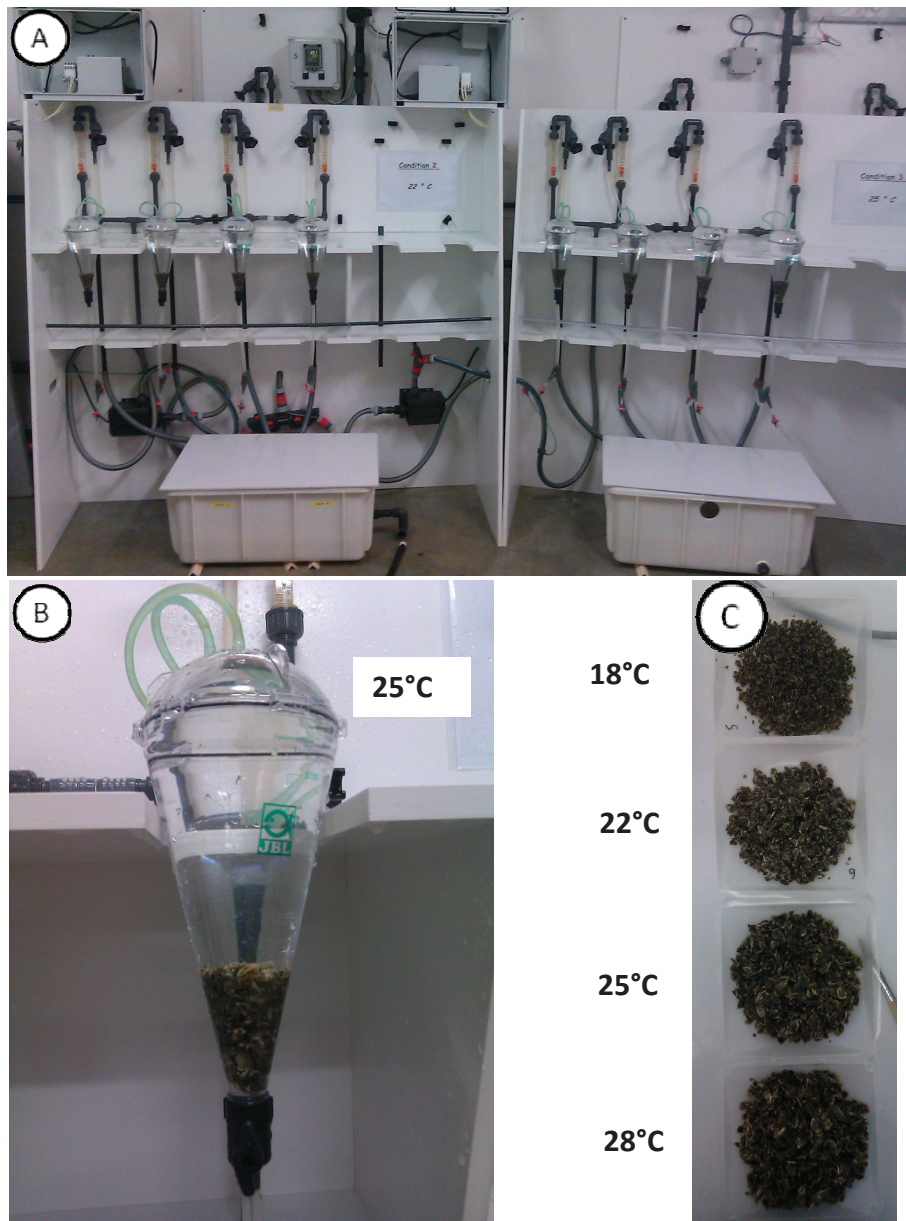


Figure 25 : (A) Vue d'ensemble du système expérimental d'élevage à flux ouvert de naissain de la station expérimentale IFREMER d'Argenton. (B) Gros plan sur une structure cylindro-conique de 500 ml maintenue à 25°C et contenant du naissain âgé de 46 jpf. (C) Photo de lots de naissain âgé de 46 jpf conditionnés à l'une des quatre températures entre 18°C et 28°C.

2. Prélèvement d'échantillons biologiques

Les huîtres adultes ont été disséquées à leur arrivée au laboratoire. Pour les expériences de biologie moléculaire et de *Western Blotting*, plusieurs tissus (gonades, branchies, glande digestive, palpes labiaux, manteau et muscle adducteur) ont été disséqués en condition *RNase free* et ont été congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux ou des protéines. Pour les analyses histologiques, d'immunohistochimie en fluorescence indirecte ou d'hybridation *in situ*, une tranche d'environ 1 cm d'épaisseur a été prélevée entre les palpes labiaux et le coeur. Un morceau de branchie a également été prélevé et conservé dans l'éthanol 70% à -20°C afin de vérifier *a posteriori* la ploïdie des animaux en cytométrie en flux.

Les larves et le naissain provenant de la SATMAR ont été divisés en pools et conservés à -80°C dans du *TRI-REAGENTTM* (Sigma®) avec leur coquille avant extraction de leur ARN. Le naissain du projet "Reproseed" a également été divisé en pools. Ainsi, pour chaque température et chaque temps de prélèvement, dix pools de dix individus ont été maintenus avec les coquilles dans du *TRI-REAGENTTM* à -80°C afin d'extraire les ARN ; un autre a été conservé dans de l'éthanol 70% à -80°C afin de vérifier *a posteriori* la ploïdie en cytométrie en flux ; le reste des animaux a été fixé dans du fixateur Davidson, après que leur coquille ait été percée puis ils ont été conservés dans de l'éthanol 70% et décoquillés sous loupe binoculaire en vue d'une inclusion histologique.

II. Techniques histologiques

1. Préparation et coupe des échantillons biologiques

Les prélèvements adultes et naissain sont fixés entre 24 et 48 h dans du fixateur Davidson (10% Glycérol, 20% formaldéhyde, 30% éthanol à 96%, 40% eau de mer filtrée) à 4°C puis sont déshydratés dans des bains de concentration croissante d'éthanol, de 24 à 48 h chacun suivant la taille de l'échantillon. Les échantillons sont ensuite imprégnés dans du butanol puis dans de la paraffine liquide à 56°C avant d'être inclus en blocs et conservés en chambre froide à 4°C en vue d'être coupés pour l'histologie, l'immunohistochimie ou l'hybridation *in situ*.

2. Coloration au trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968)

Des coupes de 3 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2135) puis montées sur lames pour la coloration histologique. Les lames sont dans un premier temps déparaffinées dans deux bains de *Rotihistol*[®] (Roth[®]) de 5 min, suivis de deux bains de 5 min dans l'éthanol absolu. Ensuite, les lames sont réhydratées dans des bains de 5 min d'éthanol de concentration décroissante (96 puis 70%). Après un rinçage dans de l'eau distillée, elles sont colorées dans les bains suivants :Hématoxyline de Groat (coloration des noyaux) (1 min), eau courante (5 min), Eosine Y à 1% (coloration du cytoplasme) (8 min), Acide phosphomolybdique à 1% (1 min), Vert lumière à 0,2% (1 min) (coloration du muscle et du tissu conjonctif). Elles sont ensuite déshydratées par deux bains d'1 min d'éthanol absolu et passées dans un bain de *Rotihistol*[®] de 5 min avant d'être montées dans une résine (*Rotihisto-kit*[®], Roth[®]) entre lame et lamelle et séchées à l'étuve à 55°C pendant 12 h.

III. Analyse de la ploïdie des échantillons

La ploïdie des huîtres adultes et du naissain a été testée sur quelques individus censés être représentatifs du groupe d'adultes et de naissain selon le protocole décrit par Jouaux et collaborateurs (2010). Pour cela, un morceau de branchie des adultes ou l'animal entier décoquillé pour le naissain qui avaient été conservés dans de l'éthanol 70% à -20°C sont broyés à l'aide d'un piston directement dans l'alcool 70% puis filtrés sur de la toile à bluter de 100 μm d'ouverture de maille. Le filtrat est ensuite brièvement centrifugé puis le culot est re-suspendu dans du PBS 1X. Après centrifugation, il est repris dans 50 μl de perméabilisant / solution DNase du kit "*Coulter*[®] *DNA Prep*[™] *Reagent*" (Beckman Coulter[™]). Cinq cent μl d'une solution contenant de l'iodure de propidium et de la RNase (fournie dans le kit) sont ajoutés puis après 20 min d'incubation à l'obscurité, la ploïdie est analysée par cytométrie en flux (*Epics XL Beckman Coulter*[™]). Les données sont analysées grâce au logiciel Expo 32 MultiComp de l'appareil.

IV. Techniques classiques de biologie moléculaire

1. Préparation des ARN

✓ Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des adultes et des stades de développement sont extraits à l'aide du kit TRI REAGENT™ (Sigma®). Les tissus adultes prélevés et congelés à -80°C sont broyés dans de l'azote liquide (environ 100 mg/échantillon) et homogénéisés à l'aide d'une seringue dans 1 ml de TRI-REAGENT (mélange de thiocyanate de guanidine et de phénol). Le naissain frais est broyé dans des eppendorfs contenant du TRI-REAGENT puis il est congelé à -80°C. Par la suite, la séparation et la purification des ARN sont effectuées selon le même protocole quel que soit l'échantillon. Les ARN sont séparés par ajout de 200 µl de Bromo-Chloro-Propane et centrifugation à 12000 g, 15 min, à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et les ARN sont précipités avec 500 µl d'isopropanol par centrifugation à 12000 g, 10 min, à 4°C. Les ARN sont ensuite lavés par 2 rinçages avec 500 µl d'éthanol 75% et centrifugés à 7500 g, 5 min, à 4°C. L'éthanol est enlevé puis les culots sont séchés quelques minutes à température ambiante et repris dans 50 µl d'eau traitée au DEPC à 0,01% (DiéthylPyroCarbonate, Sigma®). Les ARN sont conservés à -80°C.

✓ Qualité et quantification des ARN

La concentration d'ARN totaux obtenue est déterminée par mesure spectrophométrique à 260 nm au Nanodrop 2000 (ThermoScientific®). Une unité d'absorption optique (A_{260nm}) correspond à une concentration en ARN de 40 µg/µl. Le degré de pureté des ARN est évalué au Nanodrop par le rapport A_{260nm}/A_{280nm} avec une valeur optimale de 2 et la courbe d'absorbance en fonction de la longueur d'onde permet de vérifier l'absence de contamination notamment par le phénol (Figure 26A). La qualité des ARN est également vérifiée par électrophorèse capillaire à l'aide du bioanalyser Agilent® RNA 600 (Figure 26B-C).

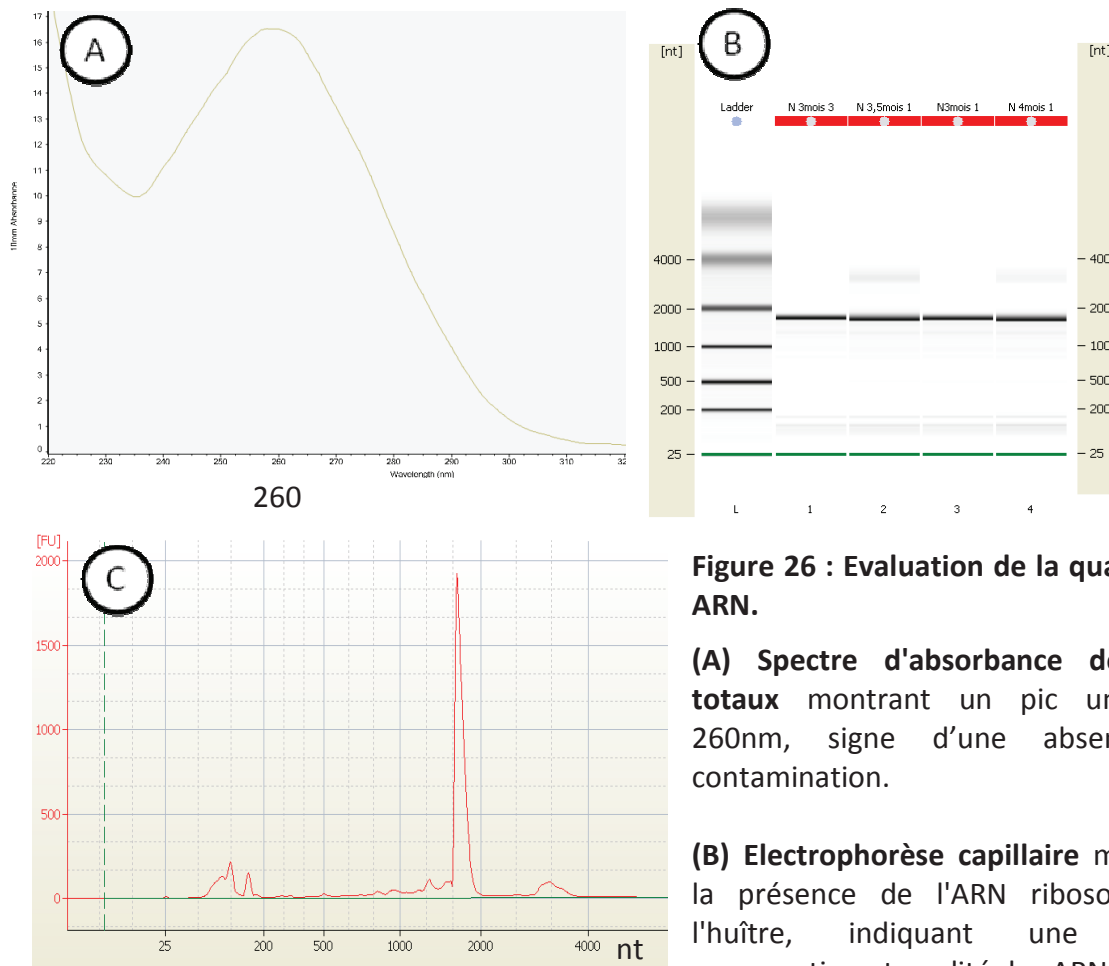


Figure 26 : Evaluation de la qualité des ARN.

(A) Spectre d'absorbance des ARN totaux montrant un pic unique à 260nm, signe d'une absence de contamination.

(B) Electrophorèse capillaire montrant la présence de l'ARN ribosomal de l'huître, indiquant une bonne conservation et qualité des ARN.

(C) Spectre de fluorescence en fonction de la taille des nucléotides, qui montre un pic illustrant un % correct d'ARN ribosomaux et indiquant une bonne conservation et qualité des ARN.

✓ **Purification des ARN polyadénylés à partir des ARN totaux**

Les ARNm sont purifiés à partir des ARN totaux à l'aide du *Dynabeads® mRNA DIRECT™* Kit. Un tampon de lyse (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 500 mM LiCl ; 10 mM EDTA, pH 8 ; 1% LiDS, 5 mM DTT) est ajouté (qsp 100 µl) aux ARN totaux (maximum 100 µg). Deux cent µl d'une suspension de billes paramagnétiques recouvertes d'oligo-(dT)₂₅ (5 µg/µl) sont ensuite ajoutés. Après hybridation des ARNm aux oligo-(dT), les billes sont attirées contre la paroi du tube par un aimant et les ARN non-polyadénylés restés en solution sont retirés. Les ARNm polyadénylés sont ensuite lavés 2 fois dans un tampon de lavage A (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 0,15 M LiCl ; 1 mM EDTA ; 0,1% LiDS) et 1 fois dans un tampon de lavage B (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 0,15 M LiCl ; 1 mM EDTA). Ils sont enfin élués des billes par 20 µl de tampon d'éluion (10 mM Tris- HCl, pH 7,5) chauffé à 65°C pendant 2 min.

✓ Traitement à la DNase

Les ARN totaux (700 µg) sont traités à la *DNase I RQ1* (Promega®) pendant 30 min à 37°C dans un mélange réactionnel de 10 µl contenant 1 µl de tampon 1X de réaction de l'enzyme (40 mM Tris-HCl, pH 7,9 ; 10 mM NaCl ; 6 mM MgCl₂ ; 10 mM CaCl₂), 2 U de *DNase I RQ1 RNase-free* (Promega®). La *DNase* est ensuite inactivée par ajout de 1 µl d'une solution à 20 mM d'EDTA (pH 8) et chauffage à 65°C pendant 15 min.

2. Synthèse d'ADN complémentaire par transcription inverse

Cinq cent ng d'ARN totaux ou d'ARN poly(A) sont dénaturés pendant 5 min à 70°C en présence d'oligo-(dT)₁₅ (Promega®, 500 ng) ou d'amorces spécifiques (Eurogentec®, 500 ng) (Tableau 7) dans un volume final de 10 µl afin de favoriser leur hybridation. Après refroidissement rapide dans de la glace, la transcription inverse est réalisée pendant 1 h à 37°C dans un volume total de 25 µl en présence de 200 U de transcriptase inverse *M-MLV* (Promega®), de dNTP (Promega®, 0,5 mM chacun), de 25 U de *RNasin* (Promega®) dans un Tampon 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 75 mM KCl ; 3 mM MgCl₂ ; 10 mM DTT) (Promega®). La rétro-transcription est stoppée par incubation à 70°C pendant 15 min.

3. Choix des amorces

Les amorces spécifiques (Tableau 7) sont désignées à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) selon les paramètres optimaux d'amplification de la PCR (30-70% de GC, T_m≈60°C, amorces de 18-20 nt pour une PCR classique, 25-28 nt pour une RACE-PCR).

4. Réactions de PCR

Les ADNc sont amplifiés *in vitro* dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant 10 à 20 ng d'ADNc, 0,2 mM de chaque dNTP, 10 µl de tampon 5X de réaction de l'enzyme (5 mM KCl ; 1 mM Tris-HCl pH 9 ; 0,01% Triton X-100) ; 0,2 µM de chaque amorce (Tableau 7), 1,25 U de Taq ADN polymérase (Promega®) et 1,5 mM de MgCl₂. La PCR est réalisée selon un programme type: 1 cycle de dénaturation (95°C, 5 min), 30 cycles d'amplification [(95°C, 30 s), (T_m des amorces, 30 s), (72°C, 1 min/kb)], 1 cycle d'élongation (72°C, 7 min). La qualité des ADNc est vérifiée par amplification de l'actine. L'absence d'amplification d'ADN

génomique est vérifiée par amplification d'un échantillon non rétro-transcrit. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments amplifiés par PCR sont systématiquement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (de 1 à 2% selon la taille des produits de PCR attendue) dans un tampon TAE (40 mM Tris ; 20 mM acide acétique ; 2 mM EDTA, 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 ou 100 pb (Promega®).

Tableau 7 : Liste et séquences des amorces utilisées

Gène	Utilisation	Amorces	Séquences (5' -> 3')	Gène	Utilisation	Amorces	Séquences (5' -> 3')
Cg-Foxl2 / Cg-Foxl2os	Reverse-transcription	FoxS1	CACGGACATTTTCGGTTCTCA	Cg-β-Catenin	PCR classique	BCatS1	TCAGAACGAGCAAAAACGAGA
		FoxS2	CGATTAATGCGACCGTCTTC			BCatAS1	GACAAAGATTCAGCAGCACACA
		FoxS3	GCAGCAAGACTCGAGAATCC			BCatS2	CCAGGTGAACTGGTGAGGAT
		FoxS4	AGTATTCGCCACAATTTGAGCTTAAAT			BCatAS2	TATTCATGCCTGCTGCTTTG
	FoxAS2	CCGCCGATAGTCGTTAAG	BCatqPCRS1		CCATGATGGTTCCACAGTTG		
	FoxS3	GCAGCAAGACTCGAGAATCC	BCatqPCRAS1		ACAGCGAGTGGTCTCCAAGT		
	FoxS5	GTTCTCGTGAAGGTGGAGAG	BCatS3		GATGTGAACCAGCAGCTGAA		
	FoxS6	GGAAATTTCTGGACCCTGGA	BCatAS3		TGCAGCATCTGACAAAGTTCC		
	FoxAS1	TGTCAGTCTTGGCGGTCTCA	SoxE1		ACTACAAATACCAACCCC		
	FoxAS4	GCCGATTTGGTTCATAGCAC	SoxE5N1		TGTCTCAGCCCATGATGTTCAAG		
FoxAS5	GCGTTAGGCGTTTTTCACTC	SoxE2	CCACGGAA CAGCTCCTCAAGGCTGTT				
FoxS7	AATATCAGGGATGGGCACAA	SoxEAS2	TGTTGATTGGCTCTCCTA				
FoxAS3	TCCTTGGGTGCAGGAACATA	SoxEqPCRS1	GCCATTCAAGGAGAAAAACGA				
FoxS1	CACGGACATTTTCGGTTCTCA	SoxEqPCRAS1	TGTAAGAGCTGGTCCAGGATG				
FoxAS6	TGTCGTGAGTCTTGGCGTCT	SoxE3	AAAGTTCGACTGCCATCGTT				
qfelong1	ACCACCTGGTGAGATCAAG	SoxEAS3	GGTGTCTCTGAAATGT				
qrelong1	ACGACGATCGCATTTCTCTT	DMS	CCATGGAGTGGTGTGCGC				
ActF	CTATGTAGGAGACGAGGCC	DMSAB	GTTGCCTTTCTGCTATCAGGG				
ActR	GCCACTTGATGCCGAGAAGG	VS-S9	TCCCCGAGGAGATTCAGA				
		ActR	ACGTCAGTGAAGCACCA	VS-AS9			
EF1α	qPCR			Cg-DMI	qPCR		
Actine	PCR classique			Owlg	qPCR		

V. Extension de l'ADNc par RACE-PCR

Afin de caractériser les extrémités 5' et 3' d'ADNc correspondant à des ARN même faiblement exprimés, des RACE-PCR ont été réalisées à l'aide du kit *Advantage® cDNA PCR Kit & Polymerase Mix* (Clontech®). La RACE-PCR (Figure 27) consiste à créer, aux extrémités de l'ADNc, un point d'ancrage artificiel en fixant un adaptateur à la séquence connue puis à amplifier les fragments inconnus avec une amorce interne de l'ADNc et une amorce correspondant au site d'ancrage.

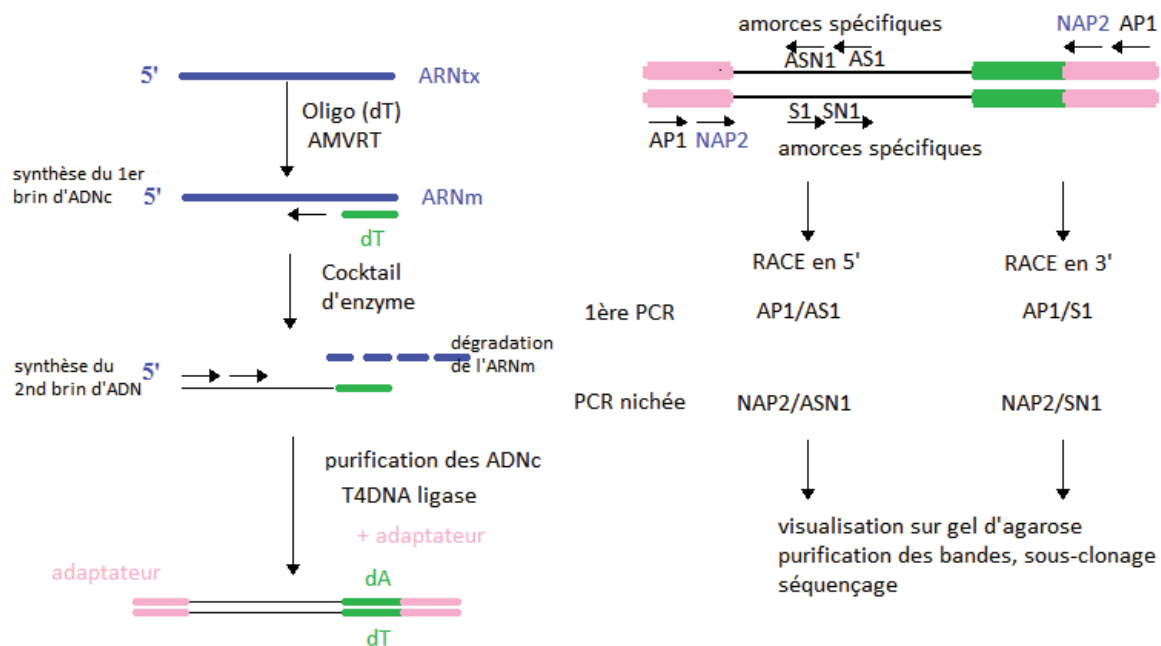


Figure 27 : Principe de la technique de RACE-PCR à l'aide du kit *Advantage® cDNA PCR Kit & Polymerase Mix* (Clontech®).

Extrémités 5'/3' : PCR1 : AP1 : adaptateur ; AS1: amorce anti-sens ; S1 : amorce sens – PCR nichée : NAP2 : adaptateur ; ASN1 : amorce anti-sens ; SN1 : amorce sens.

1. Synthèse du 1^{er} brin d'ADNc

La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée en incubant pendant 1 h à 42°C, 1 µg d'ARNm dans un mélange réactionnel de 10 µl contenant 20 U de transcriptase inverse AMVRT (*Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*) (Clontech®), 1 µM d'oligo (dT) ; 1 mM de dNTP et du tampon (50 mM Tris pH 8,5 ; 8 mM MgCl₂ ; 30 mM de KCl ; 1mM DTT).

2. Synthèse du 2^{ème} brin d'ADN

Le second brin d'ADN est synthétisé en incubant pendant 1 h 30 à 16°C, les 10 µl d'ADNc simple brin obtenus, dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant un mélange d'enzymes (24 U d'ADN polymérase d'*E. coli*, 5 U d'ADN ligase d'*E. coli* et 1 U de *RNase H* d'*E. coli*) et son tampon (100 mM KCl ; 10 mM de sulfate d'ammonium ; 5 mM MgCl₂ ; 0,15 mM Beta-NAD ; 20 mM Tris pH 7,5 ; 0,05 mg/ml BSA). L'ajout de 6 U d'ADN polymérase T4 pendant 45 min à 16°C permet ensuite d'obtenir des ADNc doubles brins à bouts francs. Les ADNc obtenus sont ensuite extraits par un mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (25 : 24 : 1) et une centrifugation de 10 min à 14000 rpm. Le surnagent est récupéré et une nouvelle extraction d'ADN est effectuée par un mélange chloroforme/isoamylalcool (24 : 1) et 10 min de centrifugation à 14000 rpm. Les ADNc sont ensuite précipités par l'ajout de 0,5 volume d'ammonium 4 M et de 2,5 volumes d'éthanol 95%. Le surnagent est soigneusement retiré et les culots sont lavés par une centrifugation de 10 min à 14000 rpm dans de l'éthanol 80%. Les culots sont séchés et repris dans 10 µl d'eau ultra pure.

3. Ligation des adaptateurs

La ligation des adaptateurs du kit de part et d'autre des brins formés est réalisée pendant une nuit à 16°C avec les 10 µl d'ADNc doubles brins purifiés dans un mélange réactionnel contenant 1 U de T4 DNA Ligase, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 mM d'ATP, 5% de polyéthylène glycol et 2 µM d'adaptateur Marathon. Enfin, le produit de la ligation est dilué au 1/250^{ème} dans un tampon Tricine/EDTA (10 mM Tricine-KOH pH 8,5 ; 0,1 mM EDTA) pour former la banque d'ADNc qui sera utilisée pour la RACE-PCR.

4. Amplification par PCR

Les RACE-PCR sont réalisées sur 5 µl d'ADNc de la banque dans un milieu réactionnel composé de 1 µl du mix *Advantage 2[®] DNA Polymerase* (1% Glycérol ; 0,3 mM Tris HCl pH 8 ; 1,5 mM KCl ; 1 µM EDTA pH 8 incluant la *TITANIUM KlenTaq-1 DNA polymerase* et le *TaqStart Antibody*) de 5 µl du tampon de l'enzyme (40 mM Tricine-KOH pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM Mg(OAc)₂ ; 3,75 µg/ml BSA ; 0,005% Tween 20 et 0,005% Nonidet-P40), de 1

μl de dNTP 10 mM, de 1 μl des amorces AP1 ou NAP2 du kit à 10 μM et de 1 μl de l'amorce spécifique du gène diluée à 10 μM , ici l'EST de SoxE (Tableau 7, SoxES1 et SoxESN1).

La première PCR est effectuée avec l'amorce AP1 couplée à l'une des deux amorces spécifiques SoxES1 afin d'amplifier la partie 3' de SoxE (la partie 5' étant connue). La PCR nichée est effectuée sur 1 μl d'une dilution au 1/50^{ème} des produits de la 1^{ère} PCR avec l'amorce NAP2 couplée à l'amorce spécifique nichée SoxESN1. La PCR est réalisée selon le programme suivant : 1 cycle de dénaturation (94°C, 30 s), 20-25 (PCR 1) ou 30-35 (PCR 2 nichée) cycles d'amplification (95°C, 30 s), 1 cycle incluant l'hybridation et l'élongation (68°C, 5 min). Les produits de RACE-PCR sont ensuite sous-clonés puis séquencés comme précédemment.

VI. Détection de duplex ARN/ARN : *RNase protection-based approach*

L'existence de duplex stables ARN/ARN a été appréhendée par une approche similaire au *RNase protection assay* (Figure 28). Des ARN totaux sont incubés avec de la *RNase A*, enzyme qui coupe uniquement les simples brins. Pour les échantillons, 10 μg d'ARN totaux ont été incubés dans un mélange réactionnel contenant 40 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM de MgCl_2 , 200 $\mu\text{g/ml}$ de *RNase A* (Sigma®) et 0.2 U/ μl de *DNase I RQ1* (Promega®), à 37°C pendant 30 min. En contrôle, 10 μg d'ARN totaux sont soit (i) mis en présence de 1 U/ μl de RNasin® (*Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*, Promega®) afin d'inhiber la *RNase A* (contrôle positif), soit (ii) dénaturés à 94°C pendant 5 min avant le traitement (contrôle négatif). Pour les 3 conditions, 1 μg d'ARN totaux traités sont rétro-transcrits avec 250 ng d'hexamères aléatoires. Puis les ADNc obtenus sont amplifiés avec des amorces situées à l'intérieur ou à l'extérieur de la région connue comme complémentaire. Un gène de référence, l'actine pour lequel, aucun duplex n'est attendu, est utilisé comme contrôle négatif dans les mêmes conditions, avec les primers ActF et ActR (Tableau 7). Les fragments obtenus sont sous-clonés et séquencés comme décrit dans un paragraphe suivant.

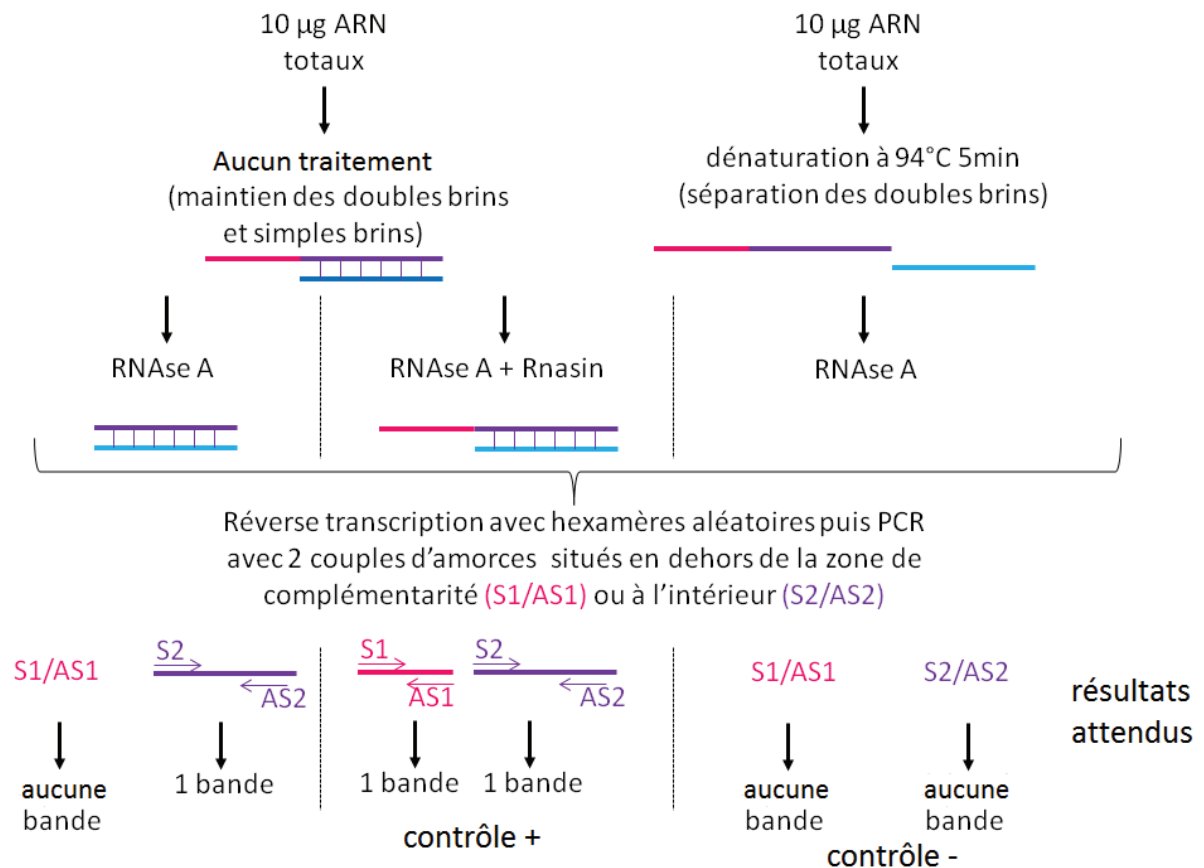


Figure 28 : Protocole de la détection de duplex ARN/ARN par *RNase protection-based approach*.

Si des duplex entre deux transcrits existent, ils sont préservés lors du traitement avec la *RNase A* et l'ADNc correspondant ne peut être amplifié qu'avec le couple d'amorces situé dans la zone de complémentarité. Pour le contrôle positif, les ARN doubles brins et simples brins sont préservés de la dégradation par la *RNase A* grâce à la *RNasin*. L'ADNc est donc amplifié quel que soit le couple d'amorces choisi (zone dans/hors complémentarité). Pour le contrôle négatif, les ARN dénaturés par la chaleur sont tous sous forme de simples brins et ainsi dégradés par la *RNase A*.

VII. Sous-clonage et séquençage

1. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose

Les produits de PCR sont purifiés à partir de gels d'agarose à l'aide du kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega®). Après migration de l'intégralité du produit PCR sur gel d'agarose contenant 0,1 mg/ml de bromure d'éthidium, chaque fragment d'intérêt est découpé sous UV à l'aide d'un scalpel stérile puis pesé. Chaque fragment est dissous à 65°C dans une solution de 4,5 M d'isothiocyanate de guanidine et 0,5 M d'acétate de potassium à pH 5,0 (100 µl de solution / 100 mg de bande excisée). L'ADN est ensuite purifié sur colonne, lavé et élué dans de l'eau bi-distillée stérile. La concentration d'ADN récupéré est évaluée au Nanodrop 2000 (ThermoScientific®).

2. Sous-clonage des fragments d'ADN

L'insertion de l'ADN des produits de PCR dans un vecteur est effectuée à l'aide du kit *TOPO TA cloning* (Invitrogen®) en présence de 20 ng d'ADN purifié, 5 ng de vecteur TOPO PCR II et de 1 µl de solution saline (1,2 M NaCl et 0,06 M MgCl₂) diluée au quart. Après une incubation de 5 à 15 min, la ligation est dessalée sur colonnes (1% d'agarose, 100 mM de glucose) pendant 30 min dans de la glace, avant l'étape d'électroporation.

3. Transformation de bactéries électro-compétentes

Vingt µl de bactéries électro-compétentes *Escherichia coli* (Invitrogen®) de la souche TOP10 sont utilisées pour la transformation de 10 µl du mélange de ligation dessalé par électroporation à 1,8 KVolts/Cm. Les bactéries sont ensuite immédiatement mises en culture dans du *SOC medium* (2% tryptone ; 0,5% extrait de levure ; 10 mM chlorure de sodium ; 2,5 mM chlorure de potassium ; 10 mM chlorure de magnésium ; 10 mM sulfate de magnésium sulfate ; 20 mM glucose) 1 h à 37°C sous agitation (150-200 rpm). Les colonies sont ensuite étalées sur des boîtes contenant du LB Agar 1% complétement en ampicilline à 50 µg/ml et 40 µl de X-Gal à 100 mM. Après 12 h de culture à 37°C, les colonies blanches isolées sont repiquées dans 5 ml de LB complétement en ampicilline à 50 µg/ml pendant 14 à 20 h dans des tubes à essais à 37°C et sous agitation (250 rpm) puis les plasmides sont extraits.

4. Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée à l'aide du kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega®). Les bactéries sont centrifugées à 4000 g pendant 10 min. Le culot bactérien est repris dans 250 µl d'une solution de re-suspension (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 100 µg/ml *RNAse A*) puis les bactéries sont lysées dans 250 µl d'un tampon de lyse (0,2 M NaOH ; 1% SDS) et 10 µl de protéase alcaline. Après incubation à température ambiante pendant 5 min, 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 mélange est centrifugé à 14000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est ensuite purifié sur colonnes puis lavé deux fois dans 700 puis 500 µl 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'ADN est élué dans 50 µl d'eau bi-distillée et sa concentration est évaluée au Nanodrop 2000 (ThermoScientific®)

5. Séquençage

Quinze µl d'ADN plasmidique dilué à 100 ng/µl sont séquencés par la société *Beckman Coulter Genomics* (Angleterre) (<http://www.beckmangenomics.com/>) grâce aux amorces universelles SP6 et T7 se fixant sur le plasmide aux 2 extrémités du fragment inséré.

VIII. Analyses informatiques des séquences

Les résultats de séquençage sont analysés et comparés par *BLAST* sur *Genbank* à la banque d'EST huître (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>) afin de vérifier le bon séquençage et/ou d'obtenir la séquence la plus longue possible par "contigage". La séquence est ensuite traduite dans les 6 cadres de lecture sur le site *Expasy* (<http://web.expasy.org/translate/>) et les séquences déduites sont comparées sur le site *NCBI Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de rechercher des homologues avec des protéines déjà caractérisées. L'alignement et l'identité entre les protéines obtenues chez *C. gigas* et leurs homologues identifiés chez des vertébrés et invertébrés ont été recherchés dans le programme *CLUSTALW* (THOMPSON *et al.* 1994). Les arbres phylogénétiques sont obtenus selon la méthode des plus proches voisins (SAITOU et NEI 1987) à l'aide du logiciel MEGA version 5 (TAMURA *et al.* 2011).

IX. RT-PCR quantitative en temps réel (*real time qRT-PCR*)

1. Principe

La PCR quantitative est une méthode d'amplification *in vitro* permettant la quantification relative en temps réel d'un taux d'expression des transcrits d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence ubiquitaire (facteur d'élongation par exemple). Cette technique implique l'incorporation d'un intercalant de l'ADN fluorescent, le *SYBR green* durant l'étape d'élongation et fait intervenir le concept de cycle seuil (Ct) ; c'est le nombre de cycles requis pour atteindre un signal d'émission de fluorescence significativement plus élevé que le bruit de fond au cours de la phase exponentielle d'amplification (Figure 29A). Le calcul des quantités relatives (QR) des transcrits du gène cible par rapport au gène de référence est basé sur la comparaison des cycles seuils et est donné par la formule $QR = 10 \times 2^{(Ct \text{ cible} - Ct \text{ ref})}$.

2. Validation et efficacité des couples d'amorces

La validité et l'efficacité des couples d'amorces utilisés sont testées par PCR sur une série de dilutions d'ADNc permettant d'obtenir (i) une courbe d'efficacité de 100% avec un coefficient de corrélation supérieur à 0.99 (Figure 29B) et (ii) une courbe de fusion vérifiant l'absence de dimérisation des amorces (Figure 29C).

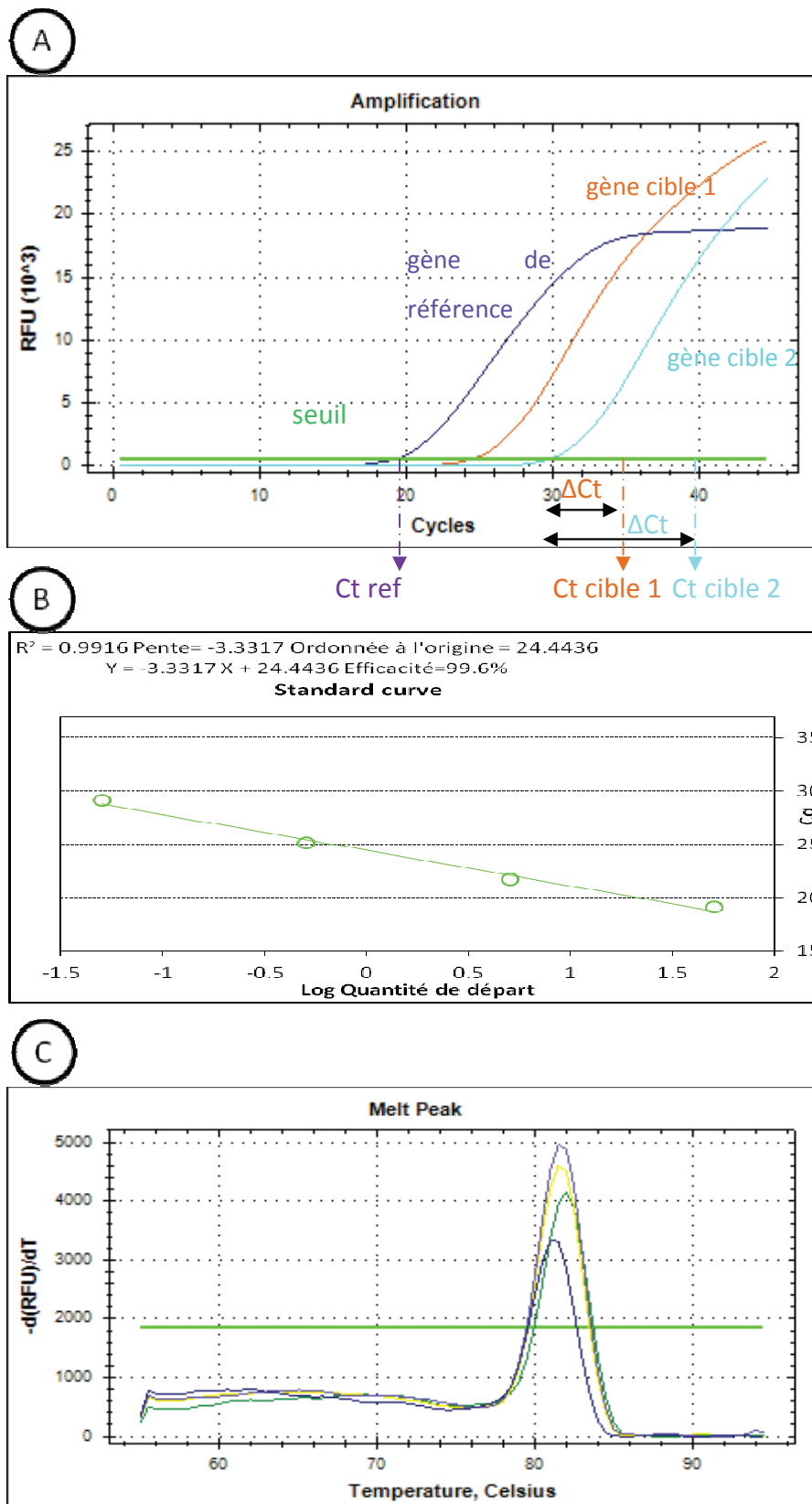


Figure 29 : (A) Exemple de courbe d'amplification. (B) Courbe d'efficacité d'amplification par qRT-PCR. Un coefficient de corrélation (R^2) proche de 1 atteste de l'efficacité d'amplification. (C) Dérivée de la courbe de fusion des amplicons. Elle permet de vérifier qu'il y a absence de dimérisation des amorces.

3. Préparation des plaques et amplification

Cinq μl d'ADNc dilués à $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ "équivalent ARN totaux" obtenus par rétrotranscription de 500 ng d'ARN totaux traités à la *DNase*, sont amplifiés dans 10 μl de mélange de PCR composé de 0,3 μl de chaque amorces diluée à $15 \mu\text{M}$, de 1,9 μl d'eau et de 7,5 μl de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega®). La préparation de la plaque est effectuée à l'aide du logiciel *epBlue ID software* associé au robot Eppendorf epMotion 5070 (Figure 30) afin d'augmenter la précision de chaque dépôt. L'amplification est réalisée par le *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* avec le programme suivant : 15 min à 95°C puis 45 cycles (15 s/ 95°C , 45 s/ 60°C). L'analyse de la courbe de fusion des produits d'amplification est réalisée de 55 à 95°C à raison de 80 cycles avec une augmentation de $0,5^\circ\text{C}$ par cycle. Pour permettre une normalisation des données d'expression, une amplification des mêmes échantillons est réalisée dans les mêmes conditions mais avec les amorces du facteur d'élongation servant de gène de référence pour l'huître. Un témoin négatif (eau) et l'équivalent de chaque échantillon non-rétro-transcrit (mais traité à la *DNase*) sont également utilisés afin d'exclure une éventuelle contamination des réactifs.

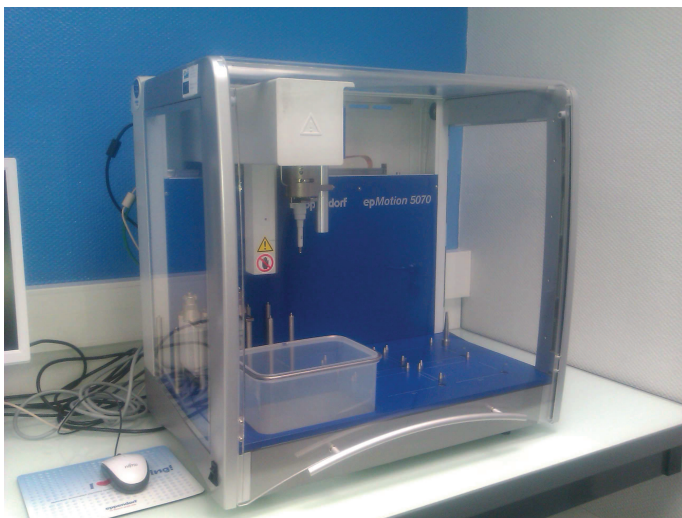


Figure 30 : Photo de l'automate EpiMotion 5070 permettant la précision de remplissage des plaques de PCR.

4. Analyse statistiques des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne des séries expérimentales plus ou moins l'écart à la moyenne ($x \pm \text{SEM}$) 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 $p < 0,05$.

X. Hybridation *in situ*

1. Synthèse des sondes

✓ Synthèse des sondes

Un ADNc de chaque gène de taille comprise entre 500 et 1500 pb est amplifié avec des amorces spécifiques (Tableau 7) selon un protocole classique (IV.4). Les produits PCR sont ensuite clonés dans un vecteur PCR II-TOPO (Invitrogen®) (VII 2). Deux cent ng de plasmides obtenus sont ensuite linéarisés par PCR avec les amorces M13F (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') et M13R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') spécifiques du plasmide puis les produits PCR sont purifiés par le kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega®). Un µg de produit PCR purifié est ensuite utilisé comme matrice pour la synthèse des ribosondes marquées au DIG-11-UTP (Roche Diagnostics®) par transcription *in vitro*. La réaction se déroule pendant 3 h à 37°C dans 25 µl d'un mélange réactionnel composé de 1 mM d'ATP, GTP, CTP ; 0,65 mM d'UTP ; 0,35 mM de DIG-11-UTP, 10 mM de DTT, 5 µl de tampon 5X de réaction de l'enzyme, 25 U de *RNasin* (Promega®) et de SP6 ou T7 ARN polymérase (selon le sens de la sonde synthétisée). L'ADN matrice est ensuite éliminé avec 1 U de *DNase I RQ1 RNase free* pendant 30 min à 37°C puis cette dernière est inactivée par de l'EDTA 50 mM pH 8 pendant 15 min à 65°C. Les sondes sont purifiées sur des colonnes *Probequant G50* (GE HealthCare®) et stockées à -80°C et quantifiées au Nanodrop 2000.

✓ Vérification de la spécificité de fixation de l'anticorps à la sonde

La spécificité d'hybridation des sondes est vérifiée par *Dot Blot* (Figure 31). Plusieurs dilutions de sondes (par pas de 1/10^{ème}) dans un tampon (H₂O DEPC/SSC 20X/Formaldéhyde, 5 : 3 : 2) sont déposées sur une membrane de nylon chargée positivement (GE Healthcare®). En parallèle, plusieurs dilutions d'un ARN contrôle marqué au DIG11-UTP sont également déposées (témoin). Les divers ARN sont fixés à la membrane par une incubation de 30 min à 120°C. La révélation se fait par plusieurs bains successifs : (i) 5 min dans un tampon de lavage (0,1 M acide maléique ; 0,15 M NaCl, pH 7,5 ; 0,3% P/V Tween 20) ; (ii) 30 min dans un tampon de blocage [10% *Blocking Reagent* dilué dans un tampon d'acide maléique (0,1M acide maléique ; 0,15 M NaCl ; pH 7,5)] ; (iii) 30 min avec une solution d'anticorps anti-DIG AP, *Fab fragment* (Roche Diagnostics®) dilué au 1/5000^{ème} dans le tampon de blocage ; (iv) 2

x 15 min dans du tampon de lavage ; (v) 5 min dans du tampon de détection (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5). La révélation est effectuée avec 5 ml de solution substrat de NBT/BCIP (Roche Diagnostics®) diluée au 1/50^{ème} dans du tampon de détection.

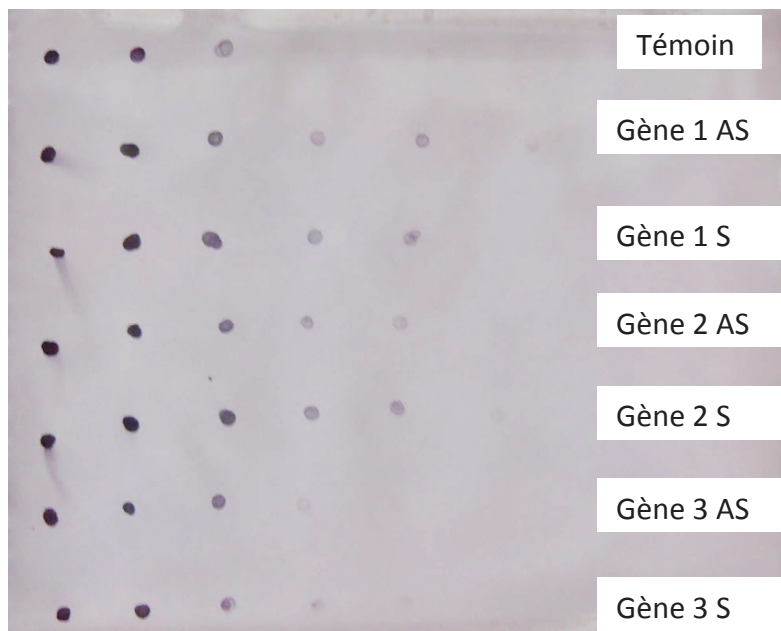


Figure 31 : Exemple de *Dot Blot* des sondes pour l'hybridation *in situ*.

La bonne spécificité d'hybridation de l'anticorps anti-DIG est vérifiée pour les sondes ARN marquées à la digoxigénine en parallèle d'un ARN témoin marqué de concentration connue.

2. Hybridation des sondes et révélation

L'hybridation *in situ* permet de localiser des ARNm sur une coupe de tissu. Une sonde marquée avec un haptène (ici, la digoxigénine, DIG) s'hybride de manière spécifique à l'ARN cible complémentaire présent sur la coupe. L'haptène est reconnu par un anticorps couplé à une enzyme, la phosphatase alcaline, qui transforme son substrat en un précipité bleu (Figure 32). Cette hybridation exige des conditions *RNase free* et donc un traitement au préalable du matériel et de la verrerie utilisée au DEPC afin de détruire les *RNases*.

Des coupes en paraffine de 3 µm d'épaisseur sont déparaffinées dans du *Rotihistol*® (5 min) puis réhydratées dans des bains d'alcool de concentration décroissante [100% (x2), 96 et 70%] puis dans 2 bains de PBS 1X de 5 min chacun. Les tissus sont ensuite perméabilisés avec de la protéinase K (5 µg/ml dans du TE Buffer (137 mM NaCl ; 25 mM Tris-Base ; 2,7 mM KCl, pH 7,4) à 37°C pendant 10 min et post-fixé dans du PFA 4% dans du PBS pendant 7 min à température ambiante. Les coupes sont ensuite pré-hybridées avec 200 µl de tampon d'hybridation (50% v/v formamide déionisé, SSC 4X, 2 mM EDTA pH 8,

Denhardt 1X, 10% Dextran Sulfate, 0,5 mg/ml tRNA) pendant au moins 1 h à 50°C. L'hybridation est ensuite réalisée à 55°C pendant 16 h, avec 300 ng/ml des sondes sens ou anti-sens marquées à la digoxigénine, diluées dans du tampon d'hybridation. Après des lavages intensifs avec du SSC 2X (5 min), du SSC 0,2X avec 60% de formamide à 55°C (3x5 min) et du SSC 2X (2x5 min), les coupes sont incubées pendant 30 min dans un tampon de blocage (10% *Blocking Reagent*) puis pendant 2 h avec un d'anticorps anti-DIG AP, *Fab fragment* (Roche Diagnostics®) conjugué à la phosphatase alcaline (dilué au 1/2000^{ème} dans du tampon de blocage). Les lames sont ensuite rincées par 2 bains de 5 min dans une solution saline (Tris-HCl, pH 7,5 ; 150 mM NaCl) et un bain de 10 min dans du tampon de détection (Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl). La révélation est réalisée pendant 2 à 4 h dans un tampon de détection complété avec du NBT/BCIP et du lévamisole afin de diminuer le marquage non spécifique (0,34 mg/ml NBT, 0,18 mg/ml BCIP, 240 µg lévamisole/ml) à température ambiante à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée dans un bain de Tris-EDTA (10 mM Tris ; 1 mM EDTA). Les coupes sont ensuite déshydratées, plongées dans le Rotihistol® et montées dans une résine solide le Rotihisto-Kit®.

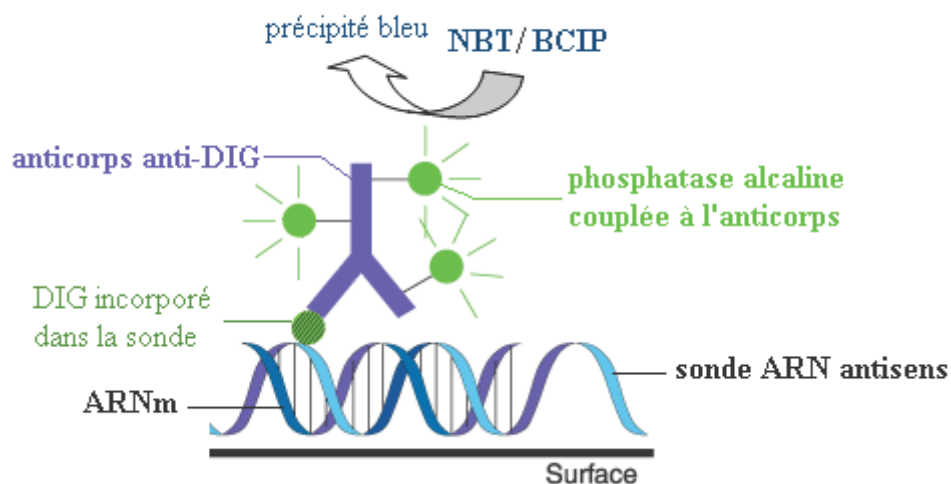


Figure 32 : Principe de l'hybridation *in situ*.

DIG : Digoxigénine ; NBT/BCIP : Nitro-Blue Tetrazolium / 5-Bromo-4-Chloro-3'-IndolyPhosphate.

XI. Techniques classiques de protéomique utilisées pour les résultats en annexes

1. Immunohistochimie en fluorescence indirecte (Cg- β -caténine)

La protéine Cg- β -caténine est reconnue spécifiquement par un anticorps primaire hétérologue dirigé contre le peptide PGDSNQLAWFDTDL de la β -caténine de mammifères (Abcam® ab6302) et synthétisé chez le lapin. Afin de mettre en évidence la formation du complexe antigène-anticorps primaire et d'amplifier le signal, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et qui reconnaît la partie commune de l'anticorps primaire est utilisé (Figure 33).

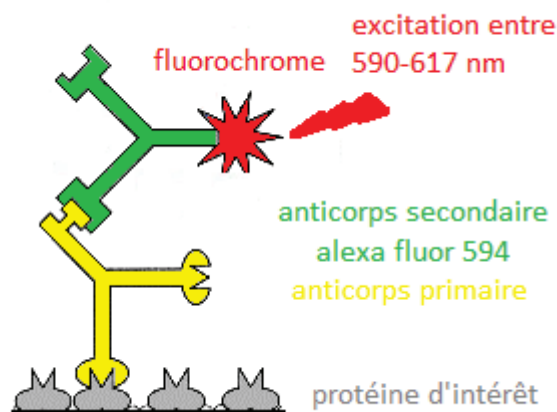


Figure 33 : Principe de l'immunohistochimie en fluorescence indirecte.

Des coupes de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2135) puis montées sur lames poly-L-lysines (Polysine™, VWR International®). Les lames sont dans un premier temps déparaffinées dans deux bains de *Rotihisto*® de 5 min, suivis de deux bains de 5 min dans l'éthanol absolu. Ensuite, les lames sont réhydratées dans des bains de 5 min d'éthanol de concentration décroissante (96 puis 70%) puis rincées dans un bain de PBS 1X. Les épitopes sont démasqués en passant les lames 2 min au four à micro-ondes (560 W) dans du tampon citrate 10 mM puis en les laissant refroidir très lentement dans ce tampon à température ambiante pendant 2 h. Les lames sont ensuite lavées dans un bain de PBS 1X de 5 min. Puis les tissus sont perméabilisés par 2 bains de 10 min de solution A (0,01 mM Tween 20 ; 150 mM NaCl dans du PBS 0.5X, pH 7,3). Afin d'éviter l'autofluorescence, les groupes aldéhydes libres sont masqués par un bain de 5 min de solution B (50 mM NH_4Cl dans du PBS

1X, pH 7,3). Les lames sont ensuite lavées dans 2 bains de 5 min de PBS 1X et les tissus subissent une seconde perméabilisation de 4 min au Triton X-100 1%. Afin d'améliorer la qualité du signal, les coupes sont ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante avec un amplificateur (*image-ITTM FX Signal Enhancer*, Invitrogen®) puis rincées dans 4 bains de 5 min de PBS 1X. Les coupes sont ensuite incubées avec de la solution de blocage (1% BSA, 0,1% gélatine dans du PBS 1X, pH 7,3) pendant 10 min à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps primaire dilué au 1/50^{ème} dans de la solution de blocage a lieu une nuit à 4°C. Les lames sont ensuite abondamment lavées par 6 bains de 5 min de PBS 1X afin d'enlever l'anticorps qui se serait fixé de manière non-spécifique, puis elles sont incubées avec l'anticorps secondaire (*Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG A-11037*) dilué au 1/750^{ème} dans du PBS 1X pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont ensuite rincées (toujours à l'obscurité) par 6 bains de 5 min de PBS 1X puis elles sont montées en milieu liquide dans du *ProLong Gold antifade reagent* (Invitrogen®) couplé à du Dapi afin de colorer les noyaux. Les lames sont ensuite conservées à 4°C.

2. Immunohistochimie classique (Cg-Foxl2)

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2135) puis sont montées sur des lames poly L-lysines (Polysine™, VWR International®). Les coupes sont ensuite déparaffinées dans du *Rotihistol*®, plongées pendant 30 min dans un mélange méthanol-eau oxygénée (77/33%) afin d'inhiber les peroxydases endogènes, puis réhydratées dans des bains d'éthanol. Afin de faciliter l'accès de l'anticorps à la protéine, les tissus sont ensuite perméabilisés à l'aide d'un détergeant Triton-X100 1% pendant 4 min. Les épitopes sont démasqués par chauffage au four micro-onde (560W) dans du tampon citrate 10 mM pendant 2 min. Après un refroidissement très lent de 2 h à température ambiante et deux rinçages, les lames sont incubées avec 175 µl d'anticorps primaire (anticorps anti-Cg-Foxl2 homologue 1/10^{ème}-1/2000^{ème}) dilué dans du tampon Tris 50 mM/NaCl 50 mM, pH 7,4 pendant une nuit à 4°C dans une chambre humide hermétique. Après plusieurs rinçages, les lames sont incubées avec 200 µl d'anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de lapin couplé à la peroxydase (Dako® – PO399) dilué au 1/100^{ème} dans le même tampon que l'anticorps primaire pendant 1 h à 37°C, puis rincées. La révélation se fait avec 200 µl de 3-3 Diaminobenzidinetétrahydrochloride (DAB SIGMA Fast™ 3,3, Sigma®) à l'obscurité pendant 5

à 30 min selon l'anticorps. Après rinçage, les coupes sont déshydratées à l'éthanol 100%, contre-colorées au vert lumière à 0,2% puis montées dans une résine Rotihisto-kit® après un dernier bain de 5 min dans du *Rotihisto*®. Les contrôles négatifs sont réalisés sans anticorps primaire ou en pré-incubant l'anticorps primaire avec 50 µg/ml de chaque peptide immunogène ou un mélange des deux pendant une nuit à 4°C.

3. Western Blotting, immunoprécipitation et spectrométrie de masse en tandem MS/MS (Cg-Foxl2)

✓ Western Blotting

Extraction des protéines

Des échantillons d'aires gonadiques congelés à l'azote liquide et conservés au -80°C sont broyés dans de l'azote liquide puis lysés dans 2,5 ml de tampon de lyse (jusqu'à 500 mg de tissus) (20 mM Hepes pH 7,5 ; 1 mM EDTA ; 5 mM DTT ; 1 mM AEBSF ; 0,01 mM E64). Après incubation 15 min sur la glace, les échantillons sont centrifugés à 4°C à 15000 g et le surnageant est récupéré. Les échantillons sont ensuite ultra centrifugés à 105000 g à 4°C puis concentrés sur Microcons (Millipore®) selon le protocole du fournisseur. Les protéines sont ensuite dosées avec le Kit *2D-Quant Kit* (Millipore®) selon le protocole du fournisseur.

Western Blotting

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE, à l'aide d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide/bisacrylamide et d'un gel de séparation à 12% d'acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%). Les échantillons, repris dans du tampon 5X SDS/PAGE (250 µl de Tris-HCl 1 M ; 100 mg de SDS ; 5 mg de bleu de bromophénol, 500 µl de glycérol, qsp 1 ml d'eau bi-distillée) (v/v : 5 : 1), sont chauffés 5 min à 90°C afin de dénaturer les protéines. Cinquante µg de protéines et 5 µl d'un marqueur de taille (*Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers*, GE Healthcare®). La migration a lieu en tampon de migration (Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 3,5 mM, pH 7,4) à 70 V jusqu'à ce que le marqueur et les échantillons pénètrent dans le gel de séparation puis à 150 V jusqu'à la fin de la migration.

La membrane de transfert (Hybond-P, Amersham®) est incubée dans du méthanol, réhydratée dans de l'eau bi-distillée puis immergée 5 min 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 0,04 A pendant une nuit à 4°C. Après rééquilibrage de la membrane dans du méthanol, de l'eau bi-distillée puis du PBS 1X, les sites non-spécifiques sont saturés durant 1 h dans une solution de saturation constituée de lait écrémé à 4% dans du PBS 1X. La membrane est ensuite incubée pendant 2 h avec l'anticorps primaire (anticorps anti-Cg-Foxl2 homologue 1/500^{ème} ; anticorps hétérologue dirigé contre le domaine *forkhead* humain 1/50^{ème}, RayBiotech®) dans la solution de saturation. Suite à des rinçages en tampon Tween 20 0,015%/PBS 1X, la membrane est incubée pendant 2h avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de lapin (Dako® PO399) ou de souris (Dako® PO260), couplé à une peroxydase, dilué à 1 µg/ml dans la solution de saturation. Une fois rincée 3x5 min dans du PBS 1X, la membrane est révélée pendant 5 à 10 min dans la solution contenant du DAB (3-3 Diaminobenzidinetétrahydrochloride) (DAB SIGMA Fast™ 3,3, Sigma®). La réaction est stoppée avec du PBS 1X.

✓ Immunoprécipitation

Les protéines (500 µg) sont reprise dans 1 ml de tampon RIPA supplémenté avec 0,1 mg PMSF, 0,01 mg de protine A, 1mM d'ortovanadate de sodium puis elles sont incubées avec 10 µl d'anticorps primaire homologue anti-Cg-Foxl2 pendant 1 h à 4°C. Après ajout de 20 µl du réactif d'immunoprécipitation *Protein A/G Plus-Agarose* (Santacruz®), elles sont incubées toute la nuit à 4°C sous agitation. Le mélange est ensuite centrifugé à 1000g pendant 5 min à 4°C afin de culoter le complexe anticorps-protéine-billes. Le culot est lavé 3 fois avec 1 ml de PBS 1X puis repris dans 40 µl de Tampon d'électrophorèse 2X (1 ml de glycérol ; 3 ml de SDS 10% ; 1,25 ml Tris-HCl 1 M pH 6,7 ; 2 mg de bleu de bromophénol ; 5 mg de DTT). Le mélange est dénaturé à 95°C afin de séparer le complexe puis le produit de l'immunoprécipitation est divisé en deux pools séparés individuellement par SDS-PAGE, à l'aide d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide/bisacrylamide et d'un gel de séparation à 12% d'acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%). Après migration, le gel correspondant au 1^{er} pool est transféré sur membrane PVDF (*PolyVinylidene DiFluoride*) (Hybond-P, Amersham®) selon le protocole de *Western Blotting* et la membrane est marquée de la même façon qu'un

Western Blotting. Le gel correspondant au 2^{ème} pool est coloré au bleu de Coomassie pendant 2 h. Après décoloration dans de l'eau PPI (pour préparation injectable), la bande d'intérêt est découpée et préparée pour la spectrométrie MS/MS.

✓ Spectrométrie de masse en tandem MS/MS

Le gel découpé contenant la bande d'intérêt est lavé avec 200 µl de solution A (50% d'acétonitrile ; 25 mM de bicarbonate d'ammonium) pendant 30 min puis rincé dans 200 µl d'eau PPI. Il est ensuite lavé dans 200 µl d'acétonitrile pendant 15 min. Le surnageant est retiré et le gel est séché au *Speed Vac* pendant 5 min puis incubé dans 200 µl d'eau oxygénée 7% (v/v) pendant 15 min. Le surnageant est de nouveau retiré et le gel est rincé dans 200 µl d'eau PPI, puis dans 200 µl d'acétonitrile et à nouveau séché au *Speed Vac*. Afin de digérer les peptides du gel, ce dernier est ensuite incubé avec 25 µl d'une solution contenant 0,15 µg de trypsine dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM pendant 15 min à 4°C. Puis 30 µl de bicarbonate d'ammonium sont ajoutés afin d'avoir un excédent de tampon et le mélange est incubé à 37°C pendant une nuit. Après avoir transféré le surnageant de digestion, 30 µl d'acétonitrile à 50% sont ajoutés sur le gel afin d'extraire les peptides pendant 15 min. Les échantillons sont soniqués 5 min puis centrifugés pendant 30 s. Le surnageant est récupéré, rajouté au surnageant de digestion et séché au *Speed Vac*. Le gel est incubé avec 30 µl d'acide formique 5% pendant 15 min puis le mélange est de nouveau soniqué 5 min, centrifugé pendant 30 s puis le surnageant est de nouveau rajouté au précédent et séché au *Speed Vac*. Enfin le gel est incubé dans 30 µl d'acétonitrile pendant 15 min, soniqué 5 min et centrifugé. Le surnageant est de nouveau récupéré après centrifugation et ajouté aux précédents avant séchage. L'échantillon est conservé à 4°C ou - 20°C en attendant le passage en spectrométrie MS/MS à la plateforme Proteogen.

XII. 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).

Chapitre 1:

Sélection des acteurs du déterminisme sexuel
les plus pertinents à étudier

Lors de cette thèse, nous avons tout d'abord sélectionné les facteurs moléculaires potentiels du déterminisme sexuel adulte qui nous semblaient les plus pertinents à étudier. Ces facteurs sont également susceptibles d'intervenir lors de la première mise en place gonadique. Ne disposant pas du génome de l'huître au début de ce travail, nous avons entrepris une étude par comparaison de séquences entre des facteurs connus des cascades des vertébrés/invertébrés avec les EST de l'huître, et en se basant sur des profils d'expressions intéressants obtenus par puces à ADN chez *C. gigas*. Ces *microarrays* ont été réalisés sur près de 30000 EST provenant de la banque de données publique *GigasDatabase* (FLEURY *et al.* 2009 ; DHEILLY *et al.* 2012). Le transcriptome de l'aire gonadique de 32 individus adultes représentant les 4 stades gamétogénétiques (de 0 à III) et les 2 sexes a alors été caractérisé (DHEILLY *et al.* 2012).

L'objectif de ce travail *in silico* était alors double. L'étude des données acquises devait permettre d'une part de valider (et éventuellement préciser) les résultats déjà obtenus en PCR en temps réel pour les gènes précédemment caractérisés chez l'huître, notamment Cg-DMI et Cg-Foxl2 impliqués dans le déterminisme sexuel ou la différenciation gonadique respectivement mâle et femelle (NAIMI *et al.* 2009a ; b). D'autre part, elle avait pour rôle de mettre en avant de nouveaux facteurs susceptibles d'intervenir dans ces processus et qui seraient alors ultérieurement étudiés lors du cycle gamétogénétique adulte et lors du développement.

I. Comparaison des profils d'expressions par puces à ADN et en PCR en temps réel

Dans un premier temps, les expressions obtenues par *microarrays* sur 32 individus répartis sur l'ensemble du cycle gamétogénétique mâle et femelle (Figure 34) ont été comparées aux résultats obtenus par PCR en temps réel pour les 2 facteurs déjà caractérisés chez l'huître et susceptibles de participer à la différenciation gonadique, Cg-Foxl2 et Cg-DMI (Naimi *et al.* 2009a ; b).

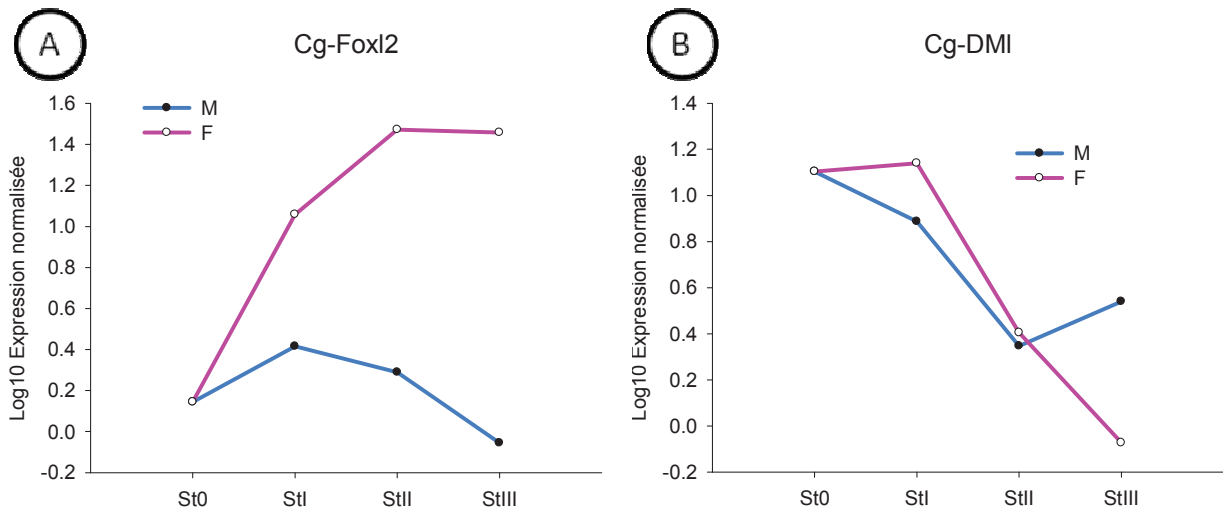


Figure 34 : Expression gonadique de Cg-Foxl2 (A) et de Cg-DMI (B) par puces à ADN sur un cycle gamétogénétique adulte.

n=8 pour les stades 0 ; n=4 pour les stades I, II et III ; st : stade gamétogénétique.

L'expression de Cg-Foxl2 mesurée par *microarray* (Figure 34A) est comparable, chez les femelles à celle précédemment observée en PCR en temps réel, avec une expression élevée observée aux stades II et III. Cependant, aucune expression n'est ici observée chez les mâles contrairement à ce qui avait été détecté précédemment (NAIMI *et al.* 2009b). Ceci s'explique essentiellement par la présence d'un ARN anti-sens naturel de Cg-Foxl2 qui s'exprime principalement chez les mâles et qui n'est pas détecté par le principe des puces à ADN. L'étude de cet ARN anti-sens naturel sera abordée dans le chapitre 3.

En ce qui concerne Cg-DMI, son expression mesurée par puces à ADN (Figure 34B) ne présente pas le même profil que celui observé en PCR en temps réel par NAIMI et collaborateurs (2009a). En effet, l'expression de ce facteur est maximale au stade III chez les mâles pour ces auteurs alors qu'elle l'est au stade 0 de repos sexuel par puces à ADN. Une des explications possible est que les animaux utilisés pour la PCR en temps réel, qui présentaient une ponte partielle, ont été assimilés à une fin de stade III alors qu'ils sont aussi en début de reprise de cycle gamétogénétique assimilable à un début de stade 0. Pour confirmer cette idée, l'expression de Cg-DMI a été à nouveau mesurée par PCR en temps réel sur des animaux en stades 0 ainsi qu'en stades III mâle et femelle (Figure 35).

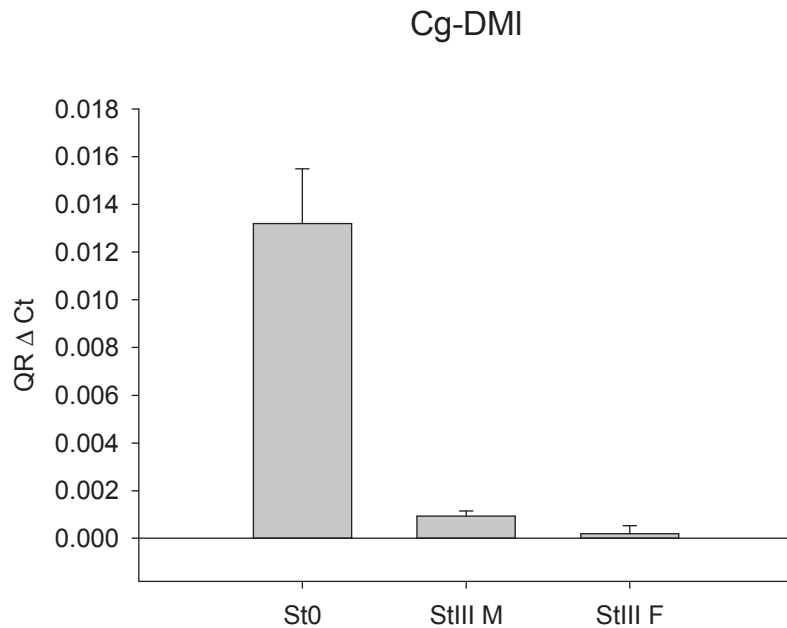


Figure 35 : Expression gonadique de Cg-DMI par PCR en temps réel chez les stades 0, III mâle et III femelle.

n=6 pour les stades testés, 0 et III ; st : stade gamétogénétique ; M : mâle ; F : femelle.

Comme attendu, Cg-DMI est plus fortement exprimé au stade 0 qu'aux stades III mâle et femelle. Ces nouveaux résultats sont maintenant en accord avec ceux observés par puces à ADN et confirment donc le pic d'expression de Cg-DMI au stade 0 du cycle gamétogénétique adulte. Ils peuvent suggérer, comme c'est le cas chez de nombreux vertébrés (HERPIN et SCHARTL 2011), un rôle précoce de Cg-DMI chez l'huître. Cg-DMI serait donc impliqué dans la différenciation testiculaire mais il n'est pas non plus exclu qu'il intervienne plus tôt, dans le déterminisme sexuel.

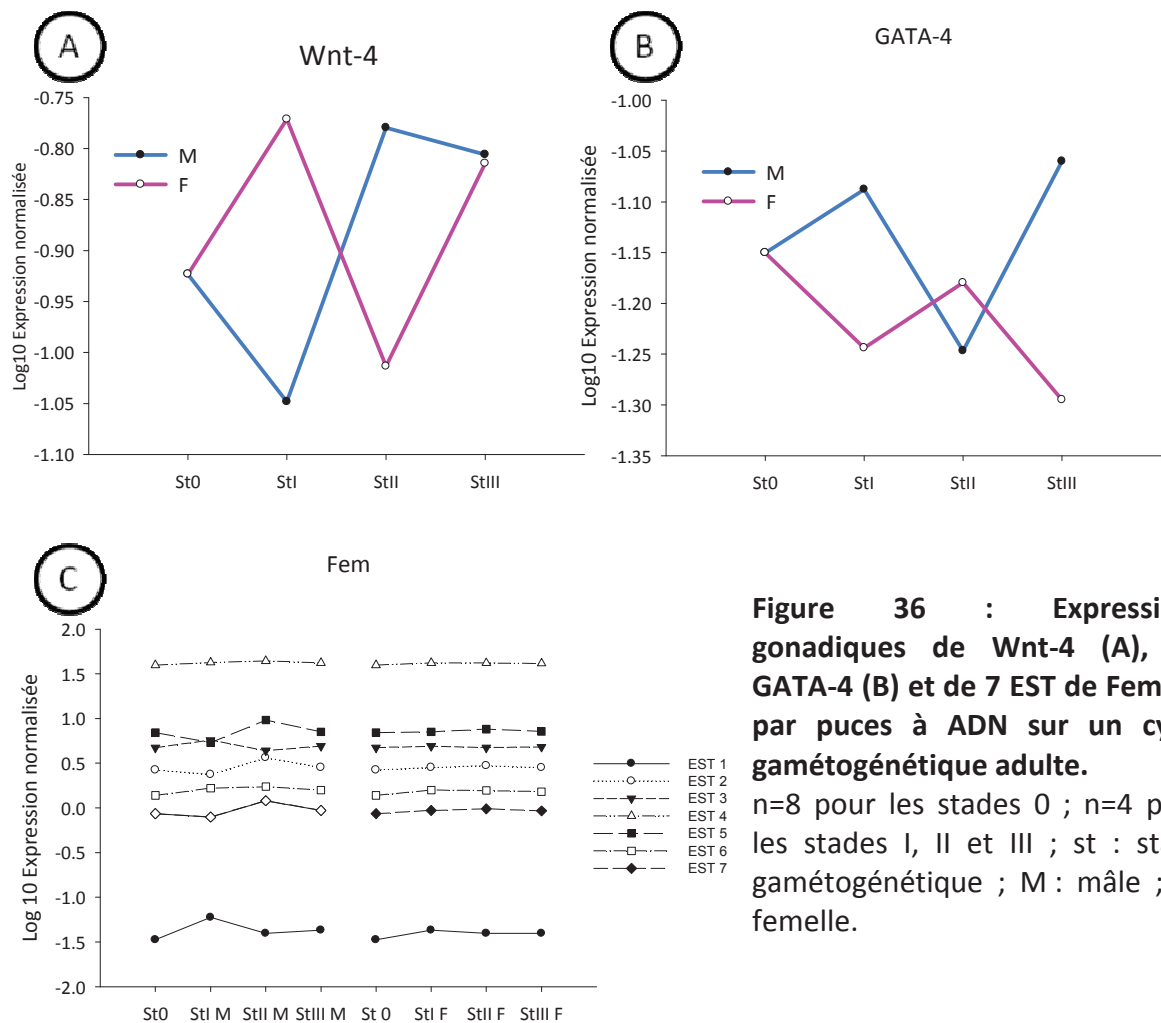
L'expression de Cg-DMI et Cg-Foxl2, mesurée en PCR en temps réel lors du développement de l'huître, sera également abordée dans le Chapitre 4 qui illustre l'influence de la température sur la détermination sexuelle chez *C. gigas* lors de la première mise en place gonadique.

II. Sélection de nouveaux acteurs potentiels du déterminisme sexuel chez l'huître

Dans un second temps, nous avons sélectionné des nouveaux acteurs potentiels du déterminisme sexuel de l'huître. Trois groupes de candidats potentiels sont apparus : (i) des acteurs dont les EST sont présentes dans la banque de *C. gigas*, orthologues d'acteurs conservés des cascades du déterminisme sexuel de vertébrés et d'invertébrés et qui présentent des profils d'expression intéressants chez l'huître par puces à ADN ; (ii) des

orthologues avec des profils d'expression plus atypiques ; (iii) des facteurs inconnus et qui présentent des profils d'expression intéressants chez l'huître par puces à ADN. Le troisième groupe n'a pas fait l'objet d'études plus approfondies pour le moment. Dans les deux premiers groupes sont retrouvés des EST nommées Wnt-4, GATA-4, Fem, SoxB1, SoxE, Dax-1 et β -Caténine en fonction de leur homologie avec ces facteurs (ou des représentants de ces familles de facteurs) qui conservés chez les vertébrés et invertébrés.

1. ESTs de Wnt-4, GATA-4 et Fem



L'expression de l'EST Wnt-4 (Figure 36A) est très variable au cours du cycle gamétogénétique adulte rendant difficile d'appréhender son rôle chez l'huître. Une expression prédominante de Wnt-4 dans l'ovaire a été observée chez de nombreux mammifères, aussi bien placentaires comme l'homme (JÄÄSKELÄINEN *et al.* 2010), la souris

(VAINIO *et al.* 1999) ou la chèvre (PAILHOUX *et al.* 2002), que marsupiaux comme le wallaby (Yu *et al.* 2006). Quelques études réalisées chez d'autres vertébrés non-mammaliens suggèrent un rôle moins conservé de ce facteur, avec une expression sexuelle dimorphique retrouvée chez le poulet (SMITH *et al.* 2008) ou le lézard (TRIPATHI et RAMAN 2010) mais pas chez la tortue (SHOEMAKER *et al.* 2007), la grenouille (OSHIMA *et al.* 2005) ou encore la truite (NICOL *et al.* 2012). Chez ces dernières espèces, son absence d'expression dimorphique associée au rôle mineur du facteur Fgf9, suggèrerait non pas un rôle dans l'initiation de la différenciation gonadique mais plutôt dans le développement testiculaire et ovarien (NICOL *et al.* 2012). Aussi chez l'huître, l'absence d'expression dimorphique de Wnt-4 et l'absence d'identification d'EST Fgf9 nous ont conduits à ne pas le sélectionner pour une étude plus approfondie.

Chez l'huître, l'expression de l'EST GATA-4 (Figure 36B), est, à l'image de celle Wnt-4 (Figure 36A), très irrégulière au cours du cycle gamétogénétique. Chez les mammifères, GATA-4 est connu pour réguler directement Sry et l'Amh en association avec Wt1 (MIYAMOTO *et al.* 2008) et ainsi pouvoir activer la différenciation testiculaire. Cependant, il est exprimé chez l'adulte des deux sexes. Chez les espèces non-mammaliennes, il a été peu étudié mais une expression au cours du développement et chez l'adulte des deux sexes est retrouvée chez le poulet (OREAL *et al.* 2002), la grenouille (KELLEY *et al.* 1993) et le tilapia (LI *et al.* 2012), suggérant ainsi un rôle durant tout le développement gonadique et pas seulement à son initiation. Ainsi, chez l'huître, l'expression variable de GATA-4 retrouvée chez les deux sexes nous a conduits à ne pas le sélectionner pour une étude plus approfondie.

Les 7 EST d'un ou de plusieurs orthologues de Fem ne montrent aucune variation d'expression au cours du cycle gamétogénétique adulte chez l'huître (Figure 36C). Les facteurs Fem sont connus chez le nématode pour inhiber l'activité de Tra-1 dans les cellules germinales et inhiber l'expression de Fog-3 pour ainsi favoriser un développement gonadique mâle (CHEN et ELLIS 2000). Chez l'huître, l'absence de pic d'expression de ces orthologues de Fem, associée au fait qu'aucun facteur Fog et Tra n'a été identifié parmi les EST de *C. gigas*, nous ont conduits à ne pas les sélectionner pour une étude plus approfondie.

2. ESTs de SoxB1 et SoxE

SoxE est une famille de facteurs Sox à laquelle appartient Sox9 alors que Sox3 appartient à la famille SoxB1. Chez l'huître, les expressions de l'EST SoxE (Figure 37A) et de l'EST SoxB1 (Figure 37B) sont similaires, avec un pic en stade 0 de repos sexuel et une diminution au cours du cycle gamétogénétique chez les mâles comme chez les femelles.

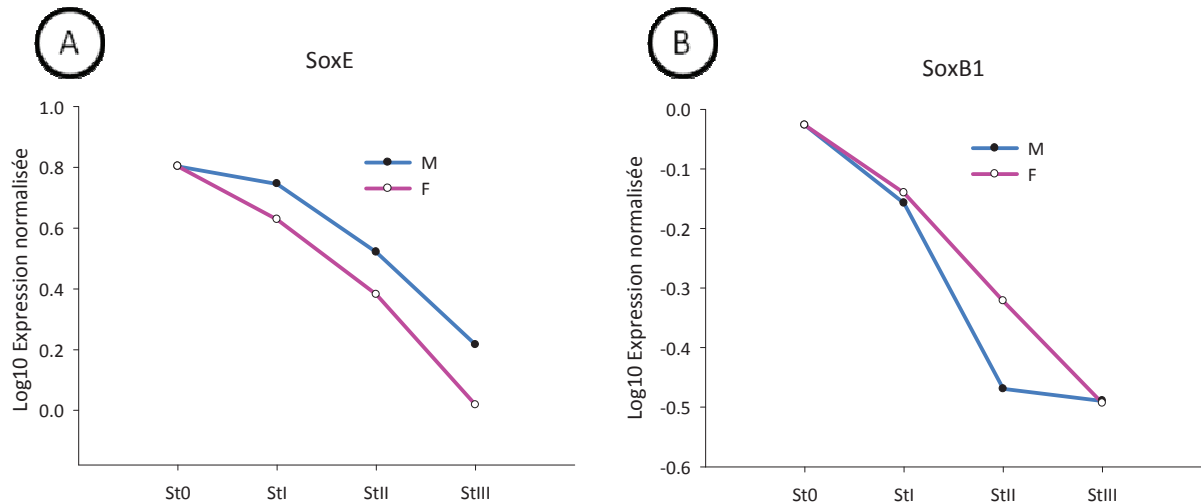


Figure 37 : Expressions gonadiques de SoxE (A) et de SoxB1 (B) par puces à ADN sur un cycle gamétogénétique adulte.

n=8 pour les stades 0 ; n=4 pour les stades I, II et III ; st : stade gamétogénétique ; M : mâle ; F : femelle.

Sox9 est un acteur majeur du déterminisme sexuel ou de la différenciation gonadique mâle chez de nombreux vertébrés et invertébrés (KENT *et al.* 1996 ; NANDA *et al.* 2009). Les deux autres facteurs de la famille SoxE, Sox8 et Sox10, semblent être redondants au cours de la différenciation gonadique et sont capables d'assurer une partie de la fonction de Sox9 en cas de défaut de ce dernier (BARRIONUEVO et SCHERER 2010). Chez les invertébrés, les 3 facteurs de la famille ne sont pas retrouvés et sont donc généralement nommés SoxE. Ainsi, un unique facteur est généralement retrouvé, comme chez la drosophile (NANDA *et al.* 2009) mais une duplication semble avoir eu lieu chez les hyménoptères où deux paralogues SoxE sont retrouvés (WILSON et DEARDEN 2008). Comme chez les vertébrés, ils sont exprimés dans le testicule (WILSON et DEARDEN 2008 ; NANDA *et al.* 2009).

Moins connue que la famille SoxE, la famille SoxB peut se diviser en 2 sous-groupes, la famille SoxB1 (incluant les facteurs Sox1, 2 et 3) et SoxB2 (Sox14 et Sox21) (BOWLES *et al.* 2000). La première famille contient des facteurs à domaines d'activation transcriptionnelle et la seconde, des facteurs à domaines de répression. Les facteurs de la sous-famille SoxB1

sont fortement exprimés chez le jeune embryon, en particulier dans le testicule et le système nerveux, et seraient importants pour la détermination et la différenciation cellulaire chez la souris (MIYAGI *et al.* 2009). Chez les mammifères placentaires, la famille SoxB1 correspond à la famille la plus proche de Sry et chez les monotrèmes il a été suggéré que Sox3 jouerait le rôle de Sry (qui n'est pas retrouvé) (WALLIS *et al.* 2008). De plus, chez les placentaires, Sox3 est capable de remplacer Sry en cas d'inactivation et il a été suggéré qu'il serait le plus proche du gène Sox ancestral (SUTTON *et al.* 2011). Chez l'huître, l'une des EST présente des homologies avec le facteur Sox14 appartenant à la famille SoxB2 alors que l'autre, dont le profil d'expression est illustré en Figure 37B, présente des homologies avec des facteurs appartenant à la famille SoxB1. Ainsi chez l'huître, les pics d'expression précoces de SoxE et de SoxB1 à une période où le sexe n'est pas encore déterminé en font des candidats potentiels du déterminisme sexuel.

3. ESTs de Dax-1 et de la β -caténine

Chez *C. gigas*, les expressions de Dax-1 (Figure 38A) et de la β -Caténine (Figure 38B) augmentent au cours du cycle gamétogénétique adulte uniquement chez les femelles.

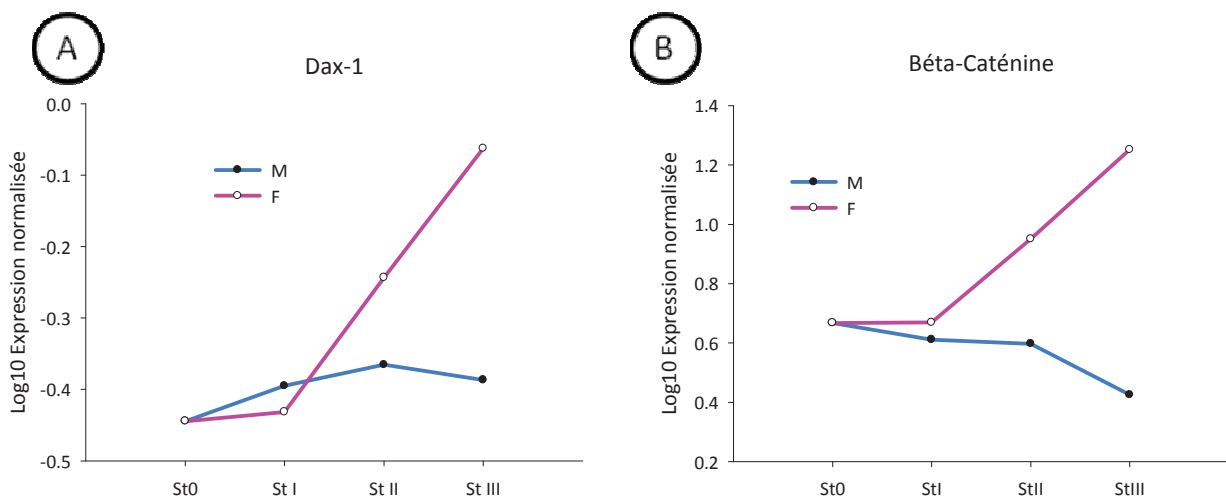


Figure 38 : Expressions gonadiques de Dax-1 (A) et de la β -caténine (B) par puces à ADN sur un cycle gamétogénétique adulte.

n=8 pour les stades 0 ; n=4 pour les stades I, II et III ; st : stade gamétogénétique ; M : mâle ; F : femelle.

Chez les mammifères Dax-1 est connu pour influencer les voies mâle comme femelle selon un dosage très fin (LUDBROOK et HARLEY 2004). Chez le poulet, même si son expression précoce est retrouvée pour les deux sexes, elle ne persiste que dans l'ovaire chez l'adulte, ce qui semble indiquer un rôle dans la différenciation gonadique (SMITH et SINCLAIR 2004). Chez le médaka et la truite (NAKAMOTO *et al.* 2007 ; VIZZIANO *et al.* 2008), un rôle de Dax-1 dans la différenciation testiculaire est suspecté. Ainsi Dax-1 semble avoir un rôle variable selon les espèces. La β -caténine n'a, quant à elle, fait l'objet que de peu d'études, excepté chez les mammifères où son rôle est lié au déterminisme sexuel ou à la différenciation gonadique femelle (CHASSOT *et al.* 2008). Chez l'huître, son rôle peut être lié à la différenciation femelle et mérite également d'être approfondi. Les profils d'expressions dimorphiques de Dax-1 et de la β -caténine observés chez l'huître, surtout en stade III, en font des candidats intéressants du déterminisme sexuel lors de la mise en place du cycle suivant.

Finalement, à partir de toutes ces données, le facteur SoxE et la β -caténine ont été sélectionnés pour faire l'objet d'études plus approfondies, et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, leurs EST sont apparentés à facteurs impliqués respectivement dans les cascades mâles et les cascades femelles chez les vertébrés. D'autre part, ils font l'objet de nombreuses interactions au sein des cascades du déterminisme sexuel, comme mentionné dans l'introduction générale. Enfin leurs profils d'expressions obtenus en *microarrays* suggèrent un rôle potentiel dans le déterminisme sexuel en stade 0 et en stade III chez l'huître. Néanmoins, les facteurs Dax-1 et SoxB1, également intéressants au vu de leurs profils d'expressions, devront aussi faire l'objet d'une étude ultérieure.

Chapitre 2:

Cg-SoxE et Cg- β -caténine, deux nouveaux acteurs du déterminisme sexuel chez l'huître?

I. Introduction

1. Objectifs de l'étude

Les données issues de l'analyse des banques d'EST et des *microarrays* chez *C. gigas* ont permis de sélectionner deux EST d'acteurs potentiels du déterminisme sexuel chez l'huître, SoxE et la β -caténine.

L'objectif de cette partie était donc de caractériser leurs séquences complètes et d'étudier leurs expressions spatio-temporelles au cours du cycle gamétogénétique adulte. Les résultats attendus devaient nous permettre d'affiner les réponses aux questions suivantes : (1) Quelles sont les relations phylogénétiques de ces facteurs avec leurs orthologues d'autres phyla ? (2) Quel sont leurs rôles potentiels lors de la différenciation gonadique de l'huître ? (3) Quelle est la cascade moléculaire du déterminisme sexuel chez l'adulte ? (4) Quelle est la fenêtre temporelle du déterminisme sexuel au cours du cycle gamétogénétique adulte ?

2. Résultats

Dans un premier temps, les séquences complètes des 2 gènes ont été recherchées. La séquence partielle de l'EST SoxE a été complétée par 3' RACE-PCR (la partie 5' étant déjà complète). Cette séquence, nommée Cg-SoxE, présente des domaines conservés identifiés chez les vertébrés, à savoir le domaine HMG, le domaine de dimérisation ADN-dépendant, deux domaines de transactivation ainsi que deux signaux de localisation et d'exportation nucléaire. La séquence protéique déduite de Cg-SoxE montre une plus forte identité avec les facteurs Sox9 trouvés chez des vertébrés non-mammaliens présentant un déterminisme sexuel température-dépendant. Grâce aux séquences disponibles chez d'autres mollusques notamment la crépidule et l'ormeau, plusieurs EST de la β -caténine, disponibles dans la banque d'EST *GigasDatabase* ont pu être identifiés et assemblés, permettant ainsi d'obtenir sa séquence complète, nommée Cg- β -caténine. L'analyse phylogénétique de sa séquence protéique la classe parmi les lophotrochozoaires. Elle présente comme chez toutes les espèces étudiées, un domaine central Armadillo constitué de 12 structures répétées, plus conservé que les domaines N et C terminaux. Ce domaine Armadillo constitue la surface d'interaction avec la majorité des partenaires de la β -caténine, comme des facteurs

impliqués dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation Wnt ou des facteurs Sox dont Sox9.

L'expression spatio-temporelle des deux facteurs a ensuite été étudiée par PCR en temps réel et par hybridation *in situ* au cours du cycle gamétogénétique adulte. L'expression temporelle de Cg-SoxE est maximale au stade 0, quand le sexe n'est pas identifiable et décroît ensuite pour les deux sexes. A l'inverse, l'expression de la Cg- β -caténine augmente uniquement chez les femelles à partir du stade II, avec un maximum au stade III. Dans l'aire gonadique de *C. gigas*, les ARNm de Cg-SoxE et de la Cg- β -caténine sont retrouvés au sein des tubules gonadiques, dans le cytoplasme des mêmes types de cellules germinales, des cellules précoces aux spermatocytes chez les mâles et aux ovocytes en pré-vitellogenèse chez les femelles. Seuls les ARNm de la Cg- β -caténine ont été retrouvés dans les ovocytes en vitellogenèse. Pour les deux facteurs, une expression dans les cellules somatiques n'est pas exclue.

Nos résultats sur les ARNm montrent que la Cg- β -caténine pourrait être impliquée dans les événements précoces (déterminisme sexuel?) préparant la différenciation gonadique femelle pour le cycle suivant ou dans la folliculogénèse du cycle en cours. Présent dans le cytoplasme des ovocytes matures, l'ARNm de la β -caténine pourrait aussi constituer un stock maternel utilisable par le jeune embryon. Chez les mâles, l'expression de la Cg- β -caténine dans les cellules germinales et dans les cellules somatiques associées n'exclut pas un rôle dans les différentes étapes de la différenciation gonadique. Quant à Cg-SoxE, il serait impliqué dans les événements précoces de la différenciation gonadique incluant le déterminisme sexuel.

Afin de préciser la fonction de la β -caténine au cours du cycle gamétogénétique de l'huître, l'étude de son expression protéique a également été initiée en immunofluorescence grâce à un anticorps monoclonal hétérologue (Annexe) qui reconnaît toutes les formes cellulaires de la β -caténine. En effet, la β -caténine a une double fonction selon sa localisation. Associée aux cadhérines membranaires et au cytosquelette d'actine, elle participe à l'ancrage cellulaire et, sous sa forme libre, elle joue le rôle de facteur transcriptionnel. Chez des individus en stade II, une expression est observée au niveau des membranes plasmiques et dans le cytoplasme des ovogonies et des ovocytes en pré- et en

vitellogenèse chez les femelles et des spermatogonies et spermatocytes chez les mâles. Chez les deux sexes, les mêmes expressions seraient aussi présentes dans les cellules somatiques intra-tubulaires associées. Chez les femelles, une expression nucléaire plus faible est également observée dans les cellules somatiques et/ou dans les ovogonies. Ces profils d'expression suggèrent un rôle de la Cg- β -caténine dans la maturation des cellules germinales mâles et femelles, comme mentionné chez les mammifères. Chez les femelles, cette maturation pourrait faire intervenir des régulations transcriptionnelles. Ces expérimentations doivent être poursuivies sur tout le cycle gamétogénétique afin de préciser les rôles de la Cg- β -caténine à diverses étapes clés de la différenciation gonadique, notamment lors du déterminisme sexuel.

II. Publication

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication qui est jointe ci-après : Santerre, Sourdain, Adeline et Martinez. *Cg-SoxE and Cg- β -catenin, two new actors of the sex-determining pathway in an hermaphrodite lophotrochozoa, the pacific oyster Crassostrea gigas?* Soumise à *Differentiation*.

Ils ont également fait l'objet d'une présentation affichée au congrès de la SFG "*Genetics, Epigenetics and Evolution of Sex Chromosomes*" en juin 2011 à Paris (France). Martinez, Santerre, Cuenca, Favrel, Sourdain (2011) *Sex determination in a non-model species, the pacific oyster Crassostrea gigas: first study of actors of the molecular cascade*.

Cg-SoxE and Cg- β -catenin, two new actors of the sex-determining pathway in an hermaphrodite lophotrochozoa, the pacific oyster *Crassostrea gigas*?

Christelle SANTERRE^{a,b}, Pascal SOURDAINE^{a,b}, Béatrice ADELIN^{a,b}, Anne-Sophie MARTINEZ^{a,b}.

^a: Université de Caen Basse-Normandie, FRE 3484 BioMEA, F-14032 Caen, France

^b: CNRS INEE, FRE 3484 BioMEA, F-14032 Caen, France

Corresponding author:

A.-S. Martinez

FRE 3484 BioMEA, IBFA, Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France.

e-mail: anne-sophie.martinez@unicaen.fr

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

Fax: 33 (0)2 31 56 53 46

Abstract

Sex determination is poorly known among lophotrochozoa in general and mollusks in particular. It is also true for hermaphrodites, whatever the phylum, although they illustrate one of the main kinds of animal sexual reproduction and are rather frequent among mollusks. For these reasons, the oyster *Crassostrea gigas*, an irregular successive hermaphrodite bivalve, is an interesting model for investigating sex-determination. In this species, sex determination would be controlled by a major gene under an environmental influence. It would take place at the end of a gametogenetic cycle to prepare the next one. Our work intend to go further into these aspects by focusing on SoxE and β -catenin, key players of the male and female gonadic differentiation respectively in mammals. Based on sequence and phylogenetic analyses, Cg-SoxE, the oyster's SoxE factor, seems more closely related to vertebrate SoxE genes while Cg- β -catenin, the oyster's β -catenin factor, is classified amongst lophotrochozoa. The mRNA expression of Cg-SoxE measured by qPCR in the gonadic areas during the gametogenetic cycle is maximal when sex is indiscernible and then decreases for both sexes. In contrast, Cg- β -catenin mRNA expression increases only in females from maturing to ripe stages. By ISH, whatever the stage and sex, the expression of both actors is found in the same germ cells (precocious, spermatogonia, spermatocytes, oogonia and pre-vitellogenic oocytes), except for Cg- β -catenin also found in vitellogenic oocytes. A somatic expression in auxiliary cells is not excluded. Our results suggest an involvement of Cg-SoxE and Cg- β -catenin in the oyster's gonadic differentiation, potentially including sex determination. They also allow to precise oyster's male and female sex-determining time-window and pathways. More generally, our data provide insights into the understanding of molecular mechanisms of sex determination in mollusks and will enrich the knowledge in compared genomic of the reproduction and in molecular phylogeny.

Keywords: Sox9, β -catenin, sex-determining pathways, oyster, gonadic differentiation.

Introduction

The mechanisms that specify sex determination, still critical for development and reproduction, are among the least-conserved known, with marked variation in both the primary sex determination signal and in the downstream genetic pathways (Haag and Doty, 2005; Yusa, 2007). In the oyster *Crassostrea gigas*, a successive protandrous irregular hermaphrodite species of mollusk, sex-determination is still unknown (Guo et al., 1998). It is also true for other mollusks, lophotrochozoa in general and hermaphrodites whatever the phylum as well. In *C. gigas*, a recent model has suggested that sex determination would be controlled by a major gene which may be under an environmental influence (Guo et al., 1998; Hedrick and Hedgecock, 2010). The oyster sex-determining molecular pathway and time-window are also poorly known, partly because of the absence of availability of published *C. gigas* genome when this work was done. Up to now, only two conserved transcription factors, Cg-DMI and Cg-Foxl2, have been characterized in the oyster gonads; they would be involved in the male and female gonadic differentiation respectively and their expression may imply a sex determination time-window at the end of the gametogenetic cycle in adults and in young spats before the formation of gonadal tubules (Naimi et al., 2009ab; Santerre et al., 2012). Some short sequences homologous to factors involved in the vertebrate sex-determining cascades have also been highlighted in the oyster EST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>), such as a member of the SoxB1 family which includes Sox3 and a member of the SoxE family which includes Sox9 for the male pathway and Wnt-4, β -catenin and Dax-1, for the female one.

Sox9 and β -catenin, mostly studied in mammals, have a critical role in male and female gonadic differentiation respectively. They are also strongly involved in the interactions between both sex-determining pathways in this phylogenetic group (Maatouk et al., 2008). Thus in mammals, the transcription factor Sox9 is the direct target of Sry and it is both necessary and sufficient for normal testicular development (Sekido and Lovell-Badge, 2009; Knower et al., 2011). It up-regulates FGF9 and PGD2 expression (Moniot et al., 2009; Sekido and Lovell-Badge, 2009) and could also induce the expression of Sox8 and Amh which participate to the male gonadal differentiation and its maintain (Barrionuevo and Scherer,

2010; Sekido, 2010). In some species, Sox9 is also suspected to inhibit the female pathway by direct protein-protein interaction with the β -catenin, although the exact mechanisms are still uncertain (Lau and Li, 2009; Jakob and Lovell-Badge, 2011). For its part, the β -catenin is an actor of the Rspo1/Wnt-4 signaling pathway (for review see (MacDonald et al., 2009)). Rspo1 has recently been recognized as an active ovarian determinant, challenging therefore the classical paradigm mentioning that ovarian determination and differentiation would be a default or passive developmental pathway (Lau and Li, 2009). Rspo1 activates the Wnt-4 signaling in the bi-potential gonads during embryogenesis, leading therefore to amplify β -catenin signaling to oppose testis formation (Parma et al., 2006; Lau and Li, 2009; Tomaselli et al., 2011). The Rspo1/Wnt-4 pathway may also lead to silence FGF9 and Sox9 expressions (Kim et al., 2006). In the species exhibiting temperature-dependent sex determination (TSD), the key players of the molecular network underlying gonad development appear to be retained but their functions range from conserved to novel roles (Shoemaker and Crews, 2009). Thus, Sox9, would be critical for final commitment to a testicular fate in most of these species, but it would intervene lately during this process (von Hofsten and Olsson, 2005; Shoemaker and Crews, 2009; Yokoi and Postlethwait, 2011). Regarding the β -catenin, up to now no paper has concerned its study in the gonads of TSD or TSD/GSD species, but a Rspo1/Wnt-4 pathway has been mentioned in some turtles (Shoemaker and Crews, 2009) and a role in ovarian differentiation has been allocated to Rspo1 in the medaka and the zebrafish, (Zhou et al., 2009; Zhang et al., 2010). In hermaphrodite species, the few studies about sex determination mainly deal with Dmrt1 and Foxl2 (Alam et al., 2008; Kobayashi et al., 2010; Zhou and Gui, 2010; Herpin and Schartl, 2011) and only mention Sox9 as a testis-specific factor expressed before Dmrt1 in the molecular cascade of the male gonadic differentiation (Luo et al., 2010). The female pathway, studied in one species so far, only highlight an ovarian specific Wnt-4 ortholog, the development of femaleness possibly being a passive process controlled by the testis through a decrease of Dmrt1 expression (Wu and Chang, 2009, 2012). In invertebrates, sex-determining pathways, mostly studied in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, exhibit very different molecular actors compared to their mammalian counterparts (for review see Haag and Doty, 2005) except Dsx and Mab-3. Yet, a SoxE factor, male-specifically expressed, has been identified in *Apis mellifera* and in *drosophila* (Wilson and Dearden, 2008; Nanda et al., 2009). In this latter, it

would be essential for testis morphogenesis during pupal stages (Nanda et al., 2009). Regarding the gonadic Wnt-4/ β -catenin pathway, it has only been mentioned that it would be essential for asymmetric cell divisions and male differentiation during gonadal development of larvae of *C. elegans* (Kalis et al., 2010).

In this context, we first characterized SoxE and β -catenin factors in *C. gigas* to confirm the orthology suspected from the ESTs and to highlight their phylogenetic position. The study of the expression patterns of both factors was investigated as a second step by real-time PCR and by *in situ* hybridization. As a result, our study intends to precise (i) the potential roles of both actors in the oyster sex determination / gonadic differentiation and (ii) the male and female sex-determining time-window and pathways. This work will enrich the knowledge in compared genomics of the reproduction and in molecular phylogeny, which is of particular interest considering that the key players of molecular networks underlying sex determination are not systematically conserved amongst phyla.

Material and methods

Experimental animals

Adult oysters *Crassostrea gigas* were supplied by the oyster farm le GAEC La Tatihou (Saint-Vaast-la-Hougue, France) or by the SMEL (Blainville sur mer, France) for the animals used for RACE- and real-time RT-PCR and by the oyster farm Lenoir (Blainville sur mer, France) for those used for *in situ* hybridization. The ploidy of the individuals was verified by flow cytometry. Sex and gametogenetic stages of the animals were determined *a posteriori* on the basis of criteria described by Heude-Berthelin et al. (2001): Stage 0, resting stage with undifferentiated gonad; stage I, reinitiation of gametogenesis illustrated by gonial proliferation; sex is still indiscernible at the beginning; stage II, maturation stage with active spermatogenesis and growing oocytes; stage III, mature stage with ripe gonads.

Total RNAs extractions

Total RNAs were extracted (i) from individual adult gonadic areas at each gametogenetic stage and (ii) from individual tissues (gills, labial palps, mantle, adductor muscle, digestive gland) at stage II using Tri-Reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions.

Cg-SoxE RACE-PCR

A SoxE EST sequence [GenBank: BQ426397] of 694 b was obtained from the oyster EST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>) and includes the 5' UTR section with the ATG start codon. Three'-RACE DNA fragments were produced from 50 μ g of total RNAs of stage II gonadic area using a Marathon cDNA amplification kit (ClonTech Laboratories, Ozyme, France), following the manufacturers' instructions. Specific primers used for the PCR were designed from the oyster SoxE EST sequence by using the Primer 3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu>). The first PCR was performed by using a specific primer SoxES1 (5' ACTACAAATACCAACCCC 3') and the first marathon adaptor and cycled as follows: 5 min/95°C, 30 cycles (15 sec/95°C, 4 min/68°C). The nested PCR was performed on a 1/50 dilution of the first PCR product with a specific primer SoxESN1 (5' TGTCTCACGCCATGATGTTCAAG 3') and the second marathon adaptor and cycled as follows:

5 min/95°C, 25 cycles (15 sec/95°C, 4 min/68°C). PCR fragments generated were cloned into a PCRII-Topo vector using a TA cloning kit (Invitrogen, Eragny sur Oise, France) and sequenced using ABI cycle sequencing chemistry (Beckman Coulter Genomics, Takeley, United Kingdom). The accuracy of the complete Cg-SoxE sequence was verified by PCR with the primer pairs SoxES2 (5' CCACGGAACAGCTCCTCAAGGCTGTT 3') / SoxEAS2 (5' TGTTCGATTGCGTCTTCCTA 3') and cycled as follows: 5 min/95°C, 35 cycles (30 sec/95°C, 45 sec/60°C, 1 min/72°C), 7 min/72°C. This cDNA was cloned and sequenced as described before. Deduced amino acid sequences were translated in different reading frames in the Expsy website (<http://web.expasy.org/translate/>) and they were compared to protein data banks in GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cg- β -catenin in silico sequence assembly

Multiple ESTs of the *C. gigas* β -catenin were found by comparing the β -catenin sequence of the abalone *Haliotis asinina* [GenBank: EF676093.1] and common slipper shell *Crepidula fornicata* [GenBank: ADI48180.1] with not-annotated contigs from the oyster EST database by using the BLAST tool of NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The assembled complete Cg- β -catenin sequence was used as a template for two PCR amplifications from stage II gonadic areas. Indeed, because of the length of the complete sequence, two overlapping sequences were amplified with primers designed in the 5'-, middle and 3'-end of the sequence and used as the following pairs: β CatS1 (5' TCAGAACGAGCAAAACGAGA 3') / β CatAS1 (5' GACAAGATTCCAGCAGCACA 3') and β CatS2 (5' CCAGGTGAACTGGTGAGGAT 3') / β CatAS2 (5' TATTCATGCCTGCTGCTTTG 3'). The PCRs were cycled as follows: 5 min/95°C, 35 cycles (30 sec/95°C, 45 sec/58°C, 1 min/72°C), 7 min/72°C and Cg- β -catenin cDNAs were cloned and sequenced as described in previous section. Deduced amino acid sequences were assembled and compared to proteins in Genbank database.

Phylogenetic analyses

A range of invertebrate and vertebrate protein sequences encoding SoxE and β -catenin factors were obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) and were aligned using CLUSTALW. Phylogenetic analyses were performed by the neighbour-joining method using MEGA version 5 software (Tamura et al., 2011).

Real time RT-PCR

After DNase I RQ1 (Promega, Charbonnières, France) treatment, 500 ng of total RNA samples [individual gonadic areas of stage 0-III adults and tissues of stage II individuals (gills, labial palps, adductor muscle, mantle and digestive gland)] were reverse-transcribed using 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) during 90 min at 37°C and with oligod(T)₁₅ primer (Promega). PCR experiments were cycled 45 x (15 sec/95°C, 45 s/60°C) after 15 min/95°C, in a final volume of 15 µl, using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Marnes-La-Coquette, France) with triplicates of 5 ng template DNA, 7.5 µl of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and 300 nM of specific forward and reverse primers. Reactions with RNAs not reverse-transcribed were used as negative controls. Accurate amplifications of target amplicons were assessed by constructing melting curves and PCR amplification efficiency (E; $E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series on several samples. DNA amplifications were performed using (i) specific pairs of primers, βCatqPCRS1 (5' CCATGATGGTTCACCAAGTTG 3') / βCatqPCRAS1 (5' ACAGCGAGTGGTCTCCAAGT 3') and SoxEqPCRS1 (5' GCCATTCAAGGAGAAAACGA 3') / SoxEqPCRAS1 (5' TGTAAGAGCTGGTCCAGGATG 3') for Cg-β-catenin and Cg-SoxE respectively, and (ii) qfElong1 (5' ACCACCCTGGTGAGATCAAG 3') and qrElong1 (5' ACGACGATCGCATTCTCTT 3') primers for the reference transcript EF1α [GenBank: BQ426516]. The relative mRNA levels were normalized to EF1α transcripts using the following formula, $N=10 \times 2^{(Ct_{EF1\alpha} - Ct_{Cg-gene})}$. Statistical analyses were performed using 2-tailed Mann-Whitney U-test.

In situ hybridizations

Sense and antisense RNA probes were synthesized by *in vitro* transcriptions with a DIG RNA labelling kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) from Cg-SoxE and Cg-β-catenin cDNA templates previously obtained by PCR and by using primer pairs SoxES3 (5' AAAGTTCGACTGCCATCGTT 3') / SoxEAS3 (5' GGTGTCCTCTGAAATGT 3') and βCatS3 (5' GATGTGAACCAGCAGCTGAA 3') / βCatAS3 (5' TGCAGCATCTGACAAGTTCC 3') respectively. *In situ* hybridizations were performed as described by Santerre et al. (2012) using 200 ng/ml of Cg-SoxE or Cg-β-catenin DIG labelled RNA probes. Slides were examined and pictures were taken with an Eclipse 80i microscope coupled to a DXM1200-C camera (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Results

Cg-SoxE cloning and sequence analysis

A complete sequence of a SoxE factor of 2233 bp (without the polyA tail) has been identified in *Crassostrea gigas* and has been named Cg-SoxE *Crassostrea gigas* SoxE [GenBank: JX040450] (Results not shown). It displays a 5' untranslated region of 203 bp, an open reading frame (ORF) of 1374 bp with the ATG initiation codon (bp 204) and a TAA stop codon (bp 1577) and a 3' untranslated region of 656 bp including a poly(A) signal AATAAAATAA (bp 2215) upstream of the poly(A) tail (Results not shown). The full length, continuity and sequence of this cDNA were confirmed by RT-PCR and sequencing. The deduced amino acid sequence is 458 aa long and has been aligned with sequences of human SoxE family members Sox8, Sox9 and Sox10 (Fig. 1). Cg-SoxE contains, as human SoxE family members, a HMG domain, a DNA-dependent dimerization domain (DIM) and two distinct transactivation domains (TA1 and TA2/PQS). Compared to its vertebrate counterparts, Cg-SoxE protein sequence presents a maximal homology with Sox8 for the dimerization (73.3%) and the TA1 (44.3%) domains and with Sox9 for the HMG (91.5%) and TA2 (34.6%) domains (Results not shown). Two putative nuclear localization signals (NLS) located in the HMG domain, have also been identified, at the N- and C-terminal ends of the protein sequence. A nuclear export signal (NES) is present in between; it contains a leucine-rich sequence found in all Sox proteins and conserved amongst mammals and invertebrates. The transactivation proline/serine/alanine rich domain (PQA), specific to mammalian SoxE proteins, is not found in the oyster SoxE.

Cg-SoxE phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses on entire protein sequences were performed to investigate the relationship between the oyster Cg-SoxE and invertebrate and vertebrate SoxE family members (Fig. 2). Cg-SoxE forms an out group on its own between the SoxE proteins of vertebrates and invertebrates. It is yet more closely related to the vertebrate SoxE members, with average identities around 31% while identities with invertebrates only goes between 11 and 24%. Amongst vertebrates, Cg-SoxE is not clustered neither with Sox8, Sox9 nor Sox10 but it shows maximal identities (around 36%) with Sox9 of *Trachemys scripta* and fish.

Cg- β -catenin cloning and sequence analysis

Seven oyster β -catenin overlapping ESTs [GenBank: HS188811, HS181438, HS120798, EW778397, HS112759, HS115314, HS115315] were extracted from the oyster EST database by *in silico* comparisons with the β -catenin sequences of *C. fornicata* and *H. asinina*. The contig of these ESTs gave a β -catenin sequence whose full length and continuity were confirmed by RT-PCR and sequencing. The whole sequence of the oyster β -catenin is 3627 bp long (without the polyA tail) and has been named Cg- β -catenin *Crassostrea gigas* β -catenin [GenBank: JX121092] (Results not shown). It displays an untranslated region (UTR) of 168 bp, an open reading frame (ORF) of 2499 bp with the ATG codon (bp 169) and a TAA stop codon (bp 2667), and a 3' untranslated region of 960 bp including a poly(A) signal AATAAAATAA (Results not shown). The deduced amino acid sequence is 832 aa long and has been compared to the human β -catenin sequence (Fig. 3). Both proteins show conserved A and B domains respectively at their N- and the C-terminal ends and one central domain containing 12 imperfect armadillo repeats made of three alpha helices. This latter domain is the most conserved with 84 % identity between the oyster and human β -catenin.

Cg- β -catenin phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis on full length protein sequences was performed to investigate the relationship between Cg- β -catenin and the invertebrate and vertebrate β -catenin proteins (Fig. 4). The β -catenin of *C. gigas* shares the maximum identity (around 81%) with β -catenin of the mollusks *Crepidula fornicata* and *Aplysia californica* although it is separated from them. It is also close (around 78% of identity) to another lophotrochozoa, the nemert *Cerebratulus lacteus*.

Cg-SoxE and Cg- β -catenin expression in tissues

Cg-SoxE and Cg- β -catenin mRNAs expressions, measured by real-time quantitative RT-PCR, were detected in all adult tissues tested (Fig. 5A,B). For Cg-SoxE (Fig. 5A), levels were significantly 2 to 4-fold higher in the digestive glands, the labial palps and to a lesser extent in the mantle compared to other tissues. For Cg- β -catenin (Fig. 5B), the mRNA abundance was significantly about 4-fold higher in the digestive glands and in the female stage II gonadic areas compared to other tissues.

Cg-SoxE and Cg- β -catenin temporal expression during the adult gametogenetic cycle

Cg-SoxE and Cg- β -catenin mRNAs expressions measured by real-time quantitative PCR in the gonadic areas were detected in all the adult gametogenetic stages, whatever the sex of the animals (Fig. 6A, B). Along a cycle, Cg-SoxE mRNA expression tends to decrease with a significant 50%-drop between undifferentiated stages (0/I) and sexable male and female stages (II/III) (Fig. 6A). Expression levels were almost null in stage III females. In contrast, Cg- β -catenin mRNA levels tend to increase along the gametogenetic cycle only in females, with a significant 2-fold drop from stage II and with a maximal level in stage III (Fig. 6B). For both factors, a high individual variability is observed, especially in stage 0 for Cg-SoxE, where some animals show an expression almost 35- to 60-fold-higher than others.

Cg-SoxE and Cg- β -catenin cellular expression during gametogenetic cycle

Cellular expressions of Cg-SoxE and Cg- β -catenin transcripts were studied in gonadic areas by *in situ* hybridization during the adult gametogenetic cycle (Figs. 7, 8). The gonadic area is a diffuse organ made of numerous tubules embedded in a connective storage tissue. For both factors, whatever the stage, the staining was only present in the gonadal tubules. Regarding Cg-SoxE gonadic expression (Fig. 7), in stage 0 (A-D), a cytoplasmic staining was observed in early germ cells; it was weak in some animals (A, C) and strong in others (B, D) which also exhibited a high expression in real-time PCR (results not shown). In stage I (E, F), the cytoplasmic staining was localized not only in early germ cells but also in proliferating gonidia. In stage II (G, I) and III (J, L) males, the mRNA expression was essentially found in spermatogonia and to a lesser extent in spermatocytes. In females, a staining was observed in stages II (M, O) and III (P, R) in oogonia and pre-vitellogenic oocytes (M, O, P, R) but not in vitellogenic oocytes as observed in stage III (P, R). Whatever the sex or the stage, a somatic staining could not be excluded in particular in males or in undifferentiated stages. No staining was observed with the sense riboprobe (H, K, N, Q). Regarding Cg- β -catenin gonadic expression (Fig. 8), the mRNA staining was localized in the cytoplasm of early germ cells in stages 0 (A, C) and I (B, D) and in gonidia in the latter stage (B, D). In males, the mRNA expression was mainly located in spermatogonia but also to a lesser extent in spermatocytes in stage II (E, G) as in stage III (F, H). Whatever the stage, a somatic expression could also be suspected. In females, a signal was observed in oogonia (results not shown) and in pre-

vitellogenic oocytes (I, K) in stage II. In stage III, a staining was also observed in vitellogenic oocytes (J, L) and could also be suspected in the somatic cells surrounding germ cells (L). No staining was observed with the sense riboprobe (results not shown).

Discussion

In the present study we report the characterization of a SoxE family member and β -catenin, involved in the pathways of sex determination or gonadic differentiation in vertebrates but which are poorly studied in invertebrates and unknown in oysters.

Cg-SoxE and Cg- β -Catenin sequences and phylogenetic analyses

The oyster SoxE gene, named Cg-SoxE for *Crassostrea gigas* SoxE, is the first SoxE factor characterized in a lophotrochozoa species. Its deduced amino acid sequence presents all the features found in factors of the SoxE family. Cg-SoxE complete sequence is more closely related to vertebrate SoxE genes without distinction between Sox8, Sox9 or Sox10. Yet, it shows the highest total identity with Sox9 of some TSD species. Based on the conserved domains, Cg-SoxE is either related with Sox8 or with Sox9. The presence of these conserved domains in the oyster factor suggests similar functions with vertebrate SoxE family members, especially Sox9, for instance interactions with different factors of the male and female sex-determining molecular cascades such as β -catenin (Akiyama et al., 2004; Topol et al., 2009).

A β -catenin factor has also been characterized in *C. gigas* and was named Cg- β -catenin for *Crassostrea gigas* β -catenin gene. It is the first β -catenin identified in bivalves to date. Its deduced amino acid sequence allows classifying the oyster amongst lophotrochozoa but apart from the two mollusks gasteropods studied to date. This may suggest Cg- β -catenin specificities according to the class considered. In *C. gigas* as in all the species studied, β -catenin proteins contain a central structural core of 12 armadillo-repeats, more conserved than the N- and C-terminal domains. This armadillo domain constitutes the surface for interactions with the majority of β -catenin partners such as factors critical for cell adhesion and Wnt signaling (Bienz, 2005) or Sox proteins including Sox9 (Wegner, 2010).

Cg-SoxE and Cg- β -Catenin temporal expression patterns

By qPCR, Cg-SoxE and Cg- β -catenin showed the same profile of expression in adult tissues (except the gonadic areas), with a mRNA expression detected in all the tissues but being

predominant in the digestive gland and in labial palps. Such ubiquitous expression has already been reported in mammals for both factors (Bienz, 2005; Sashikawa Kimura et al., 2011).

In contrast, in the gonadic areas, the mRNA expression patterns of both factors were very different along the gametogenetic cycle. Cg-SoxE expression, first maximal in stage 0 when sex is indiscernible, decreased in both sexes. In contrast, Cg- β -catenin expression increased only in females from stage II till a maximum in mature females. These expression profiles are in agreement with the patterns of expression recently obtained by microarrays in the gonadic areas of *C. gigas* (Dheilly, unpublished results). Moreover, an expression of both factors at once in males and females is not inconsistent in an hermaphrodite species, as already mentioned for other factors involved in the gonadic differentiation in *C. gigas* (Naimi et al., 2009ab; Santerre et al., 2012) and in the protogynous fish *Epinephelus merra* (Alam et al., 2008).

A Sox9 expression profile coinciding with sex determination has already been mentioned in mammals (Knower et al., 2011) and in the TSD turtle *Lepidochelys olivacea* (Torres Maldonado et al., 2002). Indeed, in mammals, Sox9 expression is sexually dimorphic and male-specifically up-regulated (Kent et al., 1996). In the turtle, Sox9 expression is down-regulated only at the female-promoting temperatures (FPT) at the end of the temperature-sensitive period (TSP). In contrast, in the chicken (Oreal et al., 1998), in some TSD species such as *Alligator mississippiensis* (Western et al., 1999), *Trachemys scripta* (Shoemaker et al., 2007) or *Pleurodeles Waltl* (Dumond et al., 2011) and in the tilapia and zebrafish (Rodríguez-Marí et al., 2005; Ijiri et al., 2008), Sox9 does not appear as an inductor of the male fate as its expression is testis-specific or up-regulated at the MPT only during testicular differentiation. Thus, although factors of the SoxE family, such as Sox9, are involved in testis differentiation, they seem to intervene at different moments in relation to sex determination. In the oyster an early expression, especially when sex is indiscernible, could suggest a role of Cg-SoxE in the early events of the gonadal differentiation which may include sex determination. The high individual variability of its expression in stage 0 could also be in favor of this hypothesis

as it could reflect differences of levels according to the future sex, high in future males and low in future females.

Concerning the β -catenin, very few work, only made in vertebrates, have studied its gonadic expression. Although these studies never mention a precise role and time-window of action for this factor, they always highlight its involvement in the female gonadic differentiation (Bernard et al., 2008; Chassot et al., 2008; Maatouk et al., 2008; Liu et al., 2009; Nicol and Guiguen, 2011). Thus, the expression of Cg- β -catenin in the female gonads during the oyster gametogenetic cycle could suggest, for the first time in a protostome species, a similar role. If confirmed, it would therefore raise the question of a conserved function of β -catenin during evolution or an original role. The late expression of Cg- β -catenin does not allow discriminate between roles in the very early events preparing the gonadal differentiation of the next cycle or in the late events of the present one. In the mammals studied to date, it has also been suggested that β -catenin may intervene at different moments of the gonadic differentiation (Liu et al., 2009; Wang et al., 2009; Chassot et al., 2011; Takezawa et al., 2011; Mora et al., 2012). A role of Cg- β -catenin in the maternal supply of mRNAs to the early oyster embryo could also be hypothesized as mentioned in vertebrates (Vries et al., 2004). In males, low Cg- β -catenin mRNA levels do not exclude a role in different processes of gonadic differentiation as mentioned in mouse and human testis (Golestaneh et al., 2009; Chang et al., 2011).

Cg-SoxE and Cg- β -catenin spatial expression patterns

In *C. gigas* gonadic areas, Cg-SoxE and Cg- β -catenin mRNAs were only expressed in gonadal tubules. Their expression was found in the cytoplasm of the same kind of germ cells from precocious cells to spermatocytes in males and to pre-vitellogenic oocytes in females. Only Cg- β -catenin mRNAs were found in vitellogenic oocytes. For both factors, an expression in the somatic cells associated to the germ cells could not be excluded.

In most of the vertebrates studied to date, Sox9 mRNA expression was restricted to Sertoli cells in males (Shen and Ingraham, 2002; Rodríguez-Marí et al., 2005; Gao et al., 2006; El Jamil et al., 2008; Raghuv eer and Senthilkumaran, 2010) and germinal cells in females (El

Jamil et al., 2008; Raghuveer and Senthilkumaran, 2010) except in mammalian ovaries (Shen and Ingraham, 2002; Gao et al., 2006). The Sox9 protein subcellular localization is also different according to sexes, in the nucleus of Sertoli cells in males and in the cytoplasm of immature oocytes in females (Gao et al., 2006; Vizziano et al., 2007; El Jamil et al., 2008; Raghuveer and Senthilkumaran, 2010). Only *Xenopus tropicalis* vitellogenic oocytes exhibit a nuclear expression (El Jamil et al., 2008). Regarding the β -catenin, almost nothing is known about its mRNA gonadic expression and studies about its protein localization have only been made in mammals. They highlight, as in *C. gigas*, a male and female expression in both germinal and somatic cells. The subcellular protein localization is also variable, in the nucleus, at the cell membrane or in the cytoplasm according to sex, cell type and/or stage of gonadic differentiation (Chang et al., 2008; Chassot et al., 2008; Liu et al., 2009; Wang et al., 2009; Takezawa et al., 2011; Mora et al., 2012). In *C. gigas*, a mRNA expression of Cg-Sox9 and Cg- β -catenin in both sexes and in the same type of germ cells (and in associated somatic cells?) may suggest different roles during the testicular and ovarian differentiation as postulated in vertebrates. Thus, a Cg-Sox9 mRNA expression in early male germ / somatic cells could suggest an involvement in the early male gonad differentiation, a role not excluded by the expression in oocytes, as found for some studied species (El Jamil et al., 2008; Raghuveer and Senthilkumaran, 2010). In female gonads, Cg- β -catenin, depending on whether considering its mRNA expression in early germ cells or oocytes (and in associated somatic cells ?) could be involved either in the early events preparing the female gonadic differentiation at the next gametogenetic cycle, or in folliculogenesis at the present cycle or in the maternal supply of mRNAs to the early oyster embryos, different roles already mentioned in mammals (Liu et al., 2009; Wang et al., 2009; Chassot et al., 2011; Takezawa et al., 2011; Mora et al., 2012). In male gonads, Cg- β -catenin mRNA expression in germ and associated somatic cells is in agreement with our qPCR results which do not exclude a role in different processes of gonad differentiation as mentioned in mouse and human testis (Golestaneh et al., 2009; Chang et al., 2011). Interactions between Cg-SoxE and Cg- β -catenin could also be suspected due to their mRNA expression in the same type of cells.

Hypotheses about the sex determination pathways of the oyster C. gigas

Our work proposed an integrated approach of the oyster sex determination through the analysis of the structure and temporal/spatial mRNA expression of two key factors SoxE and β -catenin. Such approach intended to precise (i) the potential roles of both actors in the oyster sex determination / gonadic differentiation and (ii) the male and female sex-determining time-window and pathways. Taken together, our results and previous scarce results on this topic allow hypothesizing a model of sex-determination pathways in *C. gigas* (Fig. 9). Such model considers Cg-SoxE, Cg- β -catenin and other factors mentioned in the cascade as actors of the oyster's sex-determining pathways, an idea which will only be confirmed with protein expression and functional studies. Thus, as recently suggested, the primary signal of the pathways would be controlled by a major gene with three potential genotypes and which may be under an environmental influence (Hedrick and Hedgecock, 2010; Guo et al., 2012). The downstream genes of the molecular cascades would be (i) Cg-DMI, a DM-domain factor more closely related to vertebrate Dmrt4 and 5 than Dmrt1 and involved in the male oyster's gonadic differentiation (Naimi et al., 2009a), (ii) Cg-Foxl2, a Foxl2 factor involved in the female gonadic differentiation and whose mRNA expression is epigenetically regulated by its natural antisense transcript Cg-Foxl2os (Naimi et al., 2009b; Santerre et al., 2012), and (iii) Cg-SoxE and Cg- β -catenin (our study). The gonadic expression patterns of all of these factors were identical whether obtained by qPCR, ISH or microarrays except for slight differences for Cg-DMI. Indeed, its peak of expression, now proven to occur in stage 0 (unpublished data) has been first mentioned in late stage III animals (Naimi et al., 2009a) which may rather be very early stage 0 animals. The patterns of expression of these factors taken all together suggest a balance of expression between the 'male' and 'female' genes according to the future sex of the animal. Then, according to our hypothetical model, in future females, Cg-Foxl2 and Cg- β -catenin would be up-regulated in gonads in stage III, inducing therefore low levels of expression of Cg-SoxE and Cg-DMI in stage 0 at the next cycle, and leading at term to a female fate. In contrast, in future males, Cg-Foxl2 and Cg- β -catenin gonadic expression levels would be low in stage III, for Cg-Foxl2 because of the down-regulation of its mRNA expression by its NAT. Cg-SoxE and Cg-DMI may then be up-regulated to lead at term to a male fate. At last, these expression profiles allow to precise the time-window of the oyster sex determination; it may occur between the stage III of a

cycle and the stage 0 of the following one. To conclude, in *C. gigas*, Cg-SoxE and Cg- β -catenin may play key roles in male and female gonadic differentiation / sex determination, potentially by interacting with different factors of both molecular cascades. Understand such interactions appear particularly interesting in a hermaphrodite which exhibits a balance of expression between 'male' and 'female' actors of sex-determining pathways. However, the precise physiological function of both factors still remains to be elucidated, for instance by studying their protein expression or by RNAi.

Acknowledgements

The authors are grateful to Maria Cuenca Cambronero, Marie-Pierre Dubos and Aude Jouaux for their help in sampling and treatment of some samples. This research is supported by ANR 'Gametogenes' funds. Christelle Santerre is supported by a '*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*' (MESR) grant.

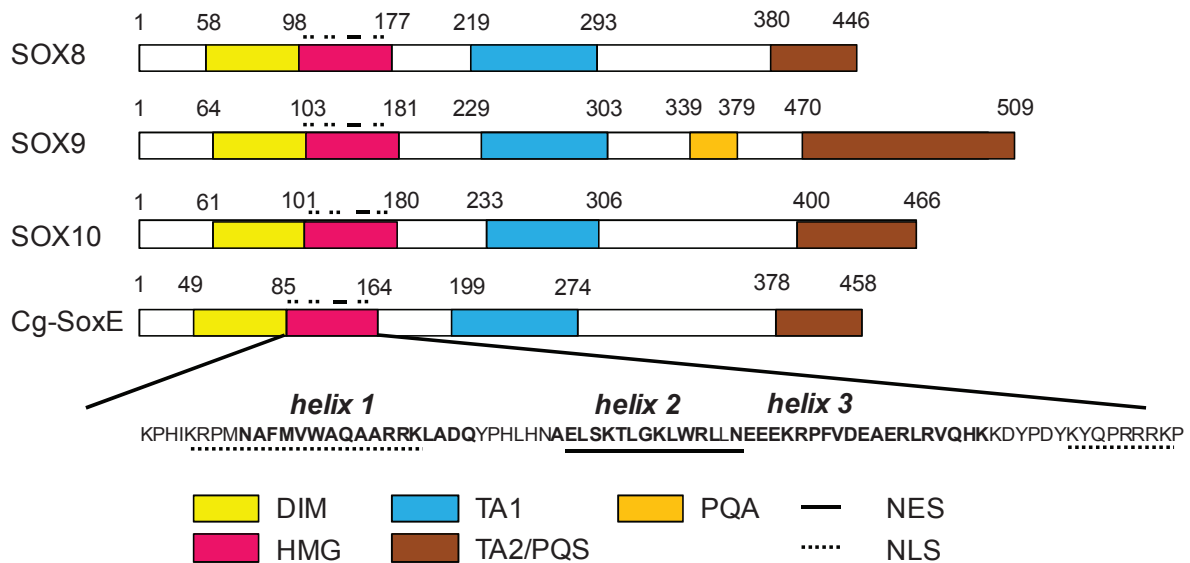


Figure 1: Schematic representation of the Cg-SoxE protein sequence compared to human SoxE proteins. Conserved domains are indicated in different colors [yellow for the dimerization domain (DIM), pink for the HMG domain, blue and brown for the two transactivation domains (TA1 and TA2/PQS) and orange for the PQA domain found only in the human Sox9]. The nuclear export / localization signals (NES and NLS) are indicated respectively in plain and dash lines. The numbers shown above indicate amino acid positions of each conserved domain. Cg-SoxE presents a maximal homology with Sox8 for the dimerization and TA1 domains and with Sox9 for the HMG and TA2/PQS domains (Results not shown). No PQA domain is found in the oyster Cg-SoxE. The HMG domain of Cg-SoxE shows a typical structure with three helices and loops.

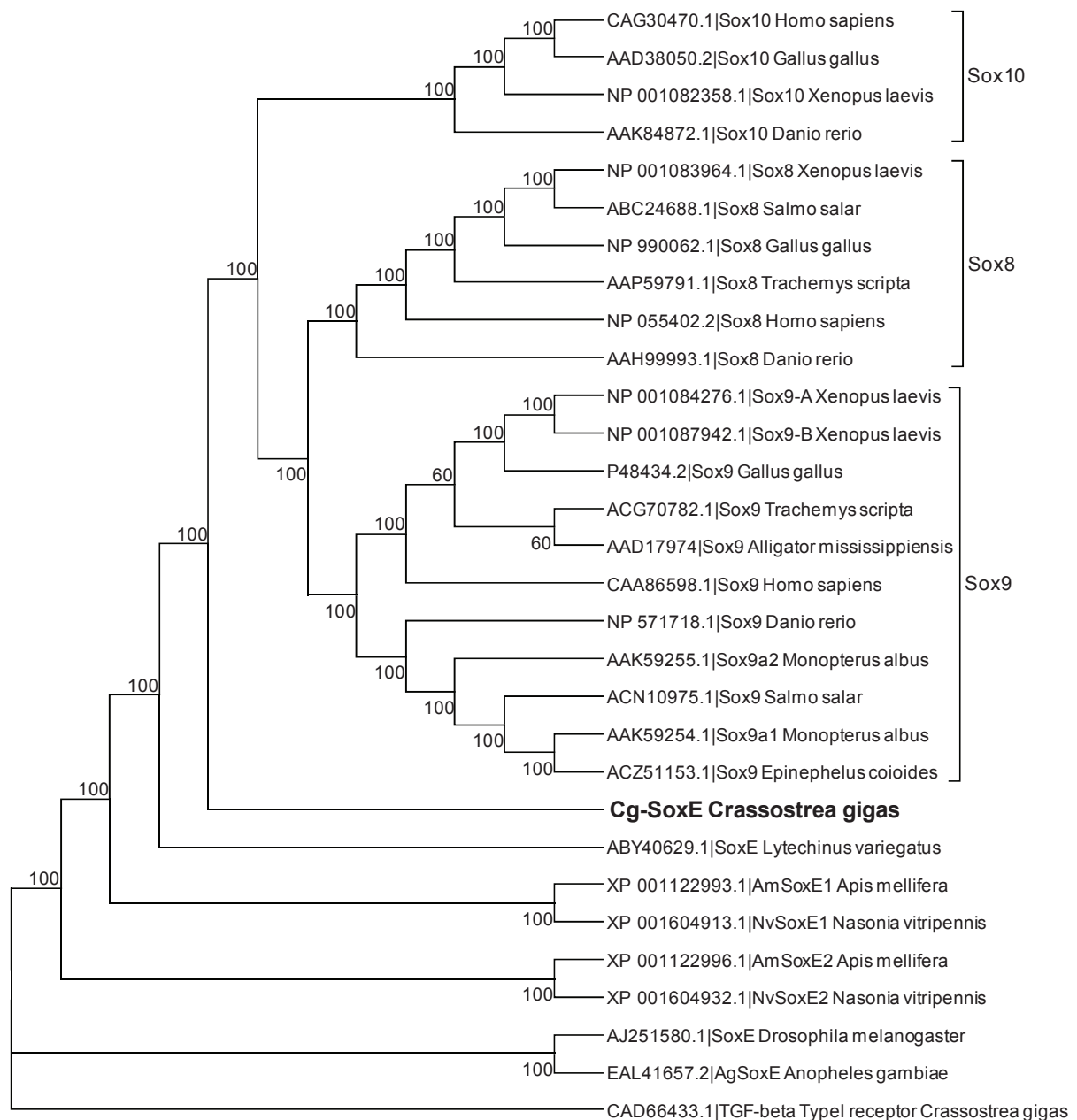


Figure 2: Phylogenetic tree of the SoxE proteins showing that Cg-SoxE forms an outgroup between the SoxE proteins of invertebrates and vertebrates although it is more closely related to the latter ones. *C. gigas* TGF-beta Type I receptor was used for root tree. Phylogenetic analyses were performed by the neighbour-joining method using the MEGA software version 5. Numbers in the branches represent the bootstrap values (%) from 100 replicates. The GenBank accession number of each protein is also indicated.

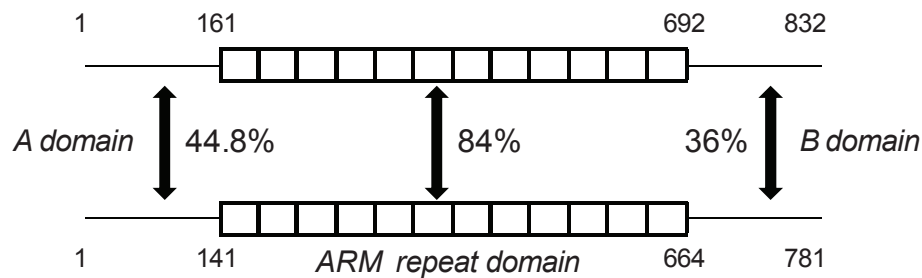


Figure 3: Schematic representation of the structural domains of the β -catenin protein sequences of *C. gigas* and *Homo sapiens*. Both proteins show a central binding domain called armadillo domain, and A and B domains respectively in the N- and C-terminal ends. The central domain contains 12 imperfect armadillo-repeats made of three alpha helices. The percentages of homologies between each domain of both sequences were obtained by an alignment generated with CLUSTALW. Our results show that the armadillo domain is more conserved than the N- and C- terminal domains.

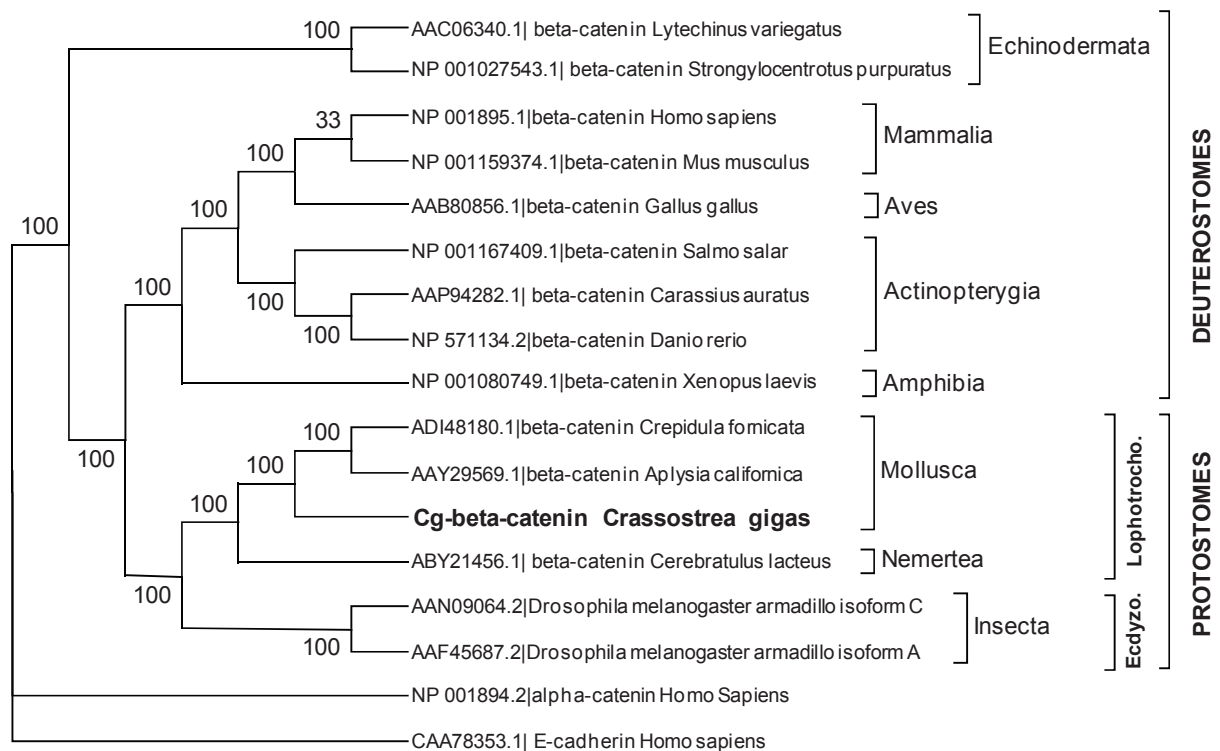


Figure 4: Phylogenetic tree of the β-catenin proteins showing that Cg-β-catenin forms, amongst the lophotrochozoa, an outgroup with the β-catenin of the mollusks *Crepidula fornicata* and *Aplysia californica* separated from the one of the nemert *Cerebratulus lacteus*. The human E-cadherin and α-catenin were used for root tree. Phylogenetic analyses were performed by the neighbour-joining method using the MEGA software version 5. Numbers in the branches represent the bootstrap values (%) from 100 replicates. The GenBank accession number of each protein is also indicated. Ecdyso.: Ecdyzozoaires; Lophotrocho.: Lophotrochozoaires.

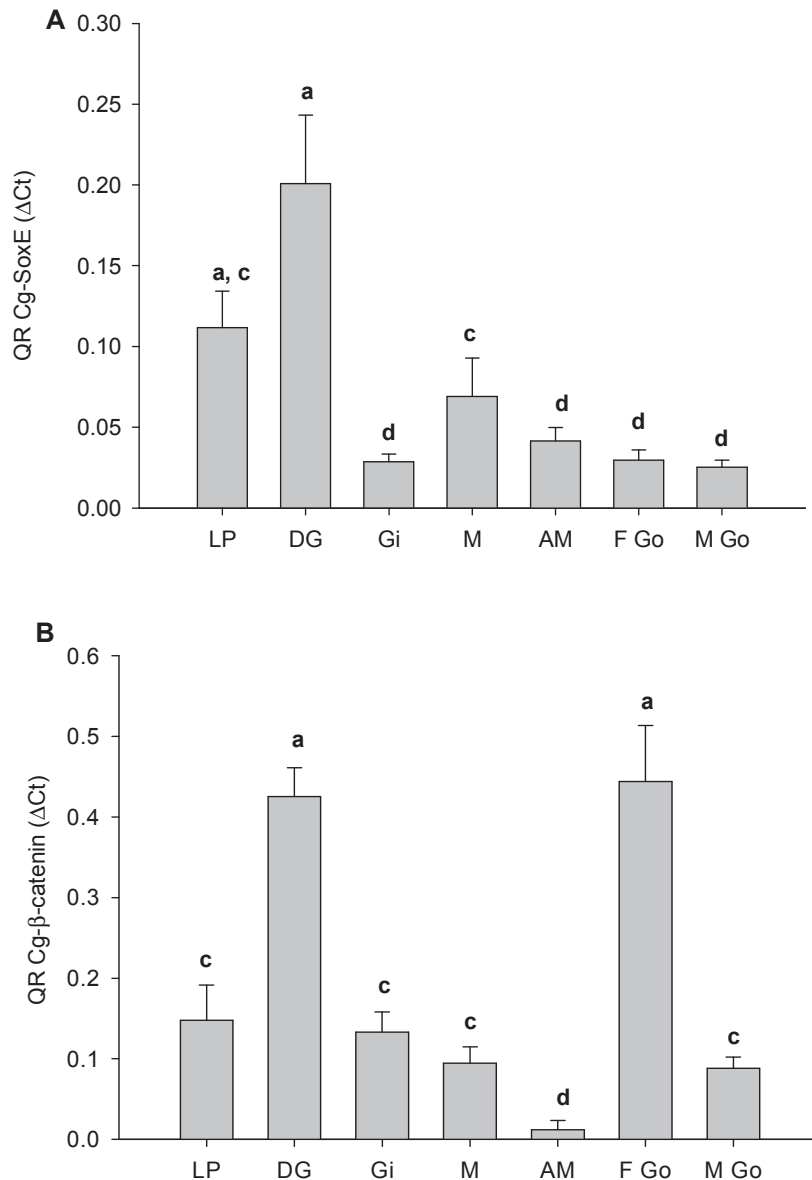


Figure 5: Cg-SoxE (A) and Cg-β-catenin (B) mRNA expression relative to EF1α measured by real-time RT-PCR in different tissues of *C. gigas*. Total RNAs were isolated from male and female gonadic areas in stages II (Go), labial palps (LP), gills (Gi), mantle (M), adductor muscle (AM) and digestive glands (DG). Number of animals per tissue: n = 6. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Values are mean ± SEM of triplicates. Different letters (a-d) indicate significant differences (Wilcoxon Mann-Whitney test * P<0.01) of transcript expression between tissues. A. This graph shows Cg-SoxE mRNA levels significantly higher especially in the digestive gland but also in the labial palps and to a lesser extent in the mantle compared to other tissues. B. This bar chart shows significantly higher Cg-β-catenin mRNA expression in the female gonadic areas and in the digestive gland compared to other tissues.

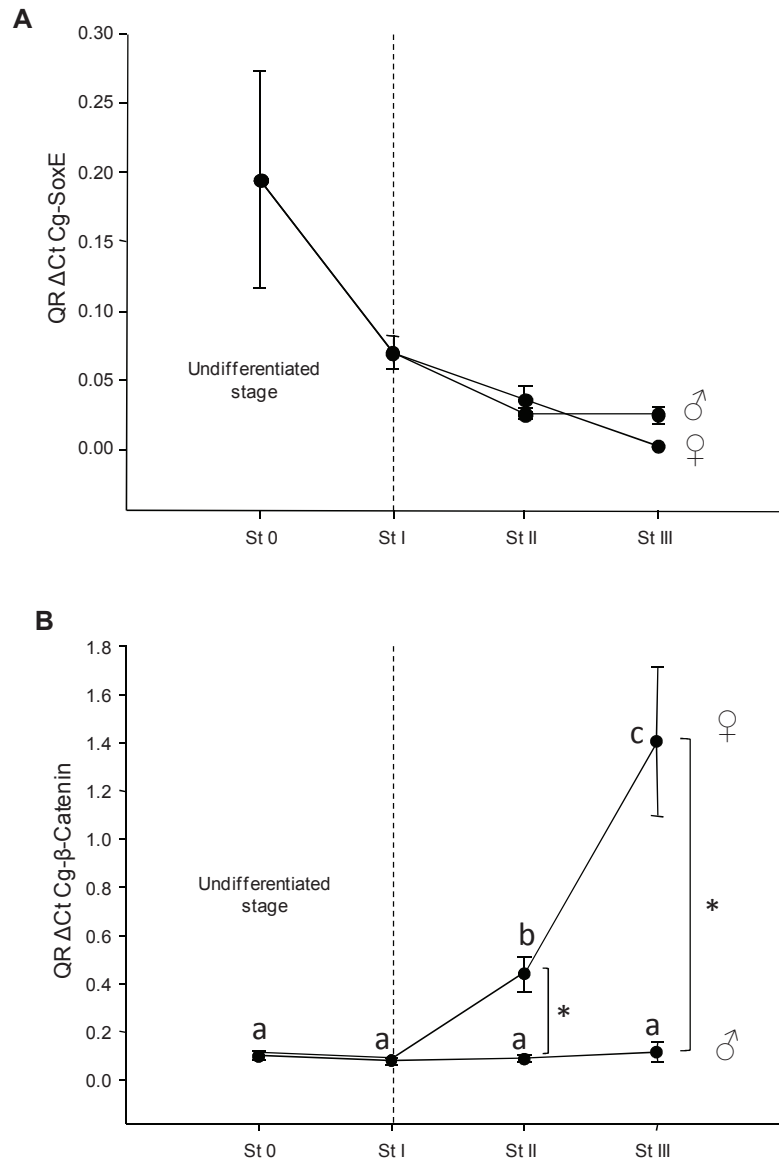


Figure 6: Cg-SoxE (A) and Cg-β-catenin (B) mRNA temporal expression relative to EF1α measured by real-time RT-PCR in adult gonadic areas of *C. gigas* along a gametogenetic cycle. Stage 0 (n=8); stage I (n=9); stage II (II♂, n=8 - II♀, n=9); stage III (III♂, n=6 - III♀, n=6). The vertical dotted lines show the transition during the stage I when sex becomes discernible. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Values are mean ± SEM of triplicates. Letters (a-c) and stars indicate respectively significant differences of expression between stages for each sex and between sexes. A. This graph shows Cg-SoxE mRNA levels decreasing in males and females along the gametogenetic cycle. The expression becomes significantly lower (Wilcoxon Mann-Whitney * P<0.01) from stage II males and females. B. This graph shows Cg-β-catenin mRNA expression significantly increasing along the gametogenetic cycle only in female gonadic areas, especially in the mature stage (stage III).

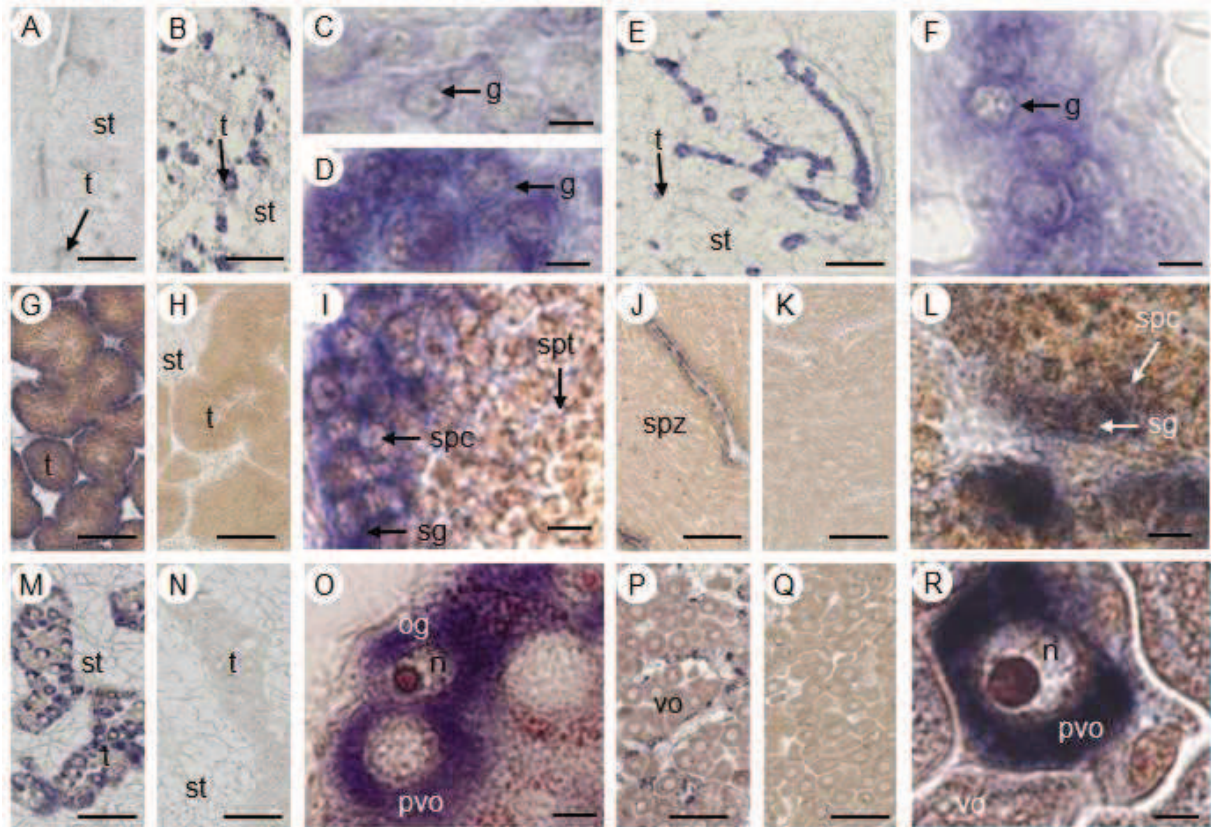


Figure 7: Cg-SoxE mRNA cellular expression pattern by *in situ* hybridization in the gonadic tubules during the adult gametogenetic cycle with antisense riboprobe (A-F, G, I, J, L, M, O, P,R) and sense riboprobe (H, K, N, Q). In stage 0 (A-D), a cytoplasmic staining is observed in early germ cells; it is weak in some animals (A, C) and strong in others (B, D). In stage I (E, F), it is still observed in early germ cells but it is also found in gonias. In males, whatever the stage [II (G, I) or III (J, L)], a mRNA expression is essentially found in spermatogonia and to a lesser extent in spermatocytes. In females, a staining is observed in stages II (M, O) and III (P, R) in oogonia and pre-vitellogenic oocytes (M, O, P, R) but not in vitellogenic oocytes as observed in stage III (P, R). Whatever the sex or the stage, a somatic staining cannot be excluded. No staining is observed with the sense riboprobe (H, K, N, Q). g: gonias, n: nucleus, og: oogonia, pvo: pre-vitellogenic oocytes, spc: spermatocytes, sg: spermatogonia, spt:spermatids, spz: spermatozoa, vo: vitellogenic oocytes. Bars: 5 μ m.

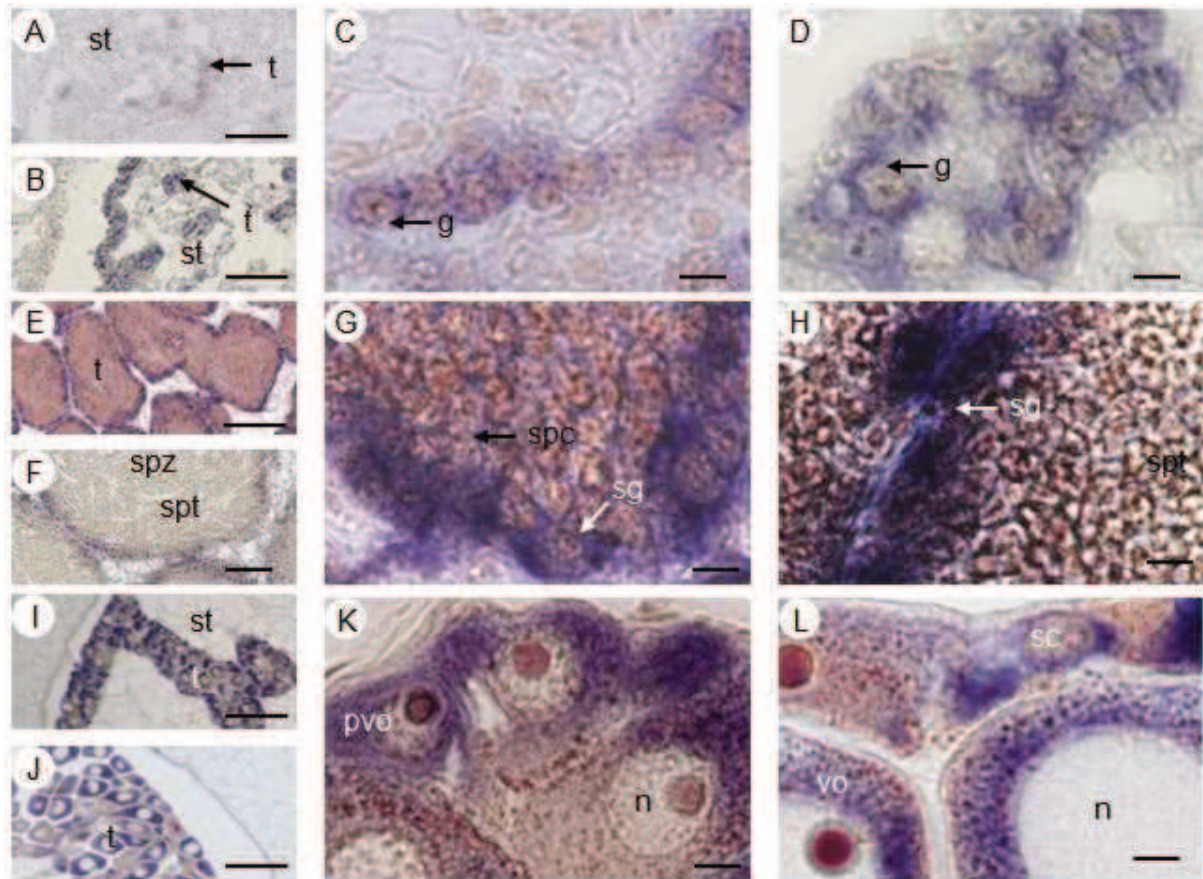


Figure 8: β -catenin mRNA cellular expression pattern by *in situ* hybridization in the gonadic tubules during the adult gametogenetic cycle with antisense riboprobe (A-L) and sense riboprobe (results not shown). A cytoplasmic staining is observed in early germ cells in stages 0 (A, C) and I (B, D), and in gonias in the latter stage (B, D). In males the expression is mainly found in spermatogonia but also to a lesser extent in spermatocytes in stage II (E, G) as in stage III (F, H). Whatever the stage, a somatic staining cannot be excluded. In females a signal is observed in oogonia (results not shown) and in pre-vitellogenic oocytes (I, K) in stage II. In stage III, it is also observed in vitellogenic oocytes (J, L) and can also be suspected in the somatic cells surrounding germ cells (L). No staining is observed with the sense riboprobe (results not shown). g: gonia, n: nucleus, pvo: pre-vitellogenic oocytes, spc: spermatocytes, sc: somatic cell, sg: spermatogonia, spt: spermatids, spz: spermatozoa, vo: vitellogenic oocytes. Bars: 5 μ m.

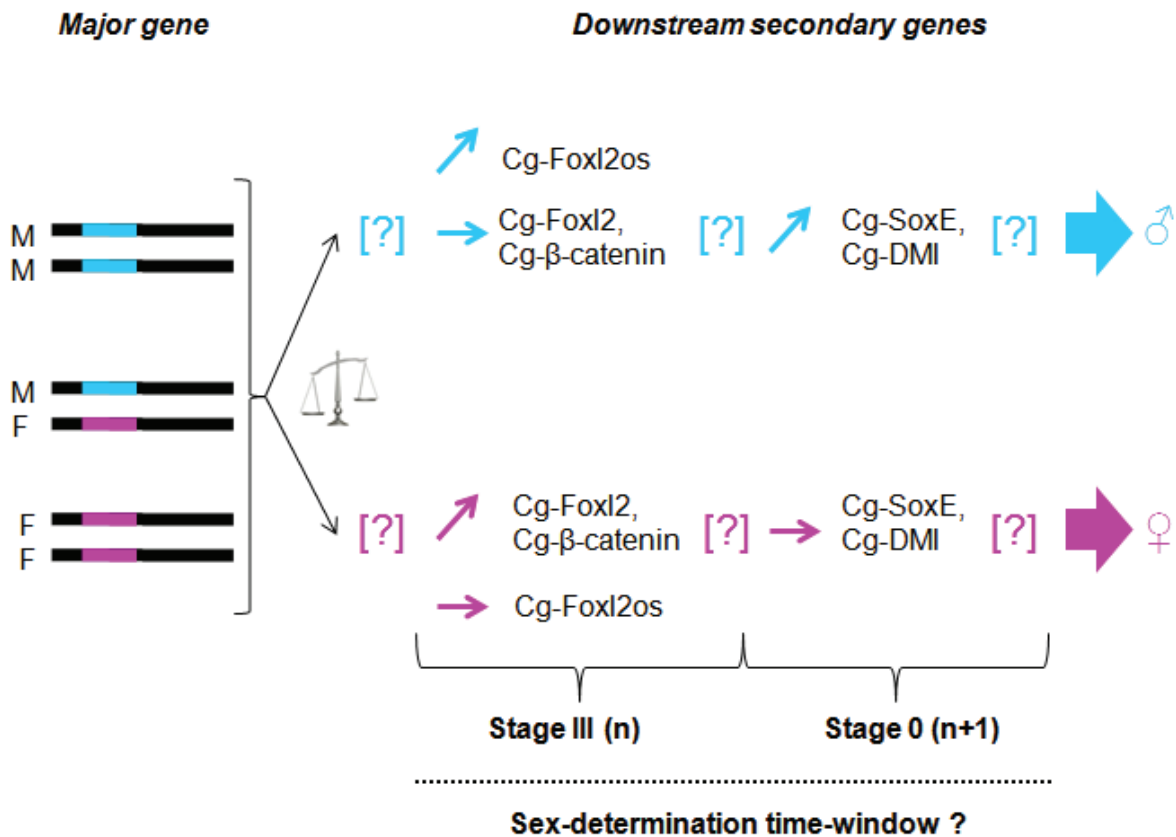


Figure 9: Schematic representation of the hypothetical model of sex-determination pathways in *C. gigas* based on mRNA expression results. Under the leadership of a major gene with three potential genotypes and which may be under an environmental influence (Hedrick and Hedgecock, 2010; Guo et al., 2012), downstream genes of the molecular cascades would be more or less expressed, in order to induce the future sex of the animal. The time-window of sex determination may take place in the oyster between the stage III of a cycle and the stage 0 of the following one. n and (n+1) refer to two gametogenetic cycles which follow one after the other. M: male allele of the major gene; F: female allele of the major gene; [?]: unknown genes.

References

- Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., McCrea, P.D., de Crombrughe, B., 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18, 1072–1087.
- 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.
- Barrionuevo, F., Scherer, G., 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 42, 433–436.
- Bernard, P., Sim, H., Knowler, K., Vilain, E., Harley, V., 2008. Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 40, 2889–2900.
- Bienz, M., 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* 15, R64–67.
- Chang, H., Gao, F., Guillou, F., Taketo, M.M., Huff, V., Behringer, R.R., 2008. Wt1 Negatively Regulates B-Catenin Signaling During Testis Development. *Development* 135, 1875–1885.
- Chang, Y.-F., Lee-Chang, J.S., Harris, K.Y., Sinha-Hikim, A.P., Rao, M.K., 2011. Role of β -Catenin in Post-Meiotic Male Germ Cell Differentiation. *PLoS One* 6..
- Chassot, A.-A., Gregoire, E.P., Lavery, R., Taketo, M.M., de Rooij, D.G., Adams, I.R., Chaboissier, M.-C., 2011. RSPO1/ β -Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary. *PLoS One* 6, 25641.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., Chaboissier, M.-C., 2008. Activation of β -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.
- Dumond, H., Al-Asaad, I., Chesnel, A., Chardard, D., Boizet-Bonhoure, B., Flament, S., Kuntz, S., 2011. Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool. Part B: Mol. Dev. Evol.* 316B, 199–211.
- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., Penrad-Mobayed, M., 2008. Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev. Dyn.* 237, 2996–3005.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

- Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdain, P., Lelong, C., Kellner, K., Heude Berthelin, C., 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Res.* 340, 201–210.
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., Lécureuil, C., Guillou, F., Huff, V., 2006. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *PNAS* 103, 11987–11992.
- Golestaneh, N., Beauchamp, E., Fallen, S., Kokkinaki, M., Üren, A., Dym, M., 2009. Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* 138, 151–162.
- 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* 394–402.
- Guo, X., Li, Q., Wang, Q.Z., Kong, L.F., 2012. Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. *Mar. Biotechnol.* 14, 218–226.
- Haag, E.S., Doty, A.V., 2005. Sex Determination across Evolution: Connecting the Dots. *PLoS Biol* 3, 21.
- Hedrick, P.W., Hedgecock, D., 2010. Sex determination: genetic models for oysters. *J. Hered.* 101, 602–611.
- Herpin, A., Schartl, M., 2011. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal* 278, 1010–1019.
- Heude-Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., Kellner, K., 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebr. Repr. Dev.* 40, 79–86.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.-S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., Nagahama, Y., 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* 78, 333–341.
- Jakob, S., Lovell-Badge, R., 2011. Sex determination and the control of *Sox9* expression in mammals. *FEBS J.* 278, 1002–1009.
- Kalis, A.K., Kroetz, M.B., Larson, K.M., Zarkower, D., 2010. Functional Genomic Identification of Genes Required for Male Gonadal Differentiation in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 185, 523–535.
- Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., Koopman, P., 1996. A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813–2822.

Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2006. Fgf9 and Wnt-4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biol* 4.

Knower, K.C., Kelly, S., Ludbrook, L.M., Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Sekido, R., Lovell-Badge, R., Harley, V.R., 2011. Failure of SOX9 Regulation in 46XY Disorders of Sex Development with SRY, SOX9 and SF1 Mutations. *PLoS One* 6.

Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Nozu, R., Nakamura, M., 2010. Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (Foxl2) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Biol. sex. dif.* 1.

Lau, Y.-F.C., Li, Y., 2009. The human and mouse sex-determining SRY genes repress the Rspol/ β -catenin signaling. *J. Genet. Genomics* 36, 193–202.

Liu, C.-F., Bingham, N., Parker, K., Yao, H.H.-C., 2009. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum. Mol. Genet.* 18, 405–417.

Luo, Y.-S., Hu, W., Liu, X.-C., Lin, H.-R., Zhu, Z.-Y., 2010. Molecular cloning and mRNA expression pattern of Sox9 during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* 306, 322–328.

Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., Capel, B., 2008. Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2949–2955.

MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.

Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., Englert, C., Kim, Y., Capel, B., Eguchi, N., Urade, Y., Boizet-Bonhoure, B., Poulat, F., 2009. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* 136, 1813–1821.

Mora, J.M., Fenwick, M.A., Castle, L., Baithun, M., Ryder, T.A., Mobberley, M., Carzaniga, R., Franks, S., Hardy, K., 2012. Characterization and Significance of Adhesion and Junction-Related Proteins in Mouse Ovarian Follicles. *Biol Reprod.* 86, 1–14

Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P., 2009a. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 152, 189–196.

Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P., 2009b. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 154, 134–142.

Nanda, S., DeFalco, T.J., Hui Yong Loh, S., Phochanukul, N., Camara, N., Van Doren, M., Russell, S., 2009. *Sox100B*, a *Drosophila* Group E Sox-domain Gene, Is Required for Somatic Testis Differentiation. *Sex. Dev.* 3, 26–37.

Nicol, B., Guiguen, Y., 2011. Expression Profiling of Wnt Signaling Genes during Gonadal Differentiation and Gametogenesis in Rainbow Trout. *Sex Dev* 5, 318–329.

Oreal, E., Pieau, C., Mattei, M.G., Josso, N., Picard, J.Y., Carré-Eusèbe, D., Magre, S., 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* 212, 522–532.

Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., Camerino, G., 2006. *R-spondin1* is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38, 1304–1309.

Raghuvver, K., Senthilkumaran, B., 2010. Isolation of *sox9* duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of *sox9* in testicular slices. *Reproduction* 140, 477–487.

Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.-L., Bremiller, R.A., Wilson, C., Cañestro, C., Postlethwait, J.H., 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (*Amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns GEP* 5, 655–667.

Santerre, C., Sourdaire, P., Martinez, A.-S., 2012. Expression of a Natural Antisense Transcript of *Cg-Foxl2* during the Gonadic Differentiation of the Oyster *Crassostrea gigas* : First Demonstration in the Gonads of a Lophotrochozoa Species. *Sex. Dev.* 6, 210–221.

Sashikawa Kimura, M., Mutoh, H., Sugano, K., 2011. SOX9 is expressed in normal stomach, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma in humans. *J. Gastroenterol.* 46, 1292–1299.

Sekido, R., 2010. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 42, 417–420.

Sekido, R., Lovell-Badge, R., 2009. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 25, 19–29.

Shen, J.H.-C., Ingraham, H.A., 2002. Regulation of the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1 by Sox Proteins. *Mol. Endocrinol.* 16, 529–540.

Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D., 2007. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Dyn.* 236, 1055–1063.

Shoemaker, C.M., Crews, D., 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin. Cell Devel. Biol.* 20, 293–303.

- Takezawa, Y., Yoshida, K., Miyado, K., Sato, M., Nakamura, A., Kawano, N., Sakakibara, K., Kondo, T., Harada, Y., Ohnami, N., Kanai, S., Miyado, M., Saito, H., Takahashi, Y., Akutsu, H., Umezawa, A., 2011. β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep* 1.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tomaselli, S., Megiorni, F., Lin, L., Mazzilli, M.C., Gerrelli, D., Majore, S., Grammatico, P., Achermann, J.C., 2011. Human RSPO1/R-spondin1 Is Expressed during Early Ovary Development and Augments β -Catenin Signaling. *PLoS ONE* 6.
- Topol, L., Chen, W., Song, H., Day, T.F., Yang, Y., 2009. Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting B-Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 284, 3323–3333.
- Torres Maldonado, L.C., Landa Piedra, A., Moreno Mendoza, N., Marmolejo Valencia, A., Meza Martínez, A., 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.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., Guiguen, Y., 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn.* 236, 2198–2206.
- von Hofsten, J., Olsson, P.-E., 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 63.
- Vries, W.N. de, Evsikov, A.V., Haac, B.E., Fancher, K.S., Holbrook, A.E., Kemler, R., Solter, D., Knowles, B.B., 2004. Maternal β -catenin and E-cadherin in mouse development. *Development* 131, 4435–4445.
- Wang, L., Heidt, D.G., Lee, C.J., Yang, H., Logsdon, C.D., Zhang, L., Fearon, E.R., Ljungman, M., Simeone, D.M., 2009. Oncogenic Function of ATDC in Pancreatic Cancer through Wnt Pathway Activation and β -Catenin Stabilization. *Cancer Cell* 15, 207–219.
- Wegner, M., 2010. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 42, 381–390.
- Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A., Sinclair, A.H., 1999. Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev. Dyn.* 214, 171–177.
- Wilson, M.J., Dearden, P.K., 2008. Evolution of the insect Sox genes. *BMC Evol Biol* 8.
- Wu, G.C., Chang, C.F., 2009. wnt4 is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol. Reprod.* 81, 1073.

Wu, G.-C., Chang, C.-F., 2012. The switch of secondary sex determination in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiol. Biochem.* In press.

Yokoi, H., Postlethwait, J.H., 2011. Genome Duplication and Subfunction Partitioning: Sox9 in Medaka and Other Vertebrates, in: Naruse, K., Tanaka, M., Takeda, H. (Eds.), *Medaka*. Springer Japan, Tokyo, pp. 323–337.

Yusa, Y., 2007. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca—an overview*. *Am. Malacol. Bull.* 23, 89–98.

Zhang, Y., Li, F., Sun, D., Liu, J., Liu, N., Yu, Q., 2010. Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. *Mol. Biol. Rep.* 38, 275–282.

Zhou, L., Gui, J.-F., 2010. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 181–193.

Zhou, L., Tapas, C., Wang, D., Nagahama, Y., 2009. R-spondin1 is essential for ovarian differentiation in fish. 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China.

III. Annexe : Expression de la protéine de la Cg- β -caténine chez l'adulte par immunofluorescence

Afin de préciser le rôle potentiel de la β -caténine, chez l'huître, au cours du cycle gamétogénétique, l'étude de son expression protéique a été initiée en immunofluorescence grâce à un anticorps monoclonal hétérologue.

Choix de l'anticorps

En absence d'anticorps homologue disponible chez l'huître, un anticorps hétérologue commercial a été utilisé. Aucun anticorps dirigé contre le domaine conservé armadillo n'existait, un anticorps dirigé contre la partie C terminale de la β -caténine a donc été choisi : l'anticorps anti- β -caténine humaine de chez Abcam (ab6302). Il est dirigé contre le peptide PGDSNQLAWFDTDL qui est identique à plus de 70% à la séquence de la Cg- β -caténine (Figure 39). Il reconnaît ainsi toutes les formes de la β -caténine (membranaire, cytoplasmique, nucléaire, inactive phosphorylée, active déphosphorylée). De plus, un anticorps hétérologue synthétisé à partir de ce même peptide a été validé en *Western Blotting* chez la crépidule (HENRY *et al.* 2010).

Cg- β -caténine	NQGMPWFDTDL
	NQ + WFDTDL
Epitope	NQ-LAWFDTDL

Figure 39 : Comparaison et identités de séquences entre la protéine Cg- β -caténine et l'épitope reconnu par l'anticorps anti- β -caténine humaine.

Expression protéique dans l'aire gonadique

La localisation cellulaire de la protéine de la Cg- β -caténine au niveau des tubules gonadiques chez des individus en stade II mâle et en stade II femelle est illustrée sur la Figure 40. Bien que le déterminisme sexuel ne soit pas supposé avoir lieu en stade II, ce dernier a été choisi car il présente la majorité des cellules de la lignée germinale. Chez la femelle, un fort marquage est présent au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme des ovogonies et des ovocytes en pré- et en vitellogénèse mais également dans les cellules somatiques intra-tubulaires qui les entourent. Un marquage nucléaire plus faible

est également visible dans ces dernières et/ou dans les ovogonies. Chez le mâle, un marquage membranaire et cytoplasmique est également observé dans les spermatogonies et les spermatocytes et probablement aussi dans les cellules somatiques associées.

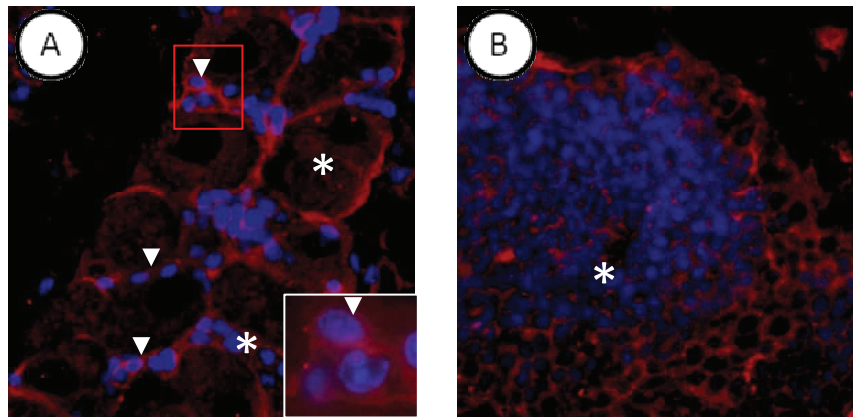


Figure 40 : Expression de la Cg- β -caténine dans les tubules gonadiques de l'huître chez la femelle (A) et chez le mâle (B) au stade II.

Têtes de flèches : cellules somatiques ; étoiles : cellules germinales. Chez le mâles, les cellules somatiques ne sont pas distinguable des spermatogonies. Insert : Agrandissement de la zone encadrée en rouge montrant le marquage nucléaire dans les cellules somatiques et/ou ovogonies.

Des expressions protéiques de la β -caténine chez les deux sexes, dans divers types et à diverses sub-localisations cellulaires ont déjà été mentionnées chez la souris. Ainsi, une expression membranaire et cytoplasmique est observée dans les cellules germinales embryonnaires et somatiques associées, chez les femelles (CHASSOT *et al.* 2008 ; CHANG *et al.* 2008 ; LIU *et al.* 2009). Chez ces dernières, une expression nucléaire est également mentionnée dans les cellules somatiques pour la forme active déphosphorylée active de la β -caténine (CHASSOT *et al.* 2008 ; LIU *et al.* 2009). Chez les mâles, une expression cytoplasmique et membranaire est retrouvée dans les cellules germinales et dans les cellules somatiques (CHANG *et al.* 2008 ; MAATOUK *et al.* 2008). Une expression membranaire est également retrouvée plus tardivement, dans les ovocytes mûres et les spermatozoïdes (TAKEZAWA *et al.* 2011).

Chez les mammifères, la β -caténine interviendrait selon ses deux modes d'action. Lorsqu'elle est membranaire, elle interagirait directement avec deux autres molécules des jonctions adhérentes, la E-cadhérine et l' α -caténine pour former un complexe liant les cadhérines au cytosquelette d'actine. Ces associations joueraient un rôle dans la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte lors de la fécondation (TAKEZAWA *et al.* 2011) ou dans la

prolifération et l'entrée en méiose des cellules germinales chez les femelles (CHASSOT *et al.* 2008, 2011). Chez les mâles, ces complexes situés à l'interface entre les cellules germinales et cellules sertoliennes seraient impliqués dans la maturation des cellules germinales (CHANG *et al.* 2011). Indépendamment de ce processus, chez les femelles, l'accumulation de la β -caténine cytoplasmique entraînerait sa translocation dans le noyau où elle activerait la transcription de gènes cibles, notamment BMP-2 et la Follistatine (MAATOUK *et al.* 2008). Chez les mâles, la β -caténine cytoplasmique est rapidement dégradée par le protéasome (CHANG *et al.* 2009).

Ainsi, chez l'huître l'expression membranaire retrouvée au stade II à la fois chez les mâles et chez les femelles pourrait laisser supposer un rôle de la Cg- β -caténine dans la maturation des cellules germinales. L'expression nucléaire retrouvée chez les femelles pourrait suggérer un rôle dans la folliculogenèse par une activation de la transcription de gènes cibles comme la Follistatine mais également un rôle dans le maintien du sexe femelle par la répression de l'expression de gènes mâles. Après validation de l'anticorps en *Western Blotting*, ces expérimentations doivent être poursuivies sur tout le cycle gamétogénétique. Cela permettra de préciser le rôle potentiel de la Cg- β -caténine dans le déterminisme sexuel de l'huître, notamment en mettant en évidence une expression protéique dans les cellules germinales et/ou somatiques précoces en stade III femelle.

Chapitre 3:
Une régulation épigénétique
du sexe chez l'huître ?

Caractérisation d'un
ARN anti-sens naturel de Cg-Foxl2

I. Introduction

1. Objectifs de l'étude

L'existence d'un ARN anti-sens naturel (NAT) de Cg-Foxl2, facteur impliqué dans la différenciation gonadique femelle, a récemment été suspectée en hybridation *in situ* sur des aires gonadiques d'individus adultes en stades II (NAIMI *et al.* 2009b). Ceci pourrait suggérer que le déterminisme sexuel est régulé de manière épigénétique chez *C. gigas*. Chez cette espèce, une régulation épigénétique a d'ailleurs déjà été mentionnée chez *C. gigas*, essentiellement pour réguler des fonctions liées au stress ou à l'environnement (GAVERY et ROBERTS 2010).

L'objectif de cette étude était donc de démontrer l'existence de ce NAT et d'appréhender son rôle dans la différenciation gonadique chez l'huître à travers plusieurs questions : (1) Est-il totalement ou partiellement complémentaire à Cg-Foxl2 ? (2) A quelle période est-il exprimé et régule-t-il Cg-Foxl2 au cours du cycle gamétogénétique et au cours du premier développement de l'huître ? (3) Est-il exprimé dans les mêmes types cellulaires que Cg-Foxl2 ? (4) Par quel mécanismes est-il susceptible de réguler l'expression de son transcrite sens ?

2. Résultats

Nos résultats mettent en évidence, pour la première fois chez l'huître et dans les gonades d'un mollusque, l'existence d'un ARN anti-sens naturel et sa séquence partielle. Ce NAT, qui a été nommé Cg-Foxl2os pour *opposite strand*, est parfaitement complémentaire à son transcrite sens sur toute sa portion caractérisée (534 b) et possède une queue poly (A) lui assurant probablement sa stabilité. L'analyse de sa séquence protéique déduite semble indiquer qu'il ne serait pas codant. Son mécanisme de synthèse est encore inconnu ; il pourrait provenir, soit de la transcription du brin opposé de l'ADN génomique, soit directement de l'ARNm sens, l'absence d'intron dans la séquence de Cg-Foxl2 ne permettant pas de discriminer ces 2 hypothèses.

Chez l'adulte, Cg-Foxl2 et Cg-Foxl2os sont tous les deux détectés à tous les stades du cycle gamétogénétique en PCR en temps réel. Cg-Foxl2 augmente significativement au stade III chez les femelles (NAIMI *et al.* 2009b) tandis que Cg-Foxl2os augmente uniquement au stade III chez les mâles. Chez ces derniers, Cg-Foxl2os pourrait réguler l'expression de son

transcrit sens, inhibant ainsi une différenciation ovarienne. De plus, deux groupes de mâles peuvent être distingués, l'un présentant une forte expression de Cg-Foxl2os et l'autre une expression faible. Les premiers pourraient correspondre à des mâles qui resteraient mâles et les seconds à des mâles qui évolueraient en femelle au cycle suivant. Les expériences d'hybridation *in situ*, réalisées sur l'intégralité du cycle gamétogénétique, confirment les résultats obtenus en PCR en temps réel. Cg-Foxl2 est détecté dans les tubules gonadiques à tous les stades, dans les cellules germinales les plus précoces, c'est à dire les gonies indifférenciées (au stade 0 et I), les spermatogonies et spermatocytes (aux stades II et III mâles) et les ovogonies et ovocytes en pré-vitellogenèse (aux stades II et III femelles). Cg-Foxl2os n'est quant à lui exprimé que chez le mâle dans les mêmes types cellulaires, c'est à dire les spermatogonies et les spermatocytes. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une régulation de Cg-Foxl2 par son NAT chez l'huître mâle.

Au cours du développement à 18°C, Cg-Foxl2 et Cg-Foxl2os sont exprimés en qPCR à tous les stades, des larves 7 jpf au naissain âgé de 4 mois, avec un pic d'expression chez le naissain âgé de 2 mois. A ce stade, l'expression de Cg-Foxl2os est significativement supérieure à celle de l'ARN messager. Cg-Foxl2os pourraient donc réguler l'expression de Cg-Foxl2 chez le naissain et inhiber ainsi une différenciation ovarienne chez cette espèce protandre.

Afin d'appréhender le mécanisme potentiel de régulation de Cg-Foxl2 par Cg-Foxl2os, une approche en *RNA protection-based approach* a été entreprise. Elle a permis de démontrer l'existence de duplex entre les deux transcrits chez l'huître et ainsi d'émettre plusieurs hypothèses sur les mécanismes de régulation de Cg-Foxl2 par son NAT lors de la différenciation gonadique. Ce dernier pourrait (i) changer la structure secondaire de l'ARNm en exposant ou masquant des sites de régulation notamment les *AU Rich Elements*, (ii) altérer la traduction de la protéine Cg-Foxl2 ou (iii) conduire à la dégradation de l'ARNm par la génération de siRNA par l'intermédiaire, par exemple, d'enzymes de type DICER.

Les fonctions physiologiques de Cg-Foxl2 et de Cg-Foxl2os dans les gonades de *C. gigas* restent encore inconnues et doivent donc être approfondies, notamment par des approches en RNAi et par l'étude de l'expression protéique de Cg-Foxl2. Cette dernière a été initiée à la fois à l'aide d'un anticorps homologue (Annexe) et d'un anticorps hétérologue.

Un anticorps homologue a été synthétisé chez deux lapins suite à des injections de 2 peptides de la séquence protéique déduite de Cg-Foxl2. En *Western Blotting*, cet anticorps a reconnu, dans tous les tissus testés une unique bande plus ou moins intense qui disparaissait en pré-incubant l'anticorps avec les peptides immunogènes. Cette bande présentant une taille supérieure à celle attendue de la protéine de Cg-Foxl2, deux hypothèses pouvaient alors être envisagées, soit Cg-Foxl2 possédait des modifications post-traductionnelles affectant son poids moléculaire de façon importante (10KDa), soit la bande ne correspondait pas à Cg-Foxl2.

Aucun marquage n'a pu être mis en évidence dans les aires gonadiques de femelles au stade III en immunohistochimie quel que soit le stade ou la gamme variée de dilution de l'anticorps testée. Afin de valider la spécificité de l'anticorps, une immunoprécipitation a été réalisée sur des aires gonadiques puis le produit obtenu a été séquencé en MS/MS. Aucun peptide identifié ainsi ne correspondait à Cg-Foxl2 ou à une protéine correspondant à une EST des banques de données de l'huître (résultats non illustrés), ce qui a nous a conduit à considérer cet anticorps anti-Foxl2 comme non-spécifique de Cg-Foxl2. De ce fait, un second *Western Blotting* a été réalisé avec un anticorps hétérologue commercial d'épitope connu mais aucune bande n'a pu être obtenue (résultats non illustrés).

II. Publication

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication qui est insérée ci-après : Santerre, Sourdain et Martinez (2012). *Expression of a Natural Antisense Transcript of Cg-Foxl2 during the Gonadic Differentiation of the Oyster Crassostrea gigas : First Demonstration in the Gonads of a Lophotrochozoa Species. Sexual Development* 6 (4) 210-221.

Ils ont également fait l'objet (i) d'une présentation affichée au congrès de la SFG "Genetics, Epigenetics and Evolution of Sex Chromosomes" en juin 2011 à l'université Paris-Diderot (France). Santerre, Sourdain, Martinez (2011) *Expression of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster Crassostrea gigas : first demonstration of a natural antisense transcript* et (ii) d'une présentation orale au congrès Physiomar en septembre 2012 à l'université de Saint-Jacques de Compostelle (Espagne). Santerre, Sourdain, Martinez (2012) *Expression of a Natural Antisense Transcript of Cg-Foxl2 during the Gonadic Differentiation of the Oyster Crassostrea gigas : potential involvement in sex determination ?*

Expression of a Natural Antisense Transcript of Cg-Foxl2 during the Gonadic Differentiation of the Oyster *Crassostrea gigas*: First Demonstration in the Gonads of a Lophotrochozoa Species

C. Santerre^{a, b} P. Sourdain^{a, b} A.-S. Martinez^{a, b}

^aUniversité de Caen Basse-Normandie and ^bCNRS INEE, FRE 3484 BIOMEA, Caen, France

© Free Author
Copy – for per-
sonal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Key Words

Foxl2 · Gonadic differentiation · Natural antisense transcript · Oyster · Sex determination

regulate its mRNA expression through formation of cytoplasmic RNA-RNA duplexes during the oyster gonadic differentiation.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Abstract

In the oyster *Crassostrea gigas*, a successive hermaphrodite, *Cg-Foxl2*, an ortholog of *Foxl2*, is suspected to be involved in vitellogenesis or female sex determination. The existence of a natural antisense transcript (NAT) of this factor has been suspected in gonads but needs to be confirmed to better understand the early events of the gonadic differentiation. The occurrence of this NAT was studied by orientation-specific RT-PCR. The NAT and its mRNA expressions were investigated during the development and in adults by real-time PCR and in situ hybridization. The presence of stable in vivo RNA-RNA duplexes was also explored by RNase protection-based approach. This work is the first evidence of characterization of a NAT in the gonads of mollusks and Lophotrochozoa. This NAT named Cg-Foxl2os is supposed to be polyadenylated and forms RNA-RNA duplexes with its mRNA. Cg-Foxl2os is significantly more expressed than Cg-Foxl2 in 2-month-old spat and in mature males. It is co-localized with the mRNA in the cytoplasm of spermatogonia and spermatocytes. The results of this study demonstrate the existence of a NAT of Cg-Foxl2 in the gonads of *C. gigas*. It may

FOXL2 (Forkhead box L2), which encodes a forkhead transcription factor, is one of the most conserved genes involved in early events of the cascade leading to ovary differentiation in both gonochoric and hermaphrodite species of vertebrates examined to date [Kobayashi et al., 2010]. Its ovarian expression, in general strictly somatic, begins early during the development and persists until the adult age [Caburet et al., 2011]. In vertebrates, this factor would be involved not only in female gonadal differentiation but also in its maintenance throughout the adult life by preventing transdifferentiation of follicle cells to 'testis-like' cells in the adult ovary [Veitia, 2010]. In 'non-vertebrate' organisms, *Foxl2* homologs have also been characterized in different phyla such as sponges [Adell and Müller, 2004], cnidarians [Magie et al., 2005], protostome ecdysozoa like insects [Mazet et al., 2003; De Loof et al., 2010], deuterostome echinoderms [Tu et al., 2006] and cephalochordata [Yu et al., 2008] but not in Lophotrochozoa, the group the pacific oyster belongs to. Their role is not well defined, although a negative effect on amino acid-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1661-5425/12/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/sxd

Anne-Sophie Martinez
FRE 3484 BIOMEA, Université de Caen Basse-Normandie
Esplanade de la Paix
FR-14032 Caen (France)
Tel. +33 2 31 56 51 64, E-Mail anne-sophie.martinez@unicaen.fr

induced vitellogenin gene expression and egg-laying was mentioned in knockdown *FoxN1/N2/L/O* mosquito *Aedes aegypti* [Hansen et al., 2007]. In the oyster *Crassostrea gigas*, a successive irregular protandrous hermaphrodite mollusk, a *Foxl2* homolog called *Cg-Foxl2* (GenBank: FJ768956.1) has recently been identified [Naimi et al., 2009a]. It may play a role in key steps of the gonadic differentiation of *C. gigas*, (i) at the first gonadic establishment in spats of around 1–2-months of age, when primordial germ cells may differentiate into germinal stem cells and (ii) in adults for vitellogenesis in females. The role of this factor in the oyster's gonadic differentiation is still not clear for many reasons: (i) the oyster sex determination is still unknown and no molecular female- or male-specific markers are actually available; (ii) the adult gametogenesis is poorly known as no advanced study on oogenesis and only few on spermatogenesis [Franco et al., 2008, 2010, 2011] are available; (iii) the first gonadic development is still unknown regarding both the time-window, the factors, the cells and the mechanisms involved.

Natural antisense transcripts (NAT) are single-stranded endogenous RNAs that are transcribed from the opposite strand of RNA/DNA and overlap in part into the sense RNA [Beiter et al., 2009]. Cis-NATs are transcribed from the same genomic locus while trans-NATs are transcribed from separate genomic loci (e.g. pseudogene) and display very partial sequence complementary [Beiter et al., 2009]. Many cis- or trans-NATs have been first identified in prokaryotes and are being encountered with increasing frequency in vertebrates as well as in 'non-vertebrate' eukaryotes [Numata et al., 2007]. NATs are assumed to exert positive or negative regulation at different levels of gene expression [Faghihi and Wahlestedt, 2009], playing therefore significant roles in physiological, pathological and epigenetic processes, including genome imprinting, alternative splicing, mRNA stability, translational regulation, RNA export, DNA methylation or histone modifications [Su et al., 2010]. In mammals, NATs have also been mentioned for genes involved in reproduction/gonadic differentiation processes such as *GnRH*, *Wt1*, *Xist* and *Foxl2* [Cocquet et al., 2005; Splinter et al., 2011]. In carp, GnRH antisense transcripts reduce GnRH expression and secretion, leading to reduce gonadotropin synthesis and gonadal development, producing therefore sterile fish [Hu et al., 2007]. In human, WT1 NAT has an important regulatory role on the mRNA expression and can become deregulated in case of cancer [Dallosso et al., 2007]. *XIST*, responsible of the X chromosome inactivation, would be silenced by its NAT Tsix in mammals [Splinter et al., 2011]. In mice, *Foxl2* mRNA expression

may be regulated by an antisense spliced non-coding RNA (*Foxl2os*), overlapping the mRNA and localized in the same somatic cells of developing and mature ovaries [Cocquet et al., 2005]. In oyster, the existence of a NAT of *Cg-Foxl2*, co-localized with its mRNA in germ cells in adults, has also been highlighted by in situ hybridization (ISH), suggesting therefore complementarities between both transcripts [Naimi et al., 2009a].

The objective of this work was therefore (i) to confirm the occurrence of a NAT of *Cg-Foxl2* in the gonads of *C. gigas*, (ii) to investigate its expression in parallel to the mRNA expression during the development and the adult gametogenetic cycle and (iii) to explore the potential presence of stable in vivo RNA-RNA duplexes generated by sense-antisense pairing. It will allow going a step further in the understanding (i) of the early events of the oyster gonadic differentiation and (ii) of the regulation of a gene expression by its NAT.

Materials and Methods

Experimental Animals

Developmental stages and adults used for real-time RT-PCR were provided by an oyster nursery (SATMAR, Gatteville, France). Adults were reared on the foreshore over 1 year. The rearing conditions of the developmental stages were as follows: no particular photoperiod for all stages; larvae were kept in filtered and UV-treated water at 27°C and fed ad libitum with *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* and *Isochrysis* sp. Tahiti; according to their age, spats were kept either under natural feeding and temperature conditions or in filtered and UV-treated water at 18°C and fed ad libitum with *C. calcitrans*, *C. gracilis* and *Skeletonema costatum*. Adults used for ISH were supplied by a local oyster farm (Lenoir, Blainville sur mer, France).

Total RNA Extraction and Poly(A) RNA Purification

Total RNAs were extracted from (i) pools of each developmental stage and (ii) individual adult gonadic areas at each gametogenetic stage classified according to Heude-Berthelin et al. [2001], using Tri-Reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. Poly(A) RNAs were purified with Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) following the manufacturer's instructions.

Primer Design for Reverse-Transcription and PCR

Sense and antisense primers specific to the oyster *Cg-Foxl2* sequence [Naimi et al., 2009a] (GenBank: FJ768956.1) and house-keeping gene sequences, actin (GenBank: AF026063) and elongation factor 1 α (GenBank: BQ426516) were designed by the Primer 3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu>) and are summarized in table 1. For reverse-transcriptions of the NAT of *Cg-Foxl2*, 4 different sense primers, FoxS1, FoxS2, FoxS3, FoxS4, positioned in the first third at the 5'-end of *Cg-Foxl2* sequence (fig. 1) were used. The purpose was to increase probabilities of successful reverse-

Fig. 1. Schematic representation of localizations and directions of antisense and sense primers designed from Cg-Foxl2 cDNA sequence, for reverse-transcriptions and PCR amplifications.

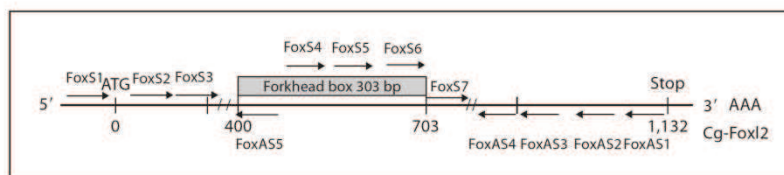


Table 1. Primers for Cg-Foxl2 NAT, mRNA and housekeeping gene detection and amplification

	Primer name	Sequence (5'→3')
Reverse transcription	FoxS1	CACGGACATTTTCGGTCTCA
	FoxS2	CGATTAATGCGACCGTCTTC
	FoxS3	GCAGCAAGACTCGAGAATCC
	FoxS4	AGTATTCGCCACAATTTGAGCTTAAAT
	FoxAS2	CCGCCGGATAGTCGTTAAG
PCR	FoxS3	GCAGCAAGACTCGAGAATCC
	FoxS5	GTTCCCTCGTGAAGGTGGAGAG
	FoxS6	GGAAATTTCTGGACCCTGGA
	FoxS7	AATATCAGGGATGGGCACAA
	FoxAS1	TGTCAGTTCTTGGCGGTCTCA
	FoxAS3	TCCTTGGGTGCAGGAACTA
	FoxAS4	GCCGATTTGGTTCATAGCAC
	FoxAS5	GCGTTAGGCGTTTTTCACTC
	qfElong1	ACCACCCTGGTGAGATCAAG
	qrElong1	ACGACGATCGCATTTCTCTT
	ActF	CTATGTAGGAGACGAGGCC
	ActR	GCCACTTGATGGCCAGAAGG

transcriptions of a NAT sequence, as it is suspected to overlap its sense counterpart [Naimi et al., 2009a], although its total length is unknown. For PCR, all the primer pairs were located downstream FoxS4 (fig. 1), except for FoxS3 and FoxAS5.

Orientation-Specific RT-PCR

In order to prove the presence of a NAT of the oyster *Cg-Foxl2* in adult gonadic areas, an orientation-specific RT-PCR technique, validated by Rosok and Sioud [2004], was performed. After DNaseI RQ1 (Promega, Charbonnières, France) treatment of 30 min at 37°C, 500 ng of total RNAs or poly(A) RNAs of stage III gonadic areas were reverse-transcribed using 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Promega) during 90 min at 37°C and with specific sense primers (FoxS1, FoxS2, FoxS3, FoxS4; table 1). PCR amplifications were performed on a total volume of 50 µl with 20 ng of cDNA in 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 U of GoTaq DNA polymerase (Promega) and 1 µM of each primer, combined in 3 different pairs, FoxS6/FoxAS4, FoxS6/FoxAS1, FoxS5/FoxAS1 (table 1 and fig. 1), and known to amplify 281-, 507- and 534-bp products, respectively. The reactions were cycled as follows: 5 min/95°C, 35 cycles (30 s/95°C, 45 s/60°C, 1 min/72°C),

7 min/72°C. PCR products were resolved in 1.2% agarose gels, cloned into a PCRII-Topo vector using a TA cloning kit (Invitrogen, Eragny sur Oise, France) and sequenced using ABI cycle sequencing chemistry (Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK). Deduced potential protein sequences were translated in different reading frames from the NAT sequences in ExPasy website (<http://web.expasy.org/translate/>) and they were compared to protein data banks in GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Real-Time RT-PCR

After DNaseI RQ1 (Promega) treatment, reverse-transcriptions were performed on 0.5 µg of total RNAs of individual gonadic areas of adults at each gametogenetic stage and of pools of developmental stages. In order to differentiate sense from antisense PCR products, either oligonucleotides specific to the antisense (FoxAS2 primer; table 1) or specific to the sense (FoxS4 primer; table 1) strand of *Cg-Foxl2* were used. PCR experiments were cycled 45× (15 s/95°C, 45 s/60°C) after 13 min/95°C, in a final volume of 25 µl, using the iCycler apparatus (BioRad, Marnes-La-Coquette, France) with triplicates of 40-ng template DNA, 12.5 µl of Mesa Green qPCR MasterMix (Eurogentec, Angers, France) and 100 nM of specific forward and reverse primers. Accurate amplifications of target amplicons were assessed by constructing melting curves. Reactions with RNAs not reverse-transcribed were used as negative controls. DNA amplifications were performed using (i) a specific pair of primers, FoxS7/FoxAS3 (table 1 and fig. 1), known to amplify a 102-bp product and located inside the complementary region and (ii) qfElong1 and qrElong1 primers (table 1) for the reference transcript EF1α. The PCR amplification efficiency ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series on several samples. The relative mRNA levels were normalized to EF1α transcripts using the following formula, $N = 100 \times 2^{(Ct_{EF1\alpha} - Ct_{Cg-gene})}$ [Lelong et al., 2007]. Statistical analyses were performed using 2-tailed Mann-Whitney U tests.

RNase Protection-Based Approach: Detection of RNA-RNA Duplexes

Detection of RNA-RNA duplexes was performed following the protocol described by Soldà et al. [2005] with slight modifications. Ten micrograms of total RNAs from adult male gonadic areas in stage III were incubated with 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 200 µg/ml RNase A (Sigma), and 0.2 U/µl DNaseI (Promega) at 37°C for 30 min. For negative controls, RNAs were heat-denatured at 94°C for 5 min before the RNase/DNase treatment. For positive controls, RNase A was inhibited by 1 U/µl of Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega). Reverse-transcriptions, PCRs, cloning and sequencing were performed as mentioned before with some exceptions: (i) for each

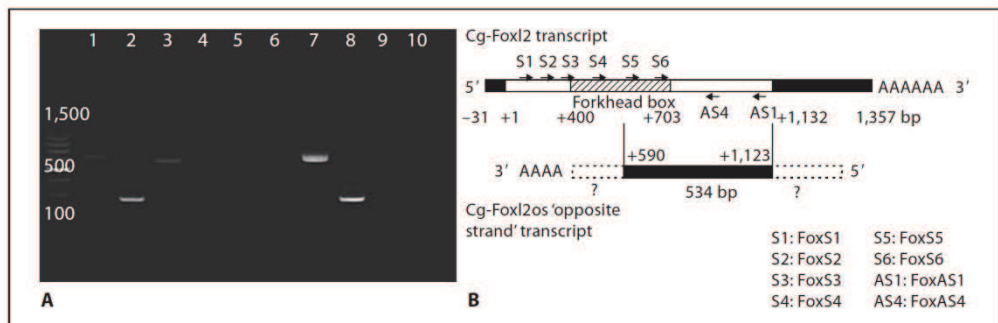


Fig. 2. A Evidence of a NAT of Cg-Foxl2 by orientation-specific RT-PCR. Reverse-transcriptions were only successful with the FoxS4 primer. All negative controls showed no band (lanes 4–6, 9 and 10). Total or poly(A) RNAs were treated with DNase but not reverse-transcribed and amplified with the same pairs of primers as the samples. In lanes 1–3, reverse-transcribed total RNAs of stage III gonadic areas were amplified with the pairs of primers FoxS5/FoxAS1, FoxS6/FoxAS4 and FoxS6/FoxAS1, respectively.

In lanes 7 and 8, poly(A) RNAs reverse-transcribed with FoxS4 were successfully amplified with FoxS6/FoxAS1 and FoxS6/FoxAS4, respectively. **B** Schematic representation of Cg-Foxl2 and its NAT called Cg-Foxl2os for 'opposite strand' (GenBank: JN896625). Cg-Foxl2os (i) is complementary to Cg-Foxl2 along 534 bp, from bp 590 to bp 1,123, (ii) is also partially overlapping the Forkhead domain consensus sequence (bp 590–703) and (iii) does not encode any protein.

sample and control, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using 250 ng of random hexamers; (ii) target sequences were PCR-amplified with primer pairs located within (FoxS6/FoxAS4) or outside (FoxS3/FoxAS5) the complementary region between Cg-Foxl2 mRNA and its NAT. Actin, for which a duplex is not expected, was used as negative control with the same conditions and with primers ActF and ActR (table 1).

ISH Analyses

Sense and antisense RNA probes were synthesized by in vitro transcriptions with a DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) with a complete Cg-Foxl2 cDNA as template. For ISH experiments, 1-cm slices of oysters were fixed in Davidson's fixative (20% formaldehyde, 30% ethanol 96%, 10% glycerol and 40% sea water) 24 h at 4°C. Five-micrometer sections were treated with 5 mg/ml proteinase K (Roche Diagnostics) at 37°C for 10 min and post-fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 7 min. After pre-hybridizations at 50°C for 1 h, hybridizations were performed with sense or antisense DIG-labeled RNA probes (300 ng/ml) in hybridization buffer (50% v/v deionized formamide, 4× SSC, 2 mM EDTA (pH 8), 1× Denhardt's, 10% dextran sulfate, 0.5 mg/ml tRNA) at 55°C for 16 h. After extensive washes with 60% formamide, 0.2× SSC at 55°C and 2× SSC at room temperature, detections were started with 2-hour incubations with an alkaline phosphate-conjugated anti-DIG antibody (Roche Diagnostics) diluted 1:2,000 in blocking solution (10% Blocking Reagent, Roche Diagnostics) at room temperature. They were followed by 2–4-hour incubations with a detection buffer (0.34 mg/ml NBT, 0.18 mg/ml BCIP, 240 µg levamisole/ml in Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl) (Roche Diagnostics) at room temperature in darkness. Finally, detections were stopped with a 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer. Dehydrated sections were mounted in Rothisto-Kit® and were examined and pictures were taken with an Eclipse 80i microscope coupled to a DXM1200-C camera (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Results

Cg-Foxl2 NAT Cloning

Existence and partial sequence of an endogenous antisense RNA transcript of Cg-Foxl2 was demonstrated by orientation-specific RT-PCR in adult gonadic areas with specific sense primers (table 1 and fig. 1). Only reverse-transcriptions of total RNA with FoxS4 primer allowed obtaining PCR products at the expected sizes of 534, 281 and 507 bp (fig. 2A, lanes 1, 2 and 3) with primers pairs FoxS5/FoxAS1, FoxS6/FoxAS4 and FoxS6/FoxAS1, respectively. No band was amplified in the negative control reactions with total RNAs treated with DNase but not reverse-transcribed (fig. 2A, lanes 4–6). For poly(A) RNA samples reverse-transcribed with FoxS4, PCR products at expected sizes of 507 and 281 bp were also obtained with FoxS6/FoxAS1 and FoxS6/FoxAS4 primer pairs, respectively (fig. 2A, lanes 7 and 8), showing that reverse-transcribed RNAs were polyadenylated. No band was amplified in the negative control reactions with poly(A) RNAs treated with DNase but not reverse-transcribed (fig. 2A, lanes 9 and 10). All PCR product sequencing gave the same sequences except for 2 or 3 random nucleotides. The longest 534-bp fragment obtained is perfectly complementary to Cg-Foxl2 sequence from bp 590 to bp 1,123 and is partially overlapping the Forkhead domain consensus sequence (between bp 590 and bp 703) (fig. 2B). The NAT of Cg-Foxl2 was named Cg-Foxl2os for 'opposite strand' (GenBank: JN896625).

No deduced amino acid sequence superior to 100 aa was obtained by in silico analysis of the 3 potential reading frames.

Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os Transcript Expression in Adult Gonads and during the Development

In Adult Gonads. Cg-Foxl2 sense and antisense transcript expressions, measured by real-time quantitative PCR, were detected in gonadic areas of both sexes (fig. 3). During the gametogenetic cycle, Cg-Foxl2 mRNA expression of most individuals (bar chart) was rather stable from stage 0 to stage III males except for stage I where it was significantly higher (mean \pm SEM: 1.09 ± 0.92) compared to stage 0, only because of 1 individual having an unusual but significantly high expression (scatter plot). In females, the mRNA expression significantly increased in stage III (mean \pm SEM: 0.45 ± 0.39) compared to stage II (mean \pm SEM: 0.05 ± 0.03) but also showed high individual variability. Cg-Foxl2os expression levels were low along a gametogenetic cycle except in stage III where they significantly increased in males (mean \pm SEM: 1.36 ± 0.32) but not in females (mean \pm SEM: 0.04 ± 0.03) compared to less mature animals of the same sex. On top of this general pattern of expression of Cg-Foxl2os, in stage III males, the dot plot highlighted 2 groups of individuals, one having an expression 6-fold higher compared to the other. At this stage, too, the ratio of the expression of sense/antisense transcripts was in favor of the NAT with a 7-fold higher expression compared to its sense transcript. This particular stage contrasts with other stages where this ratio was usually in favor of the mRNA except for stage II females.

During the Development. During the oyster development, real-time quantitative PCR experiments showed the same pattern of expression for sense and antisense transcripts (fig. 4): (i) a slight but non-significant increase of expression from 7-day post-fertilization larvae (mean \pm SEM: 0.04 ± 0.02 and 0.03 ± 0.02 , respectively) to 1.5-month-old spats (mean \pm SEM: 0.07 ± 0.01 and 0.09 ± 0.01 , respectively); (ii) a significant increase in 2-month-old spats (mean \pm SEM: 0.11 ± 0.03 for mRNA, 0.28 ± 0.13 for antisense transcript); (iii) a significant return to low levels of expression from 3 to 4-month-old spats (for instance in 3.5-month-old spats, mean \pm SEM: 0.02 ± 0.001 for mRNA and 0.01 ± 0.001 for antisense transcript). The ratio of expression sense/antisense transcript was in general superior to 1, except in 1.5- and 2-month-old spats where it was significantly inverted in the latter one.

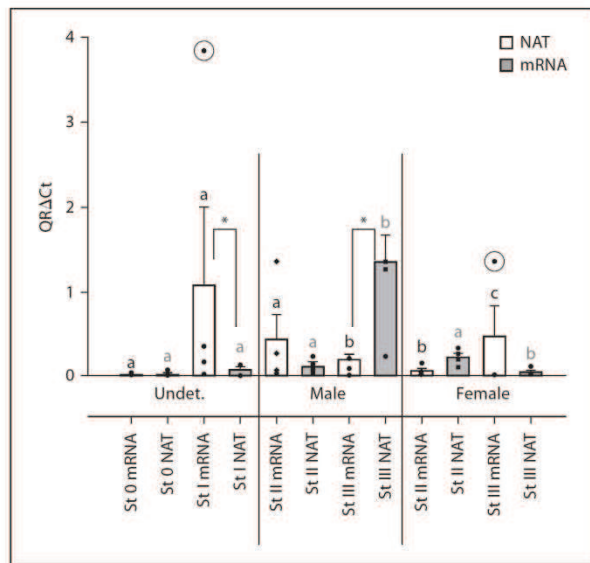


Fig. 3. Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os RNA expression relative to EF1 α measured by real-time RT-PCR in adult gonadic areas of *C. gigas* along a gametogenetic cycle. The adult reproductive stages are classified according to Heude-Berthelin et al. [2001] based on their gonadic histological structure: stage 0, undifferentiated cells; stage I, gonial mitosis; stage II, spermatogonia differentiation and growing oocytes; stage III, mature male with mainly spermatozoa and mature female with mainly vitellogenic oocytes. Number of animals per stage (n = 3–6). QR: Relative Quantity, arbitrary units. Undet.: undetermined sex. Different letters (a–c) indicate significant differences of expression between stages for each sex for Cg-Foxl2 or Cg-Foxl2os and stars significant differences between Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os transcript expression for a stage (Mann-Whitney U test, * p < 0.05). Values are mean \pm SEM of individuals. This combined scatter plot and bar chart illustrates mRNA and NAT expressions in adult gonadic areas during a gametogenetic cycle. The mRNA expression of most individuals is rather stable from stage 0–III males except for stage I where it is significantly higher only because of 1 individual (circled dot) having an unusual but significantly high expression. In females, the expression significantly increases in stage III but was also highly variable between individuals (circled dot). The NAT expression is low along a cycle, except in stage III males where it significantly increases compared to less mature males, although expression levels are very variable amongst individuals.

Presence of Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os Duplexes in the Adult Gonads

The presence of in vivo duplexes generated by sense/antisense pairing in the complementary region (bp 590–1,123) was assessed by an RNase protection-based approach (fig. 5). A PCR product of 281 bp corresponding to a duplex was obtained in RNase-treated samples am-

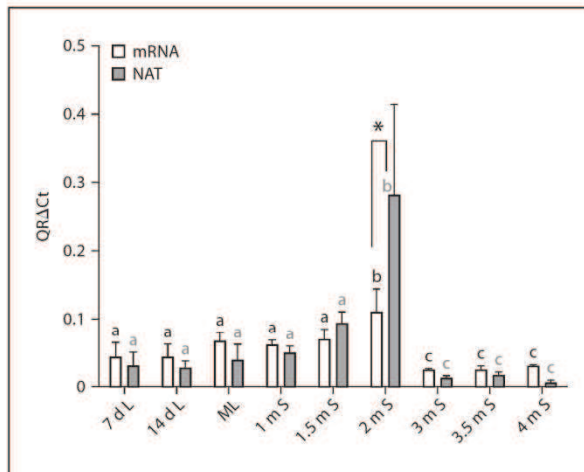


Fig. 4. Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os RNA expression relative to EF1 α measured by real-time RT-PCR in different developmental stages. The developmental stages used were: veliger larvae of 7 and 14 days post-fertilization (7 and 14 d L), post-metamorphosis larvae (ML) and 1–4-month-old spats (1, 1.5, 2, 3, 3.5 and 4 m S) reared according to the environmental conditions mentioned above. Individuals were pooled per developmental stage. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Different letters (a–c) indicate significant differences of expression between stages for Cg-Foxl2 or Cg-Foxl2os and stars significant differences between Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os transcript expression for a stage (Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$). Values are mean \pm SEM of triplicates. This histogram shows mRNA and NAT significant peak of expressions in 2-month-old spats with a ratio of expression in favor of Cg-Foxl2os.

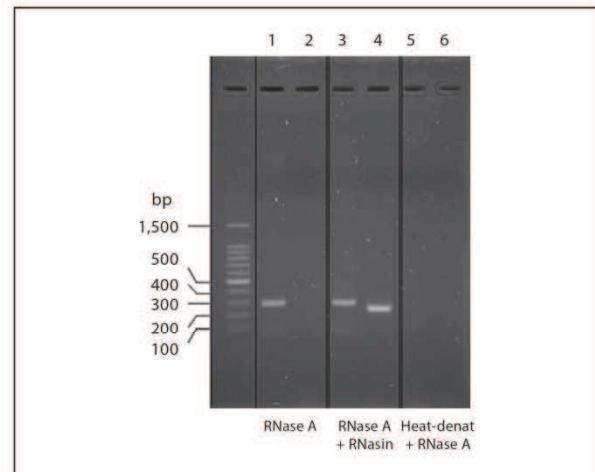


Fig. 5. Detection of RNA-RNA duplexes in the adult gonadic areas. Reverse-transcribed DNAs of a pool of stage III male gonadic areas were amplified with the pairs of primers FoxS6/FoxAS4 inside the overlapping region between Cg-Foxl2 mRNA and its NAT (lanes 1, 3 and 5) or with the pair of primers FoxS3/FoxAS5, located outside the complementary region (lanes 2, 4 and 6). Samples were all treated with RNase A, either without (lanes 1–4) or with (lanes 5 and 6; negative controls) previous heat-denaturation. Two of the samples not heat-denatured were treated with RNasin (lanes 3 and 4; positive controls). A 281-bp fragment was obtained in the complementary region, only in samples without heat-denaturation (lanes 1 and 3). A 234-bp fragment was only present outside the complementary region in RNasin-treated samples (lane 4). No band was found in heat-denatured samples (lanes 5 and 6).

plified with the pair of primers located within the complementary region (FoxS6/FoxAS4) (fig. 5, lane 1) but not with those outside the complementary region (FoxS3/FoxAS5) (fig. 5, lane 2). In positive control samples, because the single strand cutting by RNase A was inhibited by RNasin, all kind of fragments (duplexes or single strand RNAs) were PCR-amplified. They corresponded in length to the expected sizes of 281 and 234 bp using FoxS6/FoxAS4 (fig. 5, lane 3) and FoxS3/FoxAS5 (fig. 5, lane 4), respectively. No PCR product was generated by amplification reactions on heat-denatured samples whose double-strands if they existed, would have been separated before RNase treatment (fig. 5, lanes 5 and 6). The sequences of all the PCR products obtained were confirmed by cloning and sequencing. Finally, the efficiency and specificity of the RNase treatment was further confirmed by performing RT-PCR with primers specific to the actin gene, which was not expected to give rise to RNA-RNA

duplexes. A product at the predicted size was only amplified in control RNase A and RNasin-treated samples (data not shown).

Cellular Expressions of Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os in Adult Gonads

Cellular expressions of Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os transcripts were studied in gonadic areas by ISH during the adult gametogenetic cycle (fig. 6). Whatever the stage, the staining was only present in the gonadal tubules but not in the surrounding storage tissue. In stage 0 of sexual rest (fig. 6A and B) and stage I of gonial proliferations (fig. 6C and D), when sex determination is impossible, a strong cytoplasmic staining of Cg-Foxl2 mRNA was observed in early germ cells (fig. 6A and C). For both stages, no staining was observed with the sense probe which is complementary to the antisense transcript if present (fig. 6B and D). A cytoplasmic germinal stain-

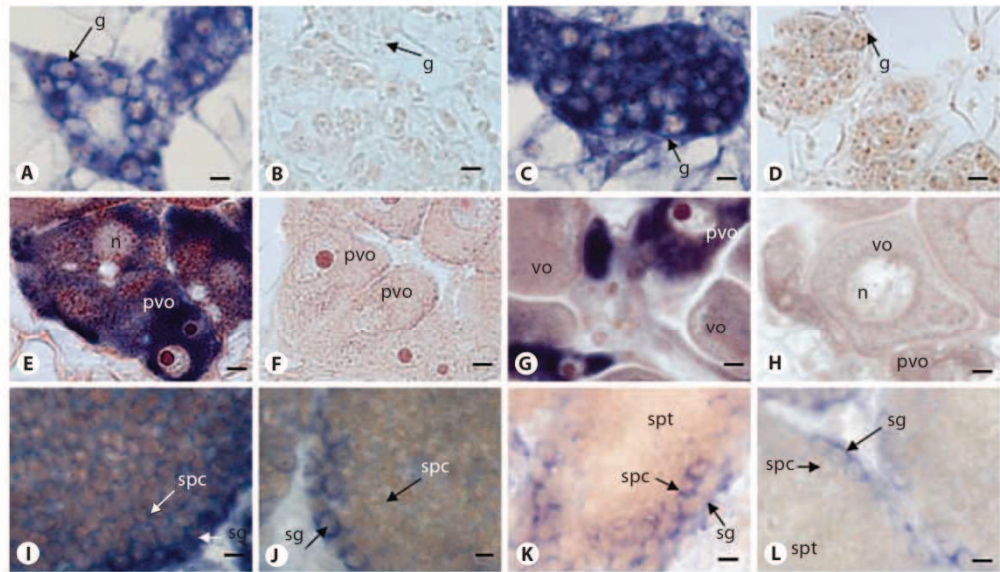
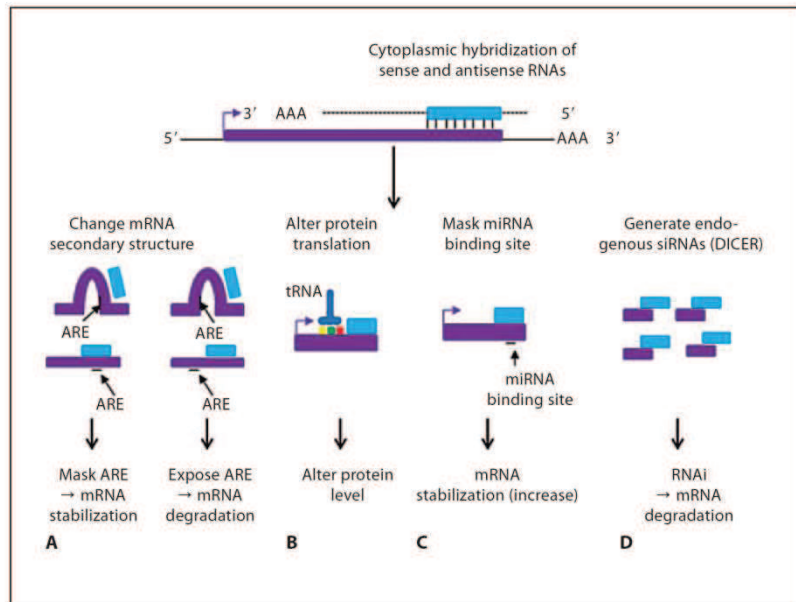


Fig. 6. Cg-Foxl2 sense and antisense transcript cellular expression patterns by ISH in the gonadic areas with antisense riboprobe (**A, C, E, G, I, K**) and sense riboprobe (**B, D, F, H, J, L**). Cg-Foxl2 mRNA is expressed from early germ cells in stages 0 and I (**A, C**) to stage III, in oogonia and oocytes in female gonads (**E, G**) and in spermatogonia and spermatocytes in males (**I, K**). Cg-Foxl2os is only

expressed in male gonads, especially in spermatogonia and with a more faint signal in spermatocytes (**J, L**). A staining in the surrounding somatic cells could also be suspected. g: gonia, n: nucleus, pvo: pre-vitellogenic oocytes, spc: spermatocytes, sg: spermatogonia, spt: spermatids, vo: vitellogenic oocytes. Bars: 5 μ m.

Fig. 7. Schematic representation of cytoplasmic RNA-RNA duplex functions (made from data related by Faghihi and Wahlestedt [2009]). In purple, mRNA; in blue, NAT. **A** Change of mRNA secondary structure can expose or mask AU-rich element sites and lead to mRNA degradation or stabilization. **B** Translation of the downstream gene (purple) can be affected between initiation and elongation steps. **C** NAT can mask miRNA binding sites. **D** Sense and antisense transcript hybridization can allow DICER to generate endogenous siRNAs.



ing was also observed with the antisense probe in maturing female gonads (stages II and III) (fig. 6E and G), although it was intense in pre-vitellogenic oocytes (fig. 6E and G) and very faint in vitellogenic oocytes (fig. 6G). No staining was observed with the sense probe (fig. 6F and H). In contrast, in male maturing gonads (stages II and III), a cytoplasmic staining was observed not only for the mRNA (fig. 4I and K) but also for the antisense transcript (fig. 6J and L), mainly in spermatogonia but also in spermatocytes, although it was more faint. Whatever the gametogenetic stage and sex, a somatic expression could also be suspected. Negative controls without probe gave no signal (data not shown).

Discussion

Characterization of Cg-Foxl2os

We report here, for the first time in oysters and in the gonads of mollusks and Lophotrochozoa, the existence of a NAT. Such antisense transcripts have only been mentioned once in this phylogenetic group, in a very recent work made on gills and digestive gland of the clam *Ruditapes philippinarum* [Milan et al., 2011]. The NAT found in the *Crassostrea* oyster gonadic area was named Cg-Foxl2os for 'opposite strand' as it is partly complementary to the Cg-Foxl2 mRNA sequence. The partial sequence of Cg-Foxl2os is about 534 bp long and is complementary to the Cg-Foxl2 sense transcript on at least this length. Antisense transcripts are classified as short RNAs or long non-protein-coding RNAs [Mercer et al., 2009]. The latter are arbitrarily considered to be longer than 200 bp but are often several hundreds (to thousands) of nucleotides long. Short RNAs are small regulatory RNAs such as microRNAs (miRNAs) or short interfering RNAs (siRNAs) [Beiter et al., 2009]. Although some NATs may contain potential open reading frames [Baguma-Nibasheka et al., 2005], most are non-coding [Katayama et al., 2005]. In *C. gigas*, by in silico open reading frame analysis, Cg-Foxl2os does not have a coding frame superior to 100 aa as found for 95% of the proteins registered in public databases [Dinger et al., 2008], suggesting therefore that it may be a non-protein-coding RNA. At last, efficient amplifications of Cg-Foxl2os from purified poly(A) RNAs suggest it is polyadenylated, as, for instance, the NAT of allatostatin found in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* [Yin et al., 2007]. As for mRNA, the presence of a poly(A) tail would increase its stability and allow its export from the nucleus to the cytoplasm [Fuke and Ohno, 2008].

The origin of antisense transcripts has been explained by 3 different mechanisms: (i) a transcription of the opposite strand of the coding region of the corresponding gene (cis-NATs) [Tufarelli et al., 2003], (ii) a transcription of a pseudogene (trans-NATs) (for review [Muro and Andrade-Navarro, 2010]), or (iii) a transcription by an RNA-dependent RNA polymerase of the sense mRNA in the cytoplasm (cis-NATs) [Bartsch et al., 2004]. Nevertheless, evidence of this enzyme has been mentioned in *Arabidopsis thaliana* but is still lacking in mammalian cells [Willmann et al., 2011]. In oyster, the mechanism of synthesis of Cg-Foxl2os is still unknown. Its transcription from a pseudogene seems unlikely as it would present several mutations in its sequence and thus only very partial complementarities (around 20 bp) with the sense mRNA [Guo et al., 2009]. In contrast, a complementarity over 500 bp with Cg-Foxl2 sequence would be in favor of hypotheses of a transcription of either the opposite strand of genomic DNA or a sense mRNA. The genomic sequence of Cg-Foxl2 lacks in introns [Naimi et al., 2009a], precluding to discriminate both hypotheses.

Adult Expression of Cg-Foxl2os and Cg-Foxl2

In adult oyster, the gonadic Cg-Foxl2 mRNA levels of expression measured by qPCR during the gametogenetic cycle were low in early stages (0 and I) when sex was still undetermined, except for 1 individual. Although this animal showed, by histology, a gametogenesis similar to the others (results not shown), it does not prevent its possible genetic difference as already observed for other genes in oyster. Later during the gametogenetic cycle, Cg-Foxl2 mRNA expression increased only in stage III females, when late vitellogenesis takes place. This expression profile is similar to previous results obtained in the female gonads of *C. gigas* for Cg-Foxl2 mRNA expression and confirms its potential role in the vitellogenesis [Naimi et al., 2009a], also in agreement with the role of *FOXL2* in the folliculogenesis hypothesized in adults of many vertebrate species [Duffin et al., 2009]. In contrast, in mature males, our results disagree with high Cg-Foxl2 expression levels previously found in stage III male oysters [Naimi et al., 2009a]. These latter results can reflect and thus be mainly explained by a measure of a cumulated expression of both Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os transcripts, as this antisense transcript is polyadenylated and reverse-transcriptions were performed with oligo (dT). Taking this information into account, the low Cg-Foxl2 mRNA expression levels found in oyster mature male gonads compared to mature females would agree with Foxl2 levels, 2–100 times higher in adult ovaries than in adult testes,

found in other species including hermaphrodites [Govoroun et al., 2004].

Comparative expression profiles of both transcripts highlighted mRNA/NAT ratios equal or superior to 1, except in stage II females and in particular in stage III males where the NAT expression was 7 times higher compared to its sense transcript. Such different gonadic profiles between sense and antisense transcripts contrast with the very similar expression profiles mentioned in mouse from 12 dpc to adults by the only other work about a NAT of Foxl2 [Cocquet et al., 2005]. In stage II females, low NAT levels, although higher compared to the mRNA expression, do not allow to rule on a possible regulatory role of Cg-Foxl2os on Cg-Foxl2 mRNA as some studies suggest existence of a threshold to allow an efficient effect of NATs [Rossignol et al., 2002]. In stage III males the antisense transcript may inhibit the expression of Cg-Foxl2, a factor involved in the ovarian differentiation, and even potentially in the vitellogenesis in the oyster [Naimi et al., 2009a] and induce therefore a male gonadic differentiation and/or its maintain. The individual variability in male and female stages III may be explained by the successive hermaphroditism of *C. gigas*. Indeed, at this stage, male individuals strongly expressing Cg-Foxl2os may stay as males the next gametogenetic cycle while counterparts with low expression may turn into females. Inversely, females strongly expressing Cg-Foxl2 may stay as females the next gametogenetic cycle while counterparts with low expression may turn into males. Such role in sex determination has already been suggested, in the protogynous fish *Epinephelus merra* [Alam et al., 2008] where Foxl2 expression levels shift during female/male sex transition and in knock-out mice [Ottolenghi et al., 2007] who undergo partial female-to-male sex reversal when *Foxl2* lacks.

Our qPCR results were confirmed by ISH experiments where sense transcripts were expressed at all stages of the adult gametogenetic cycle. They were localized in the cytoplasm of the cells, from early germ cells in precocious stages to oogonia and oocytes in female gonads and to spermatogonia and spermatocytes in males. Such germ cell expression is in agreement with a previous work done in the oyster about *Cg-Foxl2* in stage II males and females [Naimi et al., 2009a]. However, the strong germinal staining observed in early stages seems in disagreement with the low expression levels found by qPCR in the gonadic area. It may be due to the fact that in early stages the organ is mainly made of storage tissue, embedding very few tubules filled with few germ cells [Franco et al., 2008], diluting therefore the signal by qPCR. In stage II females, the same apparent disagreement of expression by qPCR and

ISH may be explained in the same way even if tubules are bigger and filled with bigger cells. Nevertheless, a somatic expression cannot be excluded as such cells have been shown to be closely related to germ cells in male oysters [Franco et al., 2011] and are therefore difficult to distinguish from the germ cells by ISH. Moreover, isolated vitellogenic oocytes of oysters showed a low expression of Cg-Foxl2 mRNA compared to gonadal areas [Lelong C., pers. commun.], leading to deduce a somatic expression on top of the one in germ cells. A Cg-Foxl2 expression in both female germ and somatic cells has already been observed in oyster [Naimi et al., 2009a], mice and chicken developing and mature ovaries [Loffler et al., 2003] but contrasts with the restricted expression mentioned in follicle cells for most species [Crisponi et al., 2001; Nakamoto et al., 2006]. A male Cg-Foxl2 expression may, as mentioned earlier, make sense in a species meeting sex changes.

By ISH, Cg-Foxl2os was only observed in spermatogonia and more faintly in spermatocytes in stage II and III males, where it was co-localized with its sense transcript in the cytoplasm of the cells. In stage II females, the absence of staining contrasting with the expression levels detected by qPCR can be explained by the genetic variability frequently observed in oyster. Again, a somatic staining was not excluded. Few studies about NATs have concerned their cell and tissue localization, especially for genes related to reproduction. Nevertheless, a co-localization of both transcripts is not scarce, as shown for instance in humans for 45% of 1,500 pairs of transcripts studied [Chen et al., 2005] or in mice for 7 transcription factors of 8 involved in the eye function [Alfano et al., 2005]. For *Foxl2* homologs, a co-localization has already been mentioned in germ cells of gonadal areas of stage II male oysters [Naimi et al., 2009a] and in somatic cells in adult ovaries in mice, in the perinuclear zone of the cytoplasm [Cocquet et al., 2005]. A cytoplasmic expression of Cg-Foxl2os reinforces the hypothesis of its polyadenylation. Indeed, in mammals, NATs are localized in the nucleus when non-polyadenylated [Kiyosawa et al., 2005] and often in the cytoplasm of the cells when polyadenylated [Faghihi and Wahlestedt, 2009]. This is where they may potentially interact with overlapping sense RNAs. Taken together, these data also reinforce the hypothesis of a regulatory role of Cg-Foxl2os which may downregulate Cg-Foxl2 in stage III males.

Expression of Cg-Foxl2os and Cg-Foxl2 during the Development

During the development of *C. gigas*, our results showed similar Cg-Foxl2 mRNA and NAT patterns of expression

with a peak in 2-month-old spats, at a stage where the ratio of expression of mRNA/NAT also switches in favor of the antisense transcript. All these results are in agreement with previous studies, which highlight in the same species a particular window of expression of *Cg-Foxl2* and *Cg-DML*, a potential factor of the male gonadic differentiation in spats around 1.5 months of age, when the first gonadic establishment is suspected to occur [Naimi et al., 2009a, b]. Indeed, at around 2 months of age, primordial germ cells start to differentiate into 2 groups of germinal stem cells which would later proliferate intensively to form the gonadic tubules when juveniles reach sexual maturity [Fabioux et al., 2004]. At the age of 3 months, gonadal collecting ducts are visible and gametogenesis is already started [Naimi et al., 2009a]. As in adults, in young spats, the antisense transcript may inhibit the expression of *Cg-Foxl2*, inducing therefore a male gonadic differentiation. A negative regulation of expression of a candidate ovary-determining gene is not inconsistent in a pool of spats which develop into a majority of males as the oyster is a protandric hermaphrodite.

Potential Mechanisms of Action of Cg-Foxl2os

There are several mechanisms by which NATs can influence the expression of their complementary transcripts. These mechanisms have been categorized into 4 main groups: those related to transcription, RNA-DNA interactions, RNA-RNA interactions in the nucleus, and RNA-RNA interactions in the cytoplasm [Faghihi and Wahlestedt, 2009]. In the last 3 cases, 3 different formations could occur: (i) a head-to-head 5'-overlapping configuration, (ii) a fully overlapping configuration, or (iii) a tail-to-tail 3'-overlapping configuration which can influence the regulatory mechanism [Faghihi and Wahlestedt, 2009]. To summarize our results presented here: (i) *Cg-Foxl2os* is polyadenylated; (ii) it co-localizes in the cytoplasm of the cells with its sense transcript; (iii) it presents by qPCR an inverted expression compared to the mRNA in some acute stages during the adult gametogenetic cycle and the development, and (iv) it overlaps *Cg-Foxl2* from the mid sequence to its 3'-end. Moreover, it forms RNA duplexes with its sense transcript, what occurs frequently when transcripts are long and completely overlapping [Werner and Sayer, 2009]. Therefore, taken together, all these results suggest a mechanism of action of *Cg-Foxl2os* through the formation of cytoplasmic RNA-RNA duplexes either in fully overlapping or in tail-to-tail 3'-overlapping configuration. Some hypotheses of mechanisms occurring in mammals in case of cytoplasmic RNA-RNA duplexes are summarized in figure 7. This

could increase mRNA stability in changing its secondary structure as observed for instance for *Wt1* in mouse kidney where it has essential roles in nephrogenesis, notably in cancer regulation [Dallosso et al., 2007]. It may also decrease mRNA stability by exposing AU-rich elements located in 3'-end and used to target the RNA for degradation (fig. 7A). This was for instance described for HIF α mRNA, a cell cycle regulator, in renal human carcinoma. In this case, when aHIF NAT level is high enough, it affects the HIF1 α /aHIF transcript ratio, even if the latter is kept in favor of mRNA [Rossignol et al., 2002]. RNA-RNA duplexes could also block mRNA translation between initiation and elongation steps by direct binding to a ribosomal binding site of the sense RNA [Ebrilidze et al., 2008] altering therefore only the protein levels [Werner and Sayer, 2009] (fig. 7B). Cytoplasmic duplexes could also mask miRNA binding sites in particular in 3'-UTR sites which contain target sites for miRNA (fig. 7C) as described for BACE1, an enzyme inducing Alzheimer's disease pathophysiology and whose antisense transcript inhibits mRNA degradation and increases BACE1 mRNA levels [Faghihi et al., 2008]. Ultimately, a recent hypothesis proposes that cytoplasmic sense-antisense transcripts could form small interfering RNAs from dsRNA and induce a degradation of the mRNA (fig. 7D), as mentioned in early mouse oocytes and in embryonic stem cells or in somatic cells in *Drosophila* [Ghildiyal et al., 2008; Ogawa et al., 2008]. Our actual knowledge does not allow to specify which mechanisms are involved in the regulation of *Cg-Foxl2* mRNA expression by *Cg-Foxl2os*, but some hypotheses could be proposed. Indeed, the low expression levels of *Cg-Foxl2* when *Cg-Foxl2os* is highly expressed suggest a downregulation of the mRNA expression by its NAT and therefore a regulatory mechanism involving mRNA degradation as observed in case of exposure of AU-rich element sites or endogenous siRNA formation. In *C. gigas*, although DICER enzymes have not been identified in the oyster public EST Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), argonaute enzymes have been found and some evidence is in favor of the existence of epigenetic mechanisms occurring in this animal [Gavery and Roberts, 2010]. However, a translational regulation cannot be excluded as *Cg-Foxl2* expression is not 0 whatever the stage of the gametogenetic cycle and as RNA-RNA duplexes are able to block elongation.

In conclusion, in oyster, *Cg-Foxl2os* could be involved in its sense transcript for downregulation of expression during late gonadic differentiation and in 2-month-old spats to induce/maintain a male sex. However, its physiological function still remains to be elucidated, for in-

stance by studying its protein expression and above all by RNAi. This work also allowed reinforcing the idea about the importance of the stage of 1.5–2-month-old spats in the first gonadic differentiation and of stage III in the adult cycles. Defining these 2 specific time-windows is one of the first essential steps in the comprehension of sexual differentiation in *C. gigas*.

References

- Adell T, Müller WE: Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene* 334:35–46 (2004).
- Alam MA, Kobayashi Y, Horiguchi R, Hirai T, Nakamura M: 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 (2008).
- Alfano G, Vitiello C, Caccioppoli C, Caramico T, Carola A, et al: Natural antisense transcripts associated with genes involved in eye development. *Hum Mol Genet* 14:913–923 (2005).
- Baguma-Nibasheka M, Li AW, Osman MS, Geldenhuys L, Casson AG, et al: Coexpression and regulation of the FGF-2 and FGF antisense genes in leukemic cells. *Leukemia Res* 29:423–433 (2005).
- Bartsch H, Voigtsberger S, Baumann G, Morano I, Luther HP: Detection of a novel sense-antisense RNA-hybrid structure by RACE experiments on endogenous troponin I antisense RNA. *RNA* 10:1215–1224 (2004).
- Beiter T, Reich E, Williams RW, Simon P: Antisense transcription: a critical look in both directions. *Cell Mol Life Sci* 66: 94–112 (2009).
- Caburet S, Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Benayoun BA, Veitia RA: The transcription factor FOXL2 at the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 356:55–64 (2011).
- Chen J, Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Rowley JD: Genome-wide analysis of coordinate expression and evolution of human cis-encoded sense-antisense transcripts. *Trends Genet* 21:326–329 (2005).
- Cocquet J, Pannetier M, Fellous M, Veitia RA: Sense and antisense Foxl2 transcripts in mouse. *Genomics* 85:531–541 (2005).
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, et al: The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159–166 (2001).
- Dallosso AR, Hancock AL, Malik S, Salpekar A, King-Underwood L, et al: Alternately spliced *WT1* antisense transcripts interact with *WT1* sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer. *RNA* 13:2287–2299 (2007).
- De Loof A, Huybrechts J, Geens M, Vandersmissen T, Boerjan B, Schoofs L: Sexual differentiation in adult insects: male-specific cuticular yellowing in *Schistocerca gregaria* as a model for reevaluating some current (neuro) endocrine concepts. *J Insect Physiol* 56:919–925 (2010).
- Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, Pang KC, Bruce SJ, et al: Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Genome Res* 18:1433–1445 (2008).
- Duffin K, Bayne RA, Childs AJ, Collins C, Anderson RA: The forkhead transcription factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. *Mol Hum Reprod* 15:771–777 (2009).
- Ebraldizze AK, Guibal FC, Steidl U, Zhang P, Lee Sanghoon, et al: *PU.1* expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. *Genes Dev* 22:2085–2092 (2008).
- Fabioux C, Huvet A, Lelong C, Robert R, Pouvreau S, et al: Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:592–598 (2004).
- Faghihi MA, Wahlestedt C: Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:637–643 (2009).
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, et al: Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 14:723–730 (2008).
- Franco A, Heude Berthelin C, Goux D, Sourdain P, Mathieu M: Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40:251–260 (2008).
- Franco A, Jouaux A, Mathieu M, Sourdain P, Lelong C, et al: Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Res* 340:201–210 (2010).
- Franco A, Kellner K, Goux D, Mathieu M, Heude Berthelin C: Intra-gonadal somatic cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron* 42:718–725 (2011).
- Fuke H, Ohno M: Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. *Nucleic Acids Res* 36:1037–1049 (2008).
- Gavery MR, Roberts SB: DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics* 11:483 (2010).
- Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, et al: Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320:1077–1081 (2008).
- Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard J, et al: Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn* 231:859–870 (2004).
- Guo X, Zhang Z, Gerstein MB, Zheng D: Small RNAs originated from pseudogenes: cis- or trans-acting? *PLoS Comput Biol* 5:7 (2009).
- Hansen IA, Sieglaff DH, Munro JB, Shiao SH, Cruz J, et al: Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochem Mol Biol* 37:985–997 (2007).
- Heude-Berthelin C, Laisney J, Espinosa J, Martin O, Hernandez G, et al: Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebr Repr Dev* 40:79–86 (2001).
- Hu W, Li S, Tang B, Wang Y, Lin H, et al: Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal development in transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 271:498–506 (2007).
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, et al: Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309:1564–1566 (2005).
- Kiyosawa H, Mise N, Iwase S, Hayashizaki Y, Abe K: Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense-antisense transcripts tend to be poly(A) negative and nuclear localized. *Genome Res* 15:463–474 (2005).

Acknowledgments

This research is supported by Conseil Régional de Basse-Normandie (CRBN) and by IFOP/EFF funds. The authors are grateful to Béatrice Adeline for technical assistance, to Blandine Diss and the SATMAR staff for oyster providing and to Amine Naimi for his help in sample preparation. C.S. is supported by a Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) grant.

- Kobayashi Y, Horiguchi R, Nozu R, Nakamura M: Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (*Foxl2*) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Biol Sex Differ* 1:3 (2010).
- Lelong C, Badariotti F, Le Quéré H, Rodet F, Dubos MP, Favrel P: 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 (2007).
- Loffler KA, Zarkower D, Koopman P: Etiology of ovarian failure in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144:3237–3243 (2003).
- Magie CR, Pang K, Martindale MQ: Genomic inventory and expression of *Sox* and *Fox* genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol* 215:618–630 (2005).
- Mazet F, Yu J-K, Liberles DA, Holland LZ, Shimeld SM: Phylogenetic relationships of the *Fox* (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene* 316:79–89 (2003).
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS: Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10:155–159 (2009).
- Milan M, Coppe A, Reinhardt R, Cancela LM, Leite RB, et al: Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics* 12:234 (2011).
- Muro EM, Andrade-Navarro MA: Pseudogenes as an alternative source of natural antisense transcripts. *BMC Evol Biol* 10:338 (2010).
- Naimi A, Martinez AS, Specq ML, 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*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 154:134–142 (2009a).
- Naimi A, Martinez AS, Specq ML, Mrac A, Diss B, et al: Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152:189–196 (2009b).
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, Shibata N: Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 344:353–361 (2006).
- Numata K, Okada Y, Saito R, Kiyosawa H, Kanai A, Tomita M: Comparative analysis of cis-encoded antisense RNAs in eukaryotes. *Gene* 392:134–141 (2007).
- Ogawa Y, Sun BK, Lee JT: Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320:1336–1341 (2008).
- Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, et al: Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Gen* 16:2795–2804 (2007).
- Rösok O, Sioud M: Systematic identification of sense-antisense transcripts in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:104–108 (2004).
- Rossignol F, Vaché C, Clottes E: Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 299:135–140 (2002).
- Soldà G, Boi S, Duga S, Fornasari D, Benfante R, et al: In vivo RNA-RNA duplexes from human alpha3 and alpha5 nicotinic receptor subunit mRNAs. *Gene* 345:155–164 (2005).
- Splinter E, de Wit E, Nora EP, Klous P, van de Werken HJ, et al: The inactive X chromosome adopts a unique three-dimensional conformation that is dependent on Xist RNA. *Genes Dev* 25:1371–1383 (2011).
- Su W-Y, Xiong H, Fang JY: Natural antisense transcripts regulate gene expression in an epigenetic manner. *Biochem Biophys Res Commun* 396:177–181 (2010).
- Tu Q, Brown CT, Davidson EH, Oliveri P: Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. *Dev Biol* 300:49–62 (2006).
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, et al: Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 34:157–165 (2003).
- Veitia RA: *FOXL2* versus *SOX9*: a lifelong 'battle of the sexes'. *Bioessays* 32:375–380 (2010).
- Werner A, Sayer JA: Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18:343–349 (2009).
- Willmann MR, Endres MW, Cook RT, Gregory BD: The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 9:e0146 (2011).
- Yin GL, Chen Q, Yang WJ: Naturally occurring antisense RNA of allatostatin gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 146:20–25 (2007).
- Yu JK, Mazet F, Chen YT, Huang SW, Jung KC, Shimeld SM: The *Fox* genes of *Branchiostoma floridae*. *Dev Gene Evol* 218:629–638 (2008).

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

III. Annexe : Expression de la protéine de Cg-Foxl2 chez l'adulte

Afin de préciser le rôle potentiel de Cg-Foxl2 chez l'huître adulte, l'étude de son expression protéique a également été initiée en *Western Blotting*, immunoprécipitation, spectrométrie de masse en tandem MS/MS et immunohistochimie.

Choix de l'anticorps

Un anticorps homologue a été synthétisé par Eurogentec® chez deux lapins suite à des injections de 2 peptides de la séquence protéique déduite de Cg-Foxl2 : MSENKNENVSNSVSD+C et QGDTLNHMHYSYWTDR. Ces deux peptides sont situés dans les parties C- et N-terminales qui ne sont pas conservées. Le choix de ces deux peptides a été basé sur plusieurs critères : profils physico-chimiques, structures secondaires, BLAST avec des séquences protéiques connues chez divers phyla et chez l'huître. Un anticorps hétérologue commercial (RayBiotech®) a également été testé. Il a été produit chez la souris à partir d'une protéine recombinante contenant le domaine *Forkhead* et une vingtaine d'acides aminés situés de part et d'autre de ce domaine.

Expression protéique dans l'aire gonadique

Un *Western Blotting* a été réalisé avec 75 µg protéines extraites de chaque tissu : aire gonadique en stade 0 et en stades III mâle et femelle, palpes labiaux, branchies, glande digestive, muscle adducteur, manteau. L'anticorps homologue anti-Cg-Foxl2 reconnaît, dans tous les tissus, une bande à 52 KDa plus ou moins intense, de 10kDa supérieure à la taille attendue (Figure 1). Quel que soit le tissu, cette bande disparaît en pré-incubant l'anticorps avec les peptides immunogènes. Cette taille suggérerait que (i) Cg-Foxl2 possède des modifications post-traductionnelles affectant son poids moléculaire ; (ii) la bande ne correspond pas à Cg-Foxl2. Cependant, la localisation cellulaire de Cg-Foxl2 appréhendée en immunohistochimie, ne révèle aucun marquage dans les aires gonadiques d'huîtres femelles en stade III (Figure 2), et ce malgré l'utilisation d'une gamme variée de dilution de l'anticorps. Afin de vérifier si la protéine reconnue en *Western Blotting* était Cg-Foxl2, une immunoprécipitation a été réalisée sur des aires gonadiques à l'aide du même anticorps

homologue puis le produit obtenu a été séquencé en spectrométrie de masse en tandem MS/MS. Aucun peptide identifié ainsi ne correspond à Cg-Foxl2 ou à une protéine correspondant à une EST des banques de données de l'huître (résultats non illustrés). Enfin, le même *Western Blotting* a été réalisé sans succès avec l'anticorps hétérologue commercial (RayBiotech®)(résultats non illustrés).

Ces résultats soulignent la difficulté chez l'huître ou chez tout autre modèle non-vertébré d'étudier des expressions protéiques de facteurs peu conservés. L'utilisation d'un anticorps homologue dirigé contre des peptides n'étant pas assez spécifique selon les facteurs, une solution serait peut-être de produire un anticorps dirigé contre une protéine recombinante.

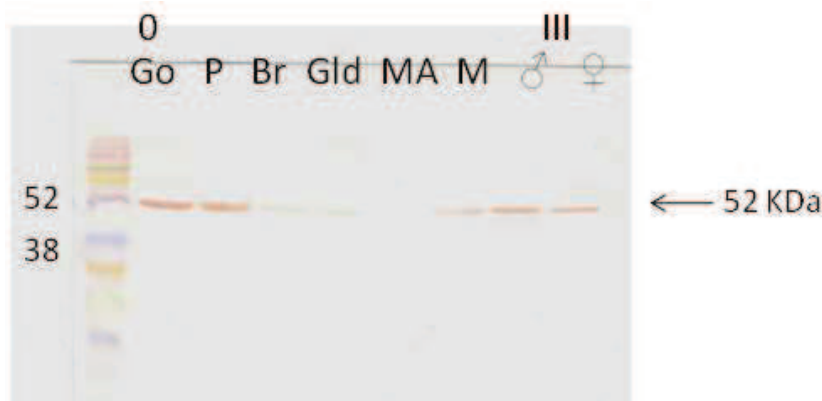


Figure 41 : Expression de Cg-Foxl2 en *Western Blotting*.

Anticorps primaire homologue anti-Cg-Foxl2 d'huître (dilution 1/500). Anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de lapin couplé à la peroxydase (dilution 1/1000). Quantité de protéines : 75µg par puits. Go : aire gonadique stade 0 ; P : palpes labiaux ; Br : branchies ; Gld : glande digestive ; MA : muscle adducteur ; M : muscle ; III♂ : aire gonadique stade III mâle ; III♀ : aire gonadique stade III femelle.

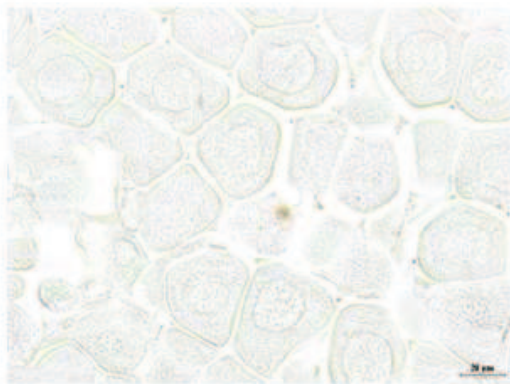


Figure 42 : Expression en immunohistochimie de Cg-Foxl2 dans l'aire gonadique d'huîtres femelles en stade III

Chapitre 4:

Une influence de l'environnement sur le déterminisme sexuel de l'huître ?

Effet de la température lors de la première mise
en place gonadique chez le naissain

I. Introduction

1. Objectifs de l'étude

Un déterminisme sexuel influencé par l'environnement était suspecté chez l'huître adulte depuis plusieurs années d'après les observations sur le terrain, mais aucune étude ne s'était réellement focalisée sur l'impact de ce facteur sur la physiologie de l'adulte ou du naissain. La question que nous posons donc dans ce chapitre est la suivante : le déterminisme sexuel de l'huître est-il génétique et environnemental ?

Pour commencer à répondre à cette question, l'influence de la température sur le déterminisme sexuel lors de la première mise en place de la gonade a été étudié chez du naissain placé en conditions contrôlées. Cela consistait à (i) étudier les expressions des acteurs de la cascade du déterminisme sexuel, Cg-SoxE, Cg- β -caténine, Cg-DML, Cg-Foxl2 et Cg-Foxl2os et à déterminer si elles sont influencées par la température ; (ii) évaluer les sexe-ratios associés ; (iii) préciser en parallèle les événements de la première différenciation gonadique et de la première gamétogenèse chez l'huître et mettre en évidence l'influence de la température sur leurs cinétiques.

2. Résultats

Nos résultats ont mis en évidence une influence de la température sur le sexe-ratio du naissain, avec à 18 et 22°C une orientation en faveur des femelles et à 25 et 28°C une orientation en faveur des mâles. Ceci suggère l'existence chez l'huître, d'un "profil de sensibilité à la température" de type FM, comme chez les poissons. Cependant, un profil de type MFM ne peut être exclu, sachant que des températures de 8°C induisent un ratio en faveur des mâles chez l'adulte. Une explication physiologique possible pourrait être que les températures de 8°C et supérieures à 25°C seraient défavorables pour l'huître et induiraient plus de mâles car ils ont un métabolisme moins demandeur en énergie que les femelles.

La différenciation gonadique et la gamétogenèse ont également été influencées par la température chez le naissain. Ainsi, leurs cinétiques sont accélérées avec l'augmentation de la température, même si elles ne sont pas toujours corrélées. Ainsi par exemple, chez le naissain âgé de 49 jpf qui a été élevé à 18°C, seuls quelques canaux collecteurs avec quelques cellules germinales indifférenciées sont visibles alors que ceux élevés à 25°C sont sexables et présentent des canaux collecteurs et des tubules gonadiques remplis des cellules

germinales différenciées. L'accélération de ces cinétiques est également illustrée par les pics d'expression d'Oyvlg, marqueur des cellules germinales, qui sont de plus en plus précoces à mesure que la température augmente. Une température de 28°C semble toutefois retarder la gamétogenèse de l'huître sans toutefois la bloquer. Cette absence d'arrêt de la gamétogenèse à une température élevée, qui est généralement délétère pour la plupart des espèces, peut s'expliquer par la grande capacité d'adaptation de *C. gigas* à des écarts de température importants.

Enfin, les expressions des facteurs impliqués dans la différenciation gonadique chez le naissain ont été mesurées à diverses températures. Tout d'abord, quelle que soit la température, les expressions de Cg-Foxl2 et de son ARN anti-sens naturel Cg-Foxl2os sont plus précoces que celles des autres facteurs Cg-DMI, Cg-SoxE et la Cg- β -caténine, suggérant une intervention des premiers en amont dans la cascade de la différenciation gonadique. Ensuite, les pics d'expressions de tous ces facteurs sont observés entre 40 et 44 jpf à 18°C, suggérant ainsi que le déterminisme sexuel a lieu dans cette fenêtre de temps chez le naissain à cette température. Cette période du développement est en accord avec ce qui avait été précédemment mentionné même si elle est plus courte, probablement en raison des conditions optimales de nourriture définies grâce au modèle DEB. Enfin, la cascade du déterminisme sexuel chez le naissain présente, comme chez l'adulte, une balance d'expression entre les acteurs mâles et femelles qui est modulée par la température. Ainsi, aux températures de 18°C et 22°C qui favorisent les femelles, l'expression de Cg-Foxl2 est supérieure à celle de Cg-Foxl2os et celle de la Cg- β -caténine est plus élevée que celles des facteurs mâles Cg-DMI et Cg-SoxE. Ces résultats suggèrent un rôle de Cg-Foxl2 et Cg- β -caténine dans la différenciation ovarienne comme décrit chez l'adulte. A 28°C, lorsque le sexe ratio est en faveur des mâles, l'expression de Cg-Foxl2os est supérieure à celle de Cg-Foxl2 et celles de Cg-DMI et Cg-SoxE sont supérieures à celle de la Cg- β -caténine. Comme suggéré chez l'adulte, l'expression de Cg-Foxl2 pourrait alors être régulée par Cg-Foxl2os pour induire une différenciation mâle avec également une implication de Cg-DMI et Cg-SoxE. La température intermédiaire de 25°C pourrait être proche de la température de transition du sexe-ratio. En effet, à cette température, le sexe-ratio est seulement légèrement en faveur des mâles et les expressions de Cg-SoxE, Cg-DMI, et de la Cg- β -caténine, d'une part, et de Cg-Foxl2 et de Cg-Foxl2os, d'autre part, sont assez peu différentes.

Les résultats de ce chapitre permettent donc d'affiner la cascade moléculaire et la fenêtre temporelle du déterminisme sexuel au cours du développement chez *C. gigas*. Ils confirment aussi l'hypothèse de l'existence, chez l'huître, d'un déterminisme sexuel combiné associant un déterminisme génétique et une influence environnementale, comme chez de nombreux poissons et amphibiens.

II. Publication

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication qui est insérée ci-après : Santerre, Sourdain, Marc, Minguant, Robert et Martinez (2012). *The oyster sex determination is influenced by temperature - First clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis*. Soumise à *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*.

Ils ont également fait l'objet d'une présentation orale au congrès Physiomar en septembre 2012 à Saint-Jacques de Compostelle (Espagne) : Santerre, Sourdain, Marc, Minguant, Robert et Martinez (2012). *Effects of temperature on sex determination in spat of the oyster Crassostrea gigas*.

The oyster sex determination is influenced by temperature - First clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis.

Christelle SANTERRE^{a,b}, Pascal SOURDAINE^{a,b}, Nicolas MARC^c, Christian MINGUANT^c, René ROBERT^c, Anne-Sophie MARTINEZ^{a,b}.

^a: Université de Caen Basse-Normandie, FRE 3484 BioMEA, F-14032 Caen, France

^b: CNRS INEE, FRE 3484 BioMEA, F-14032 Caen, France

^c: Laboratoire de Physiologie des Invertébrés IFREMER Brest, Station expérimentale d'Argenton, F-29840 Argenton Landunvez, France.

Corresponding author:

A.-S. Martinez

FRE 3484 BioMEA, IBFA, Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France.

e-mail: anne-sophie.martinez@unicaen.fr

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

Fax: 33 (0)2 31 56 53 46

Abstract

In order to precise the sex-determining system of *Crassostrea gigas*, still poorly known, especially regarding the potential influence of temperature, mRNA expressions of actors of the molecular cascade (Cg-DMI, Cg-SoxE, Cg- β -catenin, Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os) and of Oyvlg, a germ cell marker, were investigated by real-time PCR in spat reared at different temperatures (18, 22, 25 and 28°C). In parallel, gonadic differentiation, gametogenesis and sex-ratios were assessed by histology at each temperature. Whatever the temperature, Cg-DMI, Cg-SoxE, Cg- β -catenin and Oyvlg expressions peaked at the same developmental stage, always after Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os, in spat around 40-44 dpf at 18°C. Temperatures increased kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis. At 25°C, a switch (i) in sex-ratio towards males and (ii) in the balance of expression between male and female genes, in favor of the male ones was induced; a slightly disturbed gametogenesis was also observed. These results allow to precise, during the development of *C. gigas*, the sex-determining time-window and molecular cascade, with notably the involvement of Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os in the very first steps. They also suggest an influence of temperature on oyster's sex determination, which, associated to a genetic control would induce a mixed sex determination system (GSD + TSD).

1. Introduction

At the present time, the question of diversity of sex determination mechanisms is still puzzling for many researchers. Indeed, among vertebrates, mammals and birds have a genetic sex determination (GSD), some reptilians and fish have an environmental sex determination (ESD) and others including many fish and amphibians, have a mixture of GSD and ESD (Valenzuela et al., 2003; Wedekind and Stelkens, 2010). The main factors involved in ESD mechanisms are food availability, population density and temperature (we talk then of TSD, 'Temperature-dependant Sex Determination') (Pradeep et al., 2012). TSD is widely spread among animal taxa, from invertebrates as rotifers, nematods, crustaceans, mollusks and insects to vertebrate species as reptilians and fish (Korpelainen, 1990). In species with TSD, temperature affects sex determination (during the development in gonochoric species and at each sex reversion in hermaphrodites) only during a critical time-window called thermo-sensitive period (TSP) (Manolakou et al., 2006). Such species could be indicators of the global warming; indeed, by significantly affecting ecosystems, this latter could drive biased offspring sex-ratio and potentially lead, in the long term, to a local extinction (Janzen, 1994).

In the pacific oyster *Crassostrea gigas*, an irregular successive protandric hermaphrodite, sex determination, still poorly known, would be controlled by a major gene and influenced by environment (Hedrick and Hedgecock, 2010; Guo et al., 2012). Downstream secondary actors of the molecular cascade of sex determination / gonadic differentiation have been characterized in adults and during the development (male orthologs Cg-DMI and Cg-SoxE - female orthologs Cg-Foxl2 and Cg- β -catenin – a natural antisense transcript Cg-Foxl2os) (Naimi et al., 2009a; b; Santerre et al., 2012b, 2012). This cascade shows a balance of gene expressions between male and female orthologs according to the future sex of animals. The gene expression profiles suggest a sex-determination time-window in adults at the transition between the end of a cycle and the beginning of the next one and in 45-60dpf-spat raised at 18°C and fed *ad libitum*. In adult oysters, an influence of temperature on sex determination has been suspected for many years. Indeed, as early as 1936, Coe mentioned in *C. virginica* a female-biased sex-ratio at high temperatures (Coe, 1936). In *C. gigas*, a one-year conditioning at low temperatures (8°C) induced a male-biased sex-ratio (Fabioux et al.,

2005). However, in contrast, nothing is known on the effect of temperature on sex determination in oyster's developmental stages, although they may be more sensitive to environmental changes than adults. Besides, very few is also known about the first oyster's gonadic differentiation and gametogenesis. In spat some quite old studies (Galtsoff, 1964; Tardy, 1970; Lubet et al., 1976) mention that gonads originate from one or two groups of primordial germ cells (PGCs) located on the ventral side of the pericardium in the vicinity of the visceral ganglion and which differentiate into germinal stem cells (GSCs) before the first reproductive cycle. According to Naimi et al. (2009b), undifferentiated germ cells would already be present in the gonadal tubules in 90-120dpf-spat raised at 18°C.

In this context, the objective of our work was to highlight the effect of four different temperatures (18, 22, 25 and 28°C) on spat sex determination through the study of their sex-ratio and of expressions of potential sex-determining genes (Cg-DMI, Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os, Cg-SoxE and Cg- β -catenin) and *Oyvlg*, a germ cell marker. The kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis were also assessed in parallel.

2. Material and methods

2.1. *Experimental animals and conditioning*

Animals descended from one fertilisation in order to ensure their identical genetic origin. Fertilisation, larval rearing, settlement and metamorphosis were performed at the IFREMER hatchery in Argenton (Brittany, France) in spring 2011, following the experimental design previously described by Rico-Villa et al. (2006). Then, 28dpf-old-spat (shell length between 0.5 and 0.7 mm) were transferred to vertical 500 ml cylindrico-conical tubes in a flow-through system (Rico-Villa et al., 2008) and maintained at 4 different temperatures, 18, 22, 25 and 28°C. Food was delivered in order to maintain in each tube an optimal and constant biomass ($1500 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$) of a 50/50 mix of *Isochrysis affinis galbana* (T) / *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* (Cg). Sampling was done on a periodic basis, based on temperature and on kinetics of development: every day at 28°C during 11 days; each 2, 3 and 4 days respectively at 25, 22 and 18°C during respectively 18, 24 and 28 days. Samples were prepared for RNAs extractions and histology. In order to determine spat sex-ratios by histology, a last sampling was performed after 21 days of conditioning for animals maintained at 25 and 28°C and after a 28-day- and a 58-day-conditioning respectively at 22°C and 18°C. Spat, were then, at this time, respectively 49, 56 and 86 dpf old.

2.2. *Total RNAs extractions*

Total RNAs were extracted from 10 pools of 10 spat, before the conditioning and at each sampling time, for each temperature, using Tri-Reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions.

2.3. *Real time RT-PCR*

After DNase I RQ1 (Promega, Charbonnières, France) treatment, 500 ng of total RNA samples (pool of 10 individuals) were reverse-transcribed using 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) during 90 min at 37°C and with oligod(T)₁₅ primer (Promega) or FoxAS2 (5' CCGCCGGATAGTCGTTAAG 3') and FoxS4 (5' AGTATTCGCCACAATTTGAGCTTAAAT 3') for reverse transcriptions of Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os respectively. PCR experiments were cycled 45 x (15 sec/95°C, 45 sec/60°C) after 15 min/95°C, in a final volume of 15 μl , using the

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Marnes-La-Coquette, France) with 5 ng template DNA, 7.5 µl of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and 300 nM of specific forward and reverse primers. Reactions with RNAs not reverse-transcribed were used as negative controls. Accurate amplifications of target amplicons were assessed by constructing melting curves and PCR amplification efficiency ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series on several samples. DNA amplifications were performed using specific pairs of primers listed in Table 1. The relative mRNA levels were normalized to EF1α transcripts using the following formula, $N=10 \times 2^{(\text{Ct}_{EF1\alpha} - \text{Ct}_{Cg-gene})}$. Statistical analyses were performed using 2-tailed Mann-Whitney U-test.

2.4. Histology

Spat were fixed in Davidson's fixative for 24h, after having drilled a hole in their shelves to improve the soaking of soft tissues. Then animals were unshelled in 70% ethanol under a binocular microscope, dehydrated and embedded in paraffin. Five-µm-thick serial sections were performed and stained with a Prenant-Gabe trichrome according to a classical protocol (Gabe, 1968). Slides were examined and pictures were taken with an Eclipse 80i microscope coupled to a DXM1200-C camera (Nikon, Champigny sur Marne, France). For each temperature, (i) sex-ratio was assessed on 4 slides of 24-53 individuals and (ii) kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis after observation of 4 slides of 5 representative animals. Criteria used to assess progress of gonadic differentiation and gametogenesis are summarized in Table 2. They include number of collecting ducts and gonadal tubules, number of germ cells and their relative proportions.

3. Results

3.1. *Effect of temperature on sex-ratio*

For each temperature, sex-ratio was assessed on spat which could be sexed (Fig. 1). Undetermined individuals were also observed although they were not taken into account for analysis. This determination was based on histological observations of gonadic area. In adult, this latter is a diffuse organ made of numerous tubules (including collecting ducts), site of gametogenesis, and embedded in a connective storage tissue. Histological pictures of Figure 1 aim to illustrate some random gametogenesis but not a degree of maturation as animals do not have the same age. At 18°C, sex-ratio is biased towards females (1.4:1). The gonadic area is only made of extended collecting ducts mainly filled with spermatogonia and spermatocytes in males (data not shown) and some oogonia in females (Fig. 1 A). At 22°C, sex-ratio is still biased towards females although it is less obvious (1.2:1). Males for instance (Fig. 1B), exhibit many spermatogonia and spermatocytes. Between 22 and 25°C, a switch in sex-ratio seems to occur and at 25°C, it is then slightly in favor of males (1.1:1). These latter exhibit then spermatogonia, spermatocytes, few spermatids and even spermatozoa in some individuals while female tubules are filled with oogonia and pre-vitellogenic oocytes (results not shown). At this temperature, some simultaneous hermaphrodites (2.7%) are also present. At 28°C, a strong male-biased sex-ratio is observed (2:1). Numerous vitellogenic oocytes and spermatozoa are then observed respectively in females (Fig. 2D) and in males (results not shown). Some mature males with only spermatozoa can also be observed (results not shown). At this temperature, simultaneous hermaphrodites are more frequent compared to 25°C and they always exhibit female germ cells more peripheral in the gonadal tubules than male germ cells (Fig 1C).

3.2. *Effect of temperature on kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis*

Table 3 illustrates, at each of the four temperatures tested, kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis in spat of the same age, arbitrarily 49 dpf. The average length of unshelled animals varies according to temperature, from 3.69 mm at 18°C to 9.26 mm at 28°C. Criteria used to assess kinetics of gonadic differentiation are number of

collecting ducts and of gonadal tubules and for gametogenesis, number and proportions of type of germ cells observed.

At 18 and 22°C, animals only exhibit few collecting ducts with few round germ cells which may be either primordial or undifferentiated germ cells. The number of collecting ducts exhibits a 3-5-fold increase as the temperature drops to 22°C. From 25 to 28°C, almost all the animals can be sexed; they exhibit gonadal tubules, more abundant as the temperature increases; collecting ducts are also more frequent compared to lower temperatures. They both are filled with differentiated germ cells, at 25°C, in majority oogonia in females (results not shown) and spermatogonia and spermatocytes in males. Some of the latter exhibit also sometimes spermatids (results not shown). At 28°C, all types of germ cells are observed, and tubules and ducts are filled with a majority of vitellogenic oocytes in females (results not shown) and spermatids in males. From 25°C, some animals exhibit a disturbed although complete gametogenesis, with very few differentiated germ cells (results not shown).

3.3. *Effects of temperature on expression of candidate genes of sex determination*

Expression profiles in spat at the four different temperatures have been assessed by real-time PCR for the five sex-determination candidate genes (male ortholog Cg-DML and Cg-SoxE - female ortholog Cg-Foxl2 and Cg- β -catenin - the natural antisense transcript Cg-Foxl2os) and for Oyvlg, the germ cell marker.

At 18°C (Figs. 2A-C), Oyvlg, Cg-SoxE, Cg-DML and Cg- β -catenin present peaks of expressions in 44 dpf-spat, 16 days after the beginning of the conditioning (Fig. 2A). The gonad is then not visible as illustrated by histological picture (Fig. 2B). The area where gonad is expected only shows kidney and digestive gland. Although high individual variability is observed and differences are therefore not statistically significant, Cg- β -catenin is more expressed than male ortholog Cg-DML and Cg-SoxE. Cg- β -catenin exhibits also a peak of expression in 32 dpf-spat. Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions (Fig. 2C) peak earlier than other genes, in 40 dpf-spat and the first exhibits significantly higher level compared to the second.

At 22°C (Fig. 3A-C), *Oyvlg*, *Cg-SoxE*, *Cg-DMI* and *Cg-β-catenin* expressions peak earlier compared to 18°C, in spat aged of 37 dpf, 9 days after the beginning of the conditioning (Fig. 3A). Again, the gonad is not visible at this developmental stage (Fig. 3B). *Cg-β-catenin* expression is then significantly higher compared to male ortholog expression levels. Again, *Cg-Foxl2* and *Cg-Foxl2os* present peaks of expressions before other genes, in 31-34-dpf-spat (Fig. 3C). Although, *Cg-Foxl2* expression is still superior to those of its NAT, in contrast with 18°C, the difference of levels is not significant anymore (Fig. 3C). Some small peaks of expressions are also observed, especially for *Cg-SoxE* and *Cg-β-catenin* but also for *Cg-Foxl2* and *Cg-Foxl2os* (Figs. 3A and C).

At 25°C (Figs. 4A-C), main peaks of expressions of *Oyvlg*, *Cg-SoxE*, *Cg-DMI* and *Cg-β-catenin* appear earlier compared to lower temperatures, in 34-dpf spats (Fig. 4A), so 6 days after the beginning of the conditioning, when gonad is absent (Fig. 4B). In contrast with lower temperatures, although expression levels are not significantly different, there is now a general trend with male gene (*Cg-DMI* and *Cg-SoxE*) expressions higher compared to the female one (*Cg-β-catenin*). *Cg-Foxl2* and *Cg-Foxl2os* expressions increase earlier, in spat aged of 32dpf, without being significantly different (Fig. 4C). Some small peaks of expressions are also observed for *Cg-DMI*, *Cg-SoxE*, *Oyvlg*, *Cg-Foxl2* and *Cg-Foxl2os* (Figs. 4A and C). Note that gene expressions are slightly disturbed at the beginning of the conditioning when animals are transferred to different temperatures (Figs. 4A and C).

At 28°C (Figs. 5A-C), gene expressions are not only disturbed at the beginning of the conditioning but also later on. Indeed, *Cg-DMI* and *Cg-SoxE* expressions peak later compared to lower temperatures, in 36 dpf-spat, again, at the developmental stage devoid of gonad (Fig. 5B). *Cg-β-catenin* and *Oyvlg* exhibit no peak of expression (Fig. 5A), at this stage as during the entire conditioning. Nevertheless, the trend observed at 25°C, with a male-dominant-gene expression is confirmed at 28°C with *Cg-DMI* and *Cg-SoxE* significantly more expressed than *Cg-β-catenin*. Some small peaks of expressions are also observed, especially for *Cg-DMI* (Fig. 5A). *Cg-Foxl2* and *Cg-Foxl2os* expression peaks occur in 34-35-dpf spat. Although this is not significant, *Cg-Foxl2os* is now and for the first time, superior to *Cg-Foxl2* expression (Fig. 5C).

4. Discussion

In the present study we report the effect of four different temperatures (18, 22, 25 and 28°C) on sex determination, first gonadic differentiation and gametogenesis in *C. gigas* spat. For this purpose, spat were raised in controlled conditions of light, oxygen and food availability (a constant biomass of food was maintained in the tank over the time of the experiment) in order to discriminate only the influence of temperature.

4.1. Temperature influences spat sex-ratio

In oyster spat, temperatures from 18 to 28°C induced a switch in sex-ratio. This is the first time that influence of temperature on sex-ratio has been documented in spat. In adults, biased sex-ratios have been observed in the field under different environmental conditions (food, temperatures) and a one-year conditioning at 8°C has been mentioned to induce a male-biased sex-ratio (1:1.6) (Fabioux et al., 2005). Thus, our results strongly reinforce the hypothesis of the existence of a TSD in the pacific oyster. Because a genetic control has also been previously mentioned (Guo et al., 1998; Hedrick and Hedgecock, 2010), *C. gigas* may then exhibit a mixed sex-determination (GSD+TSD) as many fish and amphibians (Valenzuela et al., 2003; Wedekind and Stelkens, 2010). Our results also allow hypothesizing about the pattern of temperature-sensitivity of the japanese oyster, even if these patterns are highly variable among species with TSD. Indeed, high temperatures of incubation during the development lead to male embryos (pattern Ia: FM) for most turtle species such as *Trachemys scripta*, *Lepidochelis olivacea* or *Chrysemys picta* (Shoemaker and Crews, 2009) and for all fish with TSD (Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008). In contrast, they lead to females (pattern Ib: MF) for most lizards (Hulin et al., 2009). Some other species among crocodiles, turtles as *Chelydra serpentina*, lizards and squamates as the gecko *Eublepharis macularius* exhibit another mode of TSD, with extreme cool and warm temperatures producing females, while intermediate temperatures induce males (Pattern II: FMF) (Shoemaker and Crews, 2009). Recently another pattern has been proposed in the lizard *Calotes versicolor*, with 100% males produced at low (25.5°C) as well as very high (34°C) incubation temperatures and 100% females produced at very low (23.5°C) and high (31.5°C) temperatures (Pattern III: FMFM) (Inamdar-Doddamani et Seshagiri, 2012). In *C. gigas* spat (our study), a female-

biased sex-ratio is observed at 18 and 22°C and a male-biased sex-ratio at 25 and 28°C. This may suggest a pattern Ib (FM) as mentioned for instance in fish. Nevertheless, the hypothesis of a MFM pattern cannot be excluded considering that adult sex-ratios are in favor of males at 8°C (Fabioux et al., 2005). Very little is known about the physiological mechanisms underlying such diverse patterns. In oyster, sex-ratios are in favor of females when food conditions are favorable (Lango-Reynoso et al., 1999; Chávez-Villalba et al., 2011). This may help to store carbonates and lipids, particularly necessary for the formation of female germ cell lineage (Soletchnik et al., 1997). Males would then be preferentially found in unfavorable conditions, suggesting therefore that their metabolism may require less energy than females. In oyster, temperatures of 8°C (Fabioux et al., 2005) and 25°C and 28°C (our study) may induce more males as they are not optimal conditions. This could be illustrated here by disturbed sex-determining gene expressions and gonadic differentiation for some individuals and also by an increased number of simultaneous hermaphrodites, as already observed by Lango-Reynoso et al. (2006) when temperature increase in spring. At last, it may be surprising to obtain mainly female spat at 18°C as oysters are usually considered as protandric animals. This point highlights the complexity of environmental influence on oyster sex determination and may suggest, in the present work, an additional influence of optimal conditions of food availability.

4.2. *Temperature influences first gonadic differentiation and gametogenesis*

In spat, increased temperatures accelerated kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis. This was illustrated by (i) the increased number of gonadal tubules and collecting ducts with increased temperatures, (ii) for instance the presence of most of the germ cell line at 25°C while only undifferentiated germ cells were observed at 18°C and (iii) the earlier peaks of expressions of *Oyvlg* as the temperature increased. In adult *C. gigas* also, high temperatures enhance gametogenesis kinetics (Fabioux et al., 2005). In the same way, high temperatures induce an increase of gonadal index in the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus* (Mladineo et al., 2007) and accelerate spermatogenesis in the toad *Bufo melanostictus* (Parua Mondal et al., 2011). In contrast, in the mussel *Mytilus edulis* and the pearl oyster *Pinctada imbricate*, increased temperatures slow down gametogenesis as

energy is rather allocated to metabolism than to reproduction (Fearman and Moltschaniwskyj, 2010; Urban, 2000).

In our study, temperatures of 25 and 28°C also slightly disturbed gonadic differentiation and gametogenesis (28°C also delayed it). Indeed, at these temperatures, (i) some animals exhibited very few differentiated germ cells and (ii) a disturbed Oyvlg expression was observed at the beginning of the conditioning (also later on at 28°C). A negative influence of temperature on reproduction has already been mentioned in well studied ectothermic vertebrates and in particular in fish (Pankhurst and King, 2010). In salmonids (Pankhurst and King, 2010), high temperatures (i) have deleterious effects on reproductive development of female broodstocks of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Arctic charr *Salvelinus alpinus* and (ii) inhibit spermiation in *S. salar* and *O. mykiss*. High temperatures also prevent gonadal maturation of the pikeperch *Sander lucioperca* (Hermelink et al., 2011). According to species and sex, the sensitivity threshold is different; gametogenesis is affected by a 4°C-increase in the blue gourami *Trichogaster trichopterus* and males *Cottus gobio* while it is impaired by a 8°C-increase of temperature in females *C. gobio* (Dorts et al., 2012). Nevertheless, in *C. gigas*, in contrast with all these species, although gonadic differentiation is slightly disturbed and delayed at 25 and/or 28°C, the delay is later overtaken and gametogenesis goes till the end, illustrating the great ability of oyster to cope with changing environments.

Our study is the first to deal with kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis in *C. gigas* and with the effect of temperature on these processes in spat. Such information is necessary and helpful for at least two reasons. First, almost nothing is known about the first oyster's gonadic differentiation and gametogenesis in spat, apart from some information about (i) the migration of PGCs mentioned by some quite old studies (Galtsoff, 1964; Tardy, 1970; Lubet et al., 1976) and about (ii) the presence of undifferentiated germ cells observed in gonadal tubules in 90-120 dpf-spat raised at 18°C by Naimi et al. (2009b). Secondly, it is commonly accepted that kinetics of development, gonadic differentiation and gametogenesis are all correlated in oyster. Yet, this is far from being so clear. Indeed in the present study, as expected, increased temperatures accelerated spat development as

illustrated by increased size of animals at 28°C compared to 18°C for instance. But biggest animals were not always the one exhibiting the most differentiated gonad or advanced gametogenesis (personal observations).

4.3. *Temperature influences expression of oyster sex determination candidate genes*

The expression profiles of five candidate genes involved in the oyster adult sex-determining pathway (Cg-Foxl2, Cg-Foxl2os, Cg-DMI, Cg-SoxE and Cg- β -catenin) and of Oyvlg, the germ cell marker, have been studied by real-time PCR at each temperature of conditioning. In order to measure the effect of different temperatures and not of different developmental stages on these gene expressions, at each temperature, the developmental stage exhibiting a peak of expression of Oyvlg and devoid of gonad was considered as a reference, a key time of gonadic differentiation.

Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os levels were increased respectively in spat of 40, 37, 32 and 34 dpf at 18, 22, 25 and 28°C while Cg-SoxE, Cg-DMI, Cg- β -catenin and Oyvlg peaks of expressions occurred respectively in spat aged of 44, 37, 34 and 36 dpf. These gene expression profiles suggest a time-window of sex determination in spat around 40-44 dpf at 18°C. This is in agreement with previous studies which suggest that sex determination may occur around 45-60 dpf (Naimi et al., 2009b). Although increased temperatures accelerate (and shorten) kinetics of sex determination as they accelerate (and shorten) kinetics of first gonadic differentiation, the time-window of 4 days in the present study is particularly short compared to the 15 days mentioned at 18°C by Naimi et al. (2009b). This may be explained by optimal conditions of food availability in the present work.

Peaks of expressions of Cg-Foxl2, Cg-Foxl2os, Cg-SoxE, Cg-DMI, and Cg- β -catenin observed in our study, also suggest that these actors may intervene in sex determination cascade in spat as in adults of *C. gigas* (Naimi et al., 2009a; b; Santerre et al., 2012a; b). For each temperature, Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions always peaked before other sex-determining genes in spat. This is in agreement with previous results obtained in adults, showing peak expressions of both genes in stage III, before Cg-SoxE and Cg-DMI peak

expressions in stage 0 of the following cycle (Santerre et al., 2012b). In adults, although both Cg- β -catenin and Cg-Foxl2 peaks of expressions occur in stage III, it can't be excluded that they are delayed one to another within the stage.

Our results exhibit, as in adults, a spat sex determination cascade with a balance of expression between male and female factors, but they also highlight for the first time in oyster, an influence of temperature. Indeed, at 18 and 22°C, when a female-biased sex-ratio is observed, Cg-Foxl2 is more expressed than Cg-Foxl2os and Cg- β -catenin expression is superior to male ortholog levels. As in adult oysters, Cg- β -catenin and Cg-Foxl2 may be involved in female sex determination during first ovarian differentiation (Santerre et al., 2012a; b). In contrast, at 28°C, when a male-biased sex-ratio is observed, Cg-Foxl2os expression is superior to Cg-Foxl2 as Cg-DML and Cg-SoxE expressions compared to Cg- β -catenin. As mentioned in adults by Santerre et al. (2012a), Cg-Foxl2 expression could be down-regulated by Cg-Foxl2os to induce a male gonadic differentiation. Cg-DML and Cg-SoxE may also participate to such differentiation, as suggested in adults (Naimi et al., 2009b; Santerre et al., 2012b). A temperature of 25°C may be close to the temperature of switch between females and males as (i) sex-ratio was only slightly biased towards males, (ii) Cg-SoxE and Cg-DML expressions were non-significantly superior to Cg- β -catenin and (iii) Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os peak expression levels were almost similar. Such influence of temperature on sex-determining gene expression profiles has already been mentioned in other species with TSD, for instance for Foxl2 in *T. scripta* (Shoemaker-Daly et al., 2010), *C. serpentina* (Rhen et al., 2007), the japanese flounder (Yamaguchi et al., 2007) and the tilapia, (Baroiller et al., 2009) and for Dmrt1 and Sox9 in *L. olivacea* and *T. scripta* (Torres Maldonado et al., 2002; Shoemaker et al., 2007).

5. Conclusions

Our results demonstrate, for the first time, an environmental influence associated to a genetic control on oyster's sex determination. They also allow to precise the sex-determining time-window and molecular cascade of *C. gigas* during its development. At last, they deal, for the first time with kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis and the effect of temperature on these processes in spat.

6. Acknowledgements

This research is supported by the European Project FP7 "Reproseed". The authors are grateful to Béatrice Adeline, Luc Lebrun, Isabelle Queau for their technical assistance and to Arnaud Lemaréchal and Mathieu Paiola for their help in the treatment of some samples. Christelle Santerre is supported by a '*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*' (MESR) grant.

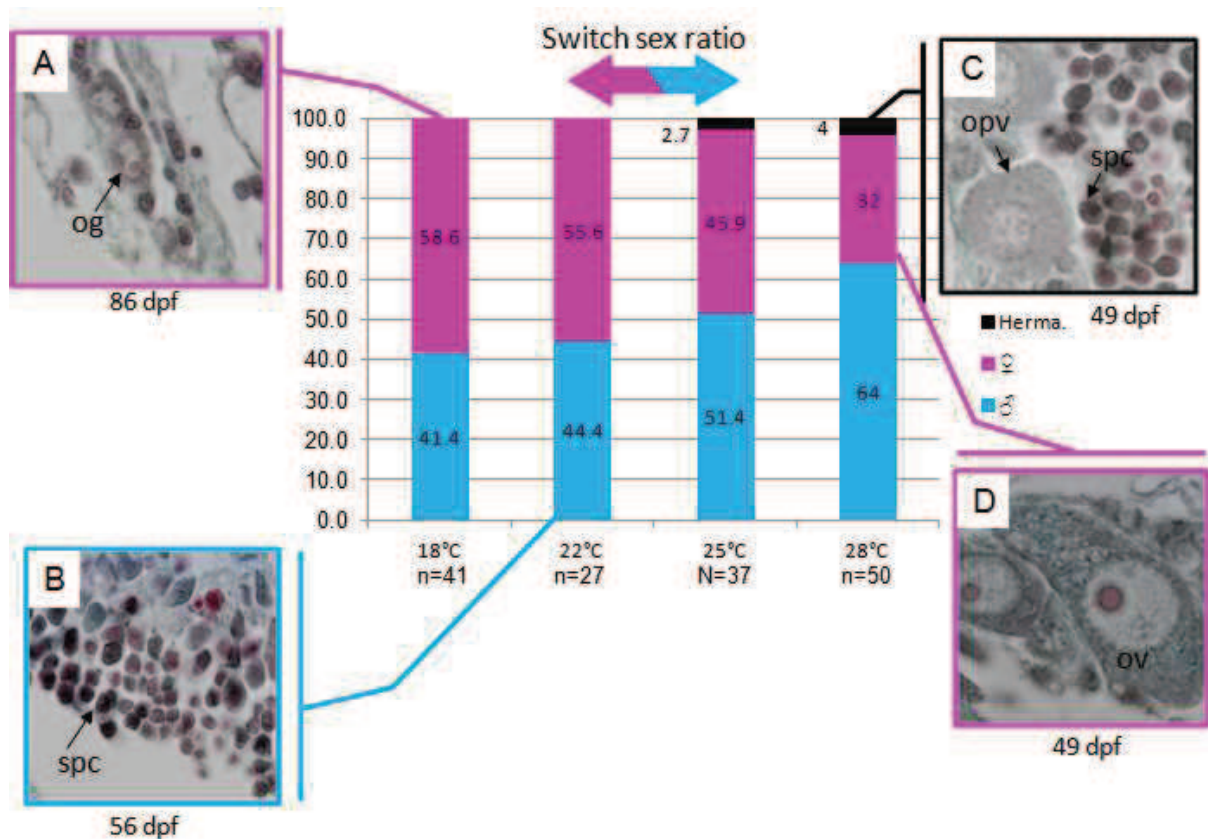


Figure 1: Histograms of sex ratio of spat of the oyster *Crassostrea gigas* conditioned at four different temperatures (18, 22, 25 and 28°C). Number of animals with a differentiated sex (n) used at each temperature is indicated below each histogram. At 18 and 22°C, sex-ratio is biased towards females while it is male-biased at 25 and 28°C. Simultaneous hermaphrodites are also observed from 25°C. **(A, B and C) Histological pictures illustrating random spat gametogenesis inside collecting ducts. (A)** Female at 18°C with few pre-vitellogenic oocytes surrounded by somatic cells. **(B)** Male at 22°C with spermatogonia and spermatocytes. **(C)** Simultaneous hermaphrodite raised at 28°C exhibiting, in the same tubule female germ cells (at the periphery) and male ones (in the center). **(D)** Female at 28°C with vitellogenic oocytes. Dpf: days post-fertilisation; Oog: oogonia; pvO: pre-vitellogenic oocyte; spc: spermatocyte; vO: vitellogenic oocyte. Herma: hermaphrodites; ♀: females; ♂: males.

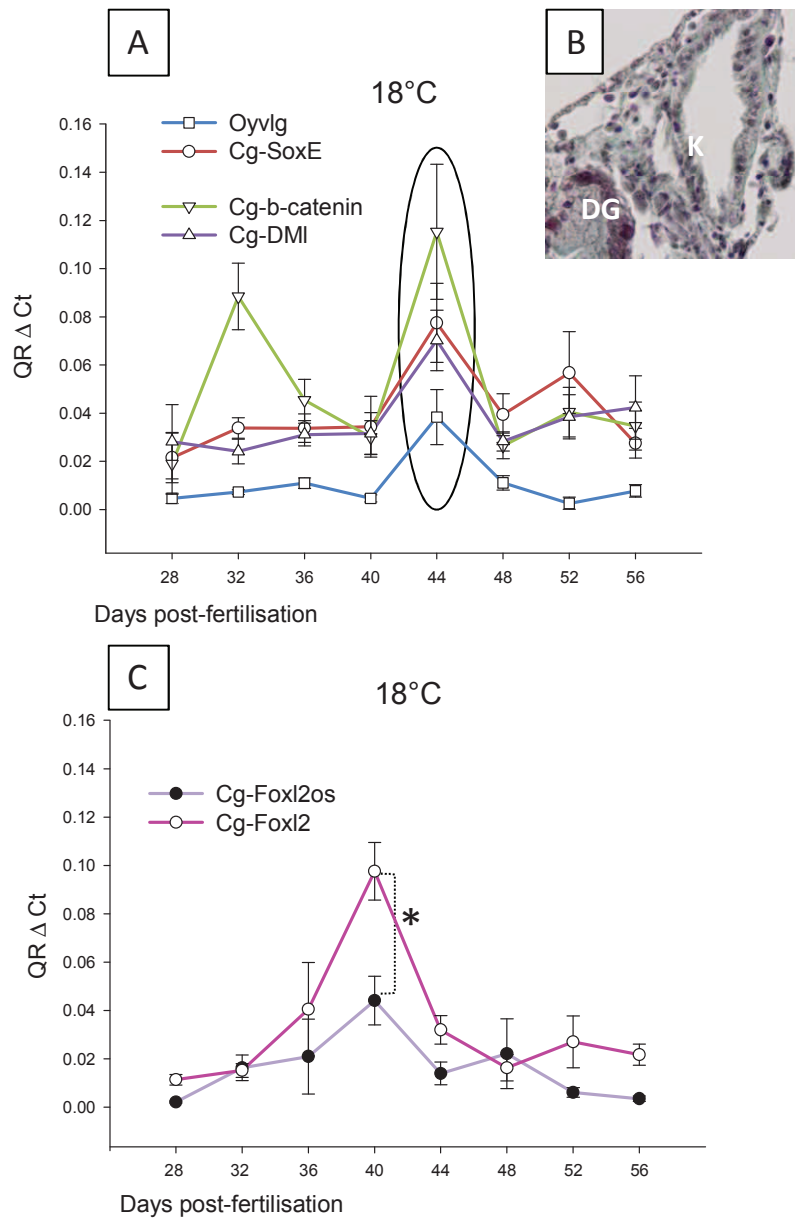


Figure 2: Cg-SoxE, Cg-DMI, Cg-β-catenin and Oyvlg (A) and Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os (C) mRNA temporal expressions relative to EF1α measured by real-time RT-PCR in spat conditioned at 18°C. Total RNAs were isolated from 10 pools of 10 animals. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Stars indicate significant differences of expression between two genes. Values are mean ± SEM. A main peak of expressions is observed for Oyvlg, Cg-β-catenin, Cg-SoxE and Cg-DMI in 44dpf-spat, after Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions which increase at 40 dpf. Cg-β-catenin is non-significantly more expressed than male orthologs and Cg-Foxl2 is significantly more expressed than Cg-Foxl2os, its natural antisense transcript. **(B)** Histological section of the area where gonad is expected but which only shows kidney (K) and digestive gland (DG) in spat exhibiting a peak of Oyvlg.

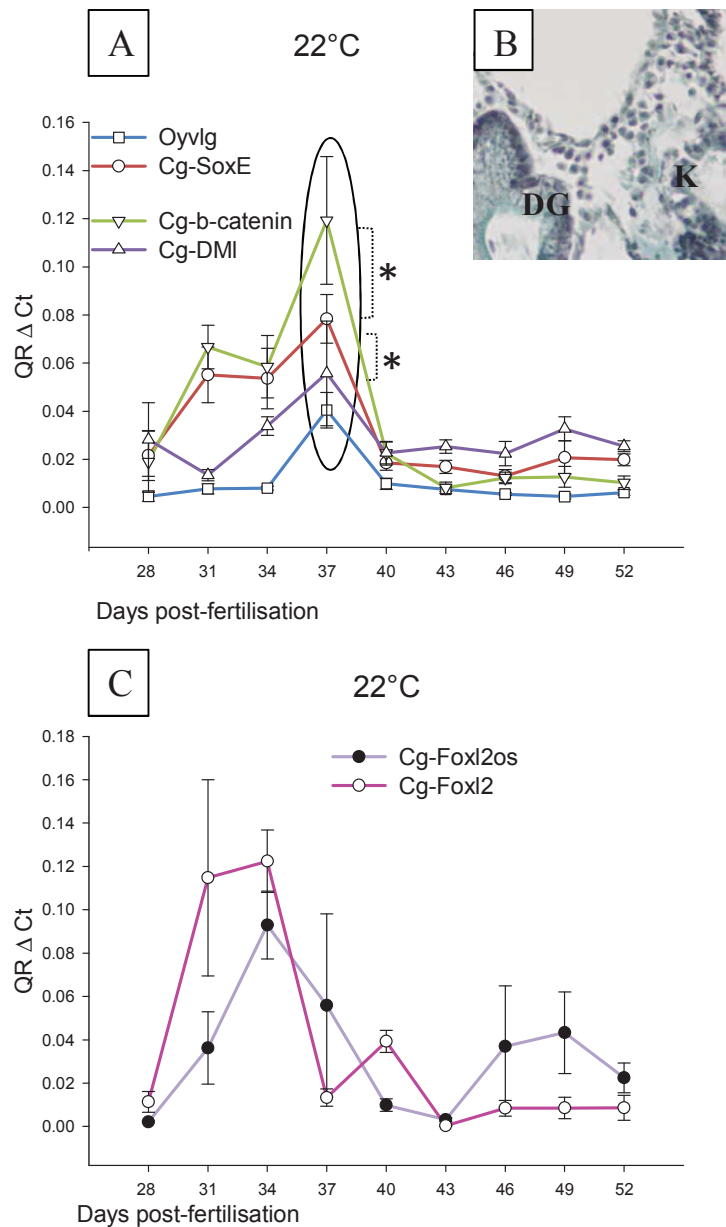


Figure 3: Cg-SoxE, Cg-DMI, Cg-β-catenin and Oyvlg (A) and Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os (C) mRNA temporal expressions relative to EF1α measured by real-time RT-PCR in spat conditioned at 22°C. Total RNAs were isolated from 10 pools of 10 animals. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Stars indicate significant differences of expression between two genes. Values are mean ± SEM. A main peak of expressions is observed for Oyvlg, Cg-β-catenin, Cg-SoxE and Cg-DMI in 37dpf-spat, after Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions which increase at 31-34 dpf. Cg-β-catenin is significantly more expressed than male orthologs and Cg-Foxl2 is non-significantly more expressed than Cg-Foxl2os, its natural antisense transcript. **(B)** Histological section of the area where gonad is expected but which only shows kidney (K), hemolymphatic vessel (V) and digestive gland (DG) in spat exhibiting a peak of Oyvlg.

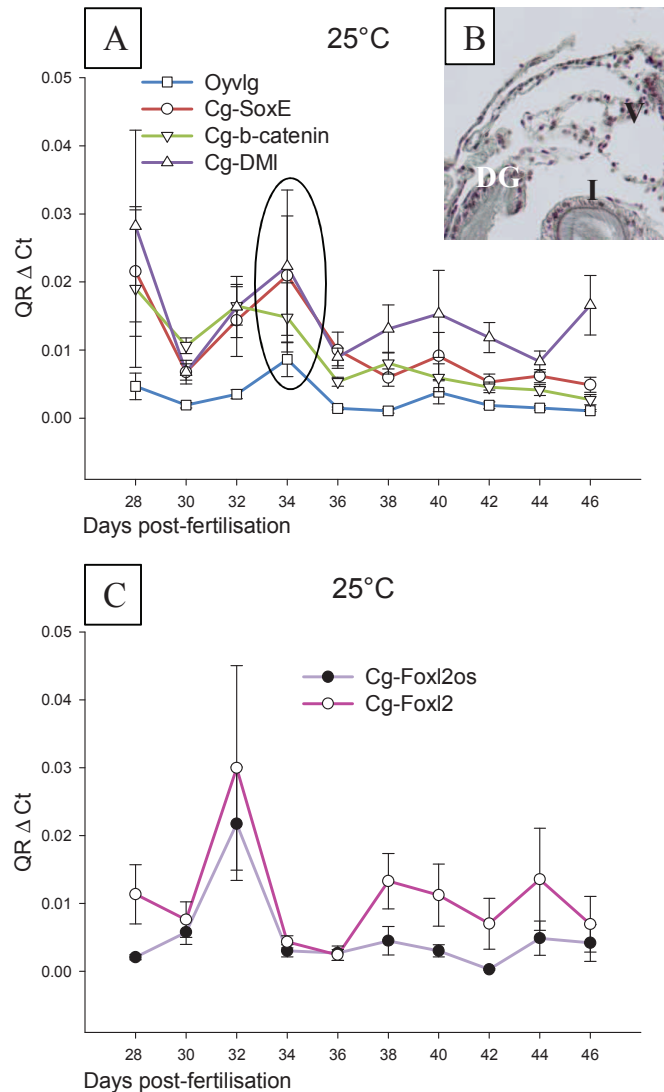


Figure 4: Cg-SoxE, Cg-DMI, Cg-β-catenin and Oyvlg (A) and Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os (C) mRNA temporal expressions relative to EF1α measured by real-time RT-PCR in spat conditioned at 25°C. Total RNAs were isolated from 10 pools of 10 animals. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Stars indicate significant differences of expression between two genes. Values are mean ± SEM. A main peak of expressions is observed for Oyvlg, Cg-β-catenin, Cg-SoxE and Cg-DMI in 34dpf-spat, after Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions which increase at 32 dpf. Cg-SoxE and Cg-DMI are non-significantly more expressed than female ortholog Cg-β-catenin and Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os are not significantly different. Gene expressions are slightly disturbed at the beginning of the conditioning when animals are transferred to different temperatures. **(B)** Histological section of the area where gonad is expected but which only shows digestive gland (DG), hemolymphatic vessel (V) and intestine (I) in spat exhibiting a peak of Oyvlg.

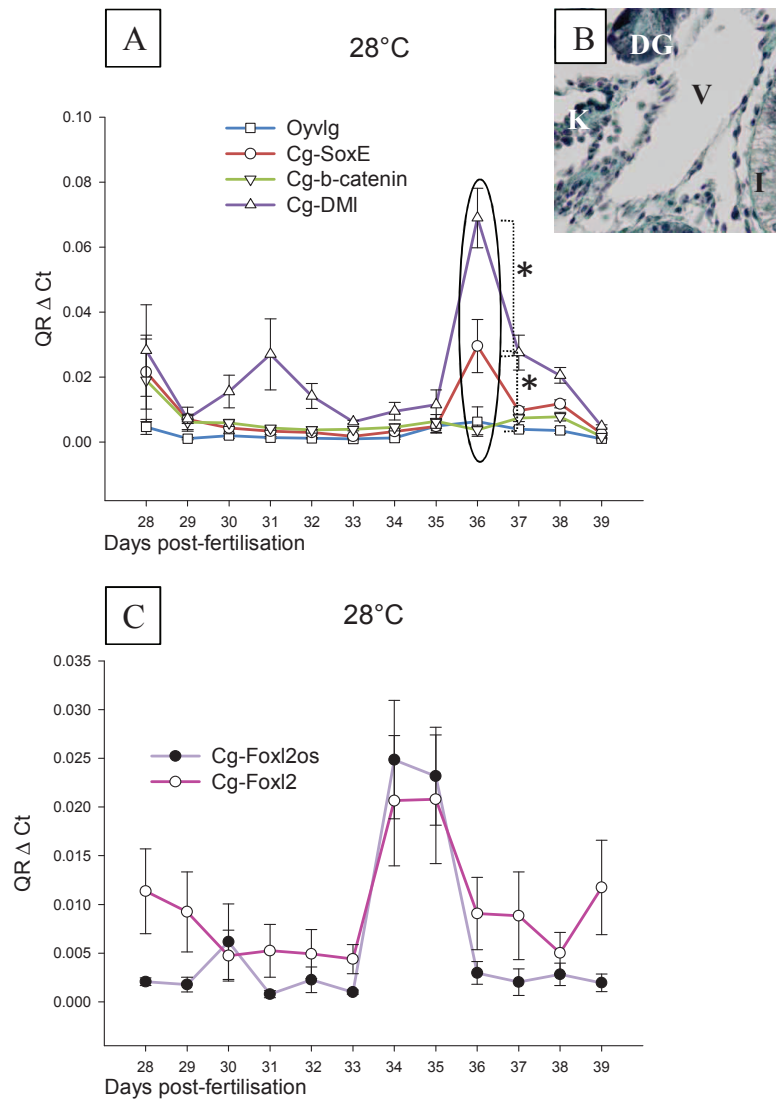


Figure 5: Cg-SoxE, Cg-DMI, Cg- β -catenin and Oyvlg (A) and Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os (C) mRNA temporal expressions relative to EF1 α measured by real-time RT-PCR in spat conditioned at 28°C. Total RNAs were isolated from 10 pools of 10 animals. QR: Relative Quantity, arbitrary units. Stars indicate significant differences of expression between two genes. Values are mean \pm SEM. A main peak of expressions is observed for Cg-SoxE and Cg-DMI in 36dpf-spat, after Cg-Foxl2 and Cg-Foxl2os expressions which increase at 34-35 dpf. Cg-SoxE and Cg-DMI are significantly more expressed than female ortholog Cg- β -catenin and Cg-Foxl2os is non-significantly more expressed than Cg-Foxl2. Gene expressions are disturbed at the beginning of the conditioning when animals are transferred to different temperatures and also later for Oyvlg and Cg- β -catenin. **(B)** Histological section of the area where gonad is expected but which only shows digestive gland (DG), kidney (K), hemolymphatic vessel (V) and intestine (I) in spat at the 'reference stage'.

Table 1: Primers used for real-time RT-PCR.

AS: antisense primer; S: sense primer.

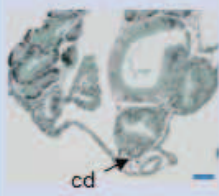
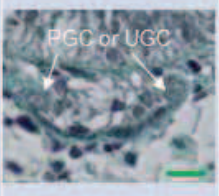
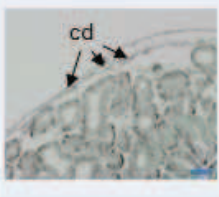
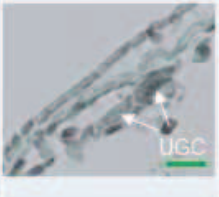
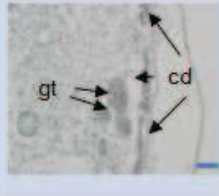
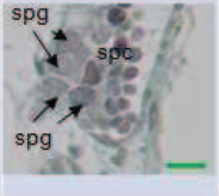
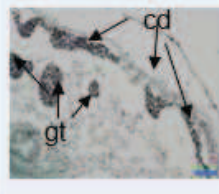
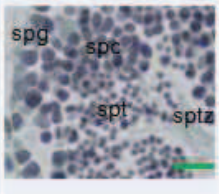
Factors	Primer names	Sequences (5'-3')
Oyvlg	VS-S9	TCCCCGAGGAGATTCAGA
	VS-AS9	ACGTCAGTGCAAGCACCA
Cg-SoxE	SoxEqPCRS1	GCCATTCAAGGAGAAAACGA
	SoxEqPCRAS1	TGTAAGAGCTGGTCCAGGATG
Cg-DMI	DMS	CCATGGAGTGGTGTCCGC
	DMASB	GTTGCCTTTCTGCTATCAGGG
Cg-Foxl2/Cg-Foxl2os	FoxS7	AATATCAGGGATGGGCACAA
	FoxAS3	TCCTTGGGTGCAGGAACTA
Cg-β-Catenin	βCatqPCRS1	CCATGATGGTTCACCAGTTG
	βCatqPCRAS1	ACAGCGAGTGGTCTCCAAGT
EF1 α	qfElong1	ACCACCCTGGTGAGATCAAG
	qrElong1	ACGACGATCGCATTTCTCTT

Table 2: Criteria used to assess progress of gonadic differentiation and gametogenesis.

Criteria used to assess kinetics of gonadic differentiation are number of collecting ducts and of gonadal tubules and for gametogenesis, number and proportions of type of germ cells observed. <: inferior; >: superior; %: percentage; Absence: (-); Presence and abundance: (+) < (++) < (+++).

Criteria	Range	Symbol
Number of gonadal tubules	x < 1	-
	1 to 2	+
	2 to 5	++
	x > 5	+++
Number of collecting ducts	x < 1	-
	1 to 2	+
	2 to 5	++
	x > 5	+++
Number of germ cells in collecting ducts	< 5	-
	5 to 10	+
	10 to 20	++
	x > 20	+++
Proportion of each type of germ cells	1 to 5%	+
	5 to 20%	++
	x > 20%	+++

Table 3: Kinetics of first gonadic differentiation and gametogenesis in spat of the same age, arbitrarily 49 dpf, at four different temperatures. Criteria used to assess kinetics of (i) gonadic differentiation are number of collecting ducts and of gonadal tubules and (ii) gametogenesis are number and proportions of germ cells observed [Absence: (-); presence and abundance: (+) < (++) < (+++)]. Increased temperatures accelerate gonadic differentiation and gametogenesis in parallel with the development. Microscope magnifications: x 10 and x 40. cd: collecting ducts; dpf: days post-fertilisation; gt: gonadic tubules; Nb: number; Oog: oogonias; pvO: pre-vitellogenic oocytes; PGC: primordial germ cells; Spc: spermatocytes; Spg: spermatogonias; Spt: spermatids; Sptz: spermatozoids; UGC: undifferentiated germ cells; vO: vitellogenic oocytes.

T°C (average length; age)	X 10	Nb of gonadal tubules	Nb of collecting ducts	X 40	Number / type of germ cells	
18°C (3.69 mm; 49 dpf)		-	+		Few primordial or undifferentiated germ cells (PGC or UGC)	
22°C (6.23 mm; 49 dpf)		-	++		Undifferentiated germ cells	
25°C (8.14 mm; 49 dpf)		++	+++		Spg +++ Spc +++ Spt + Sptz -	Oog +++ pvO +
28°C (9.26 mm; 49 dpf)		+++	+++		Spg + Spc ++ Spt +++ Sptz ++	Oog + pvO ++ vO +++

References

- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **153**, 30–38.
- Chávez-Villalba, J., Soyez, C., Huvet, A., Gueguen, Y., Lo, C., Moullac, G.L. (2011). Determination of Gender in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Shellfish Research*. **30**, 231–240.
- Coe, W.R. (1936). Environment and sex in the oviparous oyster *Ostrea virginica*. *The Biological Bulletin*. **71**, 353–359.
- Dorts, J., Grenouillet, G., Douxfils, J., Mandiki, S., Milla, S., Silvestre, F., Kestemont, P. (2012). Evidence that elevated water temperature affects the reproductive physiology of the European bullhead *Cottus gobio*. *Fish Physiology and Biochemistry*. **38**, 389–399.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*. **250**, 458–470.
- Fearman, J., Moltschaniwskyj, N.A. (2010). Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*. **305**, 20–25.
- Gabe M. (1968). Techniques histologiques. Masson Paris.
- Galtsoff, P. (1964). The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*. **64**, 11–28.
- 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*. 394–402.
- Guo, X., Li, Q., Wang, Q.Z., Kong, L.F. (2012). Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. *Mar. Biotechnol.* **14**, 218–226.
- Hedrick, P.W., Hedgecock, D. (2010). Sex determination: genetic models for oysters. *J. Hered.* **101**, 602–611.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C. (2011). Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *General and Comparative Endocrinology*. **172**, 282–292.
- Hulin, V., Delmas, V., Girondot, M., Godfrey, M., Guillon, J.-M. (2009). Temperature-dependent sex determination and global change: are some species at greater risk? *Oecologia*. **160**, 493–506.

- Inamdar-Doddamani, L.S., Vani, V., Seshagiri, P.B. (2012). A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. **317A**, 32–46.
- Janzen, F.J. (1994). Climate Change and Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles. *PNAS*. **91**, 7487–7490.
- Korpelainen, H. (1990). Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biological Reviews*. **65**, 147–184.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.-J. (1999). Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the “Rade de Brest”, France. *Invertebrate Reproduction & Development*. **36**, 141–144.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villaba, J., Le Pennec, M. (2006). Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebrate Reproduction & Development*. **49**, 41–50.
- Lubet, P., Herlin-Houtteville, P., Matthieu, M. (1976). La lignée germinale des mollusques pélicypodes. Origine et évolution. *Bull. Soc. Zool. France*. **101**, 22–27.
- Manolakou, P., Lavranos, G., Angelopoulou, R. (2006). Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**.
- Mladineo, I., Peharda, M., Orhanović, S., Bolotin, J., Pavela-Vrančić, M., Treursić, B. (2007). The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgoland Marine Research*. **61**, 183–192.
- Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P. (2009a). Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **152**, 189–196.
- Naimi, A., Martinez, A.-S., Specq, M.-L., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P. (2009b). Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **154**, 134–142.
- Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F. (2008). Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS One*. **3**.
- Pankhurst, N.W., King, H.R. (2010). Temperature and salmonid reproduction: implications for aquaculture. *J. Fish Biol.* **76**, 69–85.
- Parua Mondal, S., Debnath, J.M., Ghosh, D. (2011). Effect of an increase in environmental temperature on testicular androgenesis and spermatogenesis in toad (*Bufo melanostictus*) during hibernating season. *Zoo Biol.* **30**, 681–688.

- Pradeep, P.J., Srijaya, T.C., Papini, A., Chatterji, A.K. (2012). Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)]. *Aquaculture*. **344–349**, 181–187.
- Rhen, T., Metzger, K., Schroeder, A., Woodward, R. (2007). Expression of Putative Sex-Determining Genes during the Thermosensitive Period of Gonad Development in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. *Sexual Development*. **1**, 255–270.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. **256**, 377–388.
- Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Lepiver, D., Pouvreau, S., Hamon, M., Robert, R. (2008). A flow-through rearing system for ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*. **282**, 54–60.
- Santerre, C., Sourdain, P., Martinez, A.-S. (2012a). Expression of a Natural Antisense Transcript of Cg-Foxl2 during the Gonadic Differentiation of the Oyster *Crassostrea gigas* : First Demonstration in the Gonads of a Lophotrochozoa Species. *Sex. Dev.* **6**, 210–221.
- Santerre, C., Sourdain, P., Adeline, B., Martinez, A.-S. (2012b). Cg-SoxE and Cg-β-catenin, two new potential actors of the sex-determining pathways in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Submitted*.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Dyn.* **236**, 1055–1063.
- Shoemaker, C.M., Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **20**, 293–303.
- Shoemaker-Daly, C.M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Dev. Dyn.* **239**, 1061–1075.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P. (1997). Écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l’huître creuse *Crassostrea gigas* : réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources*. **10**, 177–185.
- Tardy, M.J. (1970). Organogenèse de l’appareil génital chez les Mollusques. *Bull. Soc. Zool. France*. **95**, 407–427.
- Torres Maldonado, L., Landa Piedra, A., Moreno Mendoza, N., Marmolejo Valencia, A., Meza Martínez, A., Merchant Larios, H. (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*. **129**, 20–26.

Urban, H.-J. (2000). Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the Caribbean: I. Gametogenic activity, growth, mortality and production of a natural population. *Aquaculture*. **189**, 361–373.

Valenzuela, N., Adams, D.C., Janzen, F.J. (2003). Pattern Does Not Equal Process: Exactly When Is Sex Environmentally Determined? *The American Naturalist*. **161**, 676–683.

Wedekind, C., Stelkens, R.B. (2010). Tackling the diversity of sex determination. *Biol. Lett.* **6**, 7–9.

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.

Discussion générale & Perspectives

Si les voies du déterminisme sexuel sont bien connues chez les vertébrés gonochoriques, notamment ceux présentant un déterminisme génétique chromosomique comme les mammifères, elles restent peu étudiées chez les hermaphrodites et les espèces à TSD et inconnues chez les lophotrochozoaires. L'huître creuse apparaît donc comme un modèle original et d'intérêt pour l'étude de ce mécanisme physiologique à plusieurs titres : (i) c'est un hermaphrodite successif irrégulier ; (ii) elle présente un déterminisme sexuel génétique (sans hétérochromosomes sexuels) influencé par l'environnement ; (iii) en tant que mollusque bivalve, c'est un représentant des lophotrochozoaires qui sont dépourvus d'organisme modèle. Les principaux objectifs de cette thèse étaient donc de préciser, chez *C. gigas*, les voies des différenciations gonadiques mâle et femelle lors des cycles saisonniers adultes et au cours du développement du naissain ainsi que d'appréhender leur régulation par l'environnement et par l'épigénétisme.

I. Cascade de la différenciation gonadique / du déterminisme sexuel mâle et femelle chez l'huître adulte

1. Modèle proposé

Un des premiers objectifs de cette thèse était de caractériser de nouveaux facteurs moléculaires impliqués dans le déterminisme sexuel de l'huître, hormis Cg-Foxl2 et Cg-DML, déjà identifiés par NAIMI et collaborateurs et impliqués respectivement dans les voies femelle et mâle (NAIMI *et al.* 2009a ; b). Ce travail a été réalisé à l'aide de la banque d'EST d'huître *GigasDatabase* incrémentée au fil des ans et d'une étude transcriptomique en *microarrays* qui a mis en évidence les profils d'expressions gonadiques des 31952 contig disponibles (DHEILLY *et al.* 2012), au cours du cycle gamétogénétique adulte.

Quatre gènes, orthologues de facteurs impliqués dans le déterminisme sexuel ont ainsi été sélectionnés dans un premier temps : deux orthologues de facteurs mâles de mammifères, Cg-SoxB1 et Cg-SoxE représentant les familles d'appartenance de Sox3 et Sox9, respectivement, et deux orthologues de facteurs femelles, Cg-Dax-1 et la Cg- β -caténine. Les quatre facteurs présentaient des profils d'expressions intéressants en puce à ADN lors du cycle gamétogénétique adulte de l'huître, à savoir un pic en stade 0 puis une décroissance pour Cg-SoxE et Cg-SoxB1 et une augmentation uniquement chez les femelles pour Cg-Dax-1

et Cg- β -caténine. Seuls Cg-SoxE et Cg- β -caténine ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Cg-SoxE aurait ainsi un rôle précoce au cours de la différenciation gonadique mâle incluant le déterminisme sexuel et la Cg- β -caténine serait impliquée dans la différenciation ovarienne plus tardive et/ou dans le déterminisme sexuel initié à la fin d'un cycle adulte pour le cycle suivant.

L'étude d'un ARN anti-sens naturel (NAT) de Cg-Foxl2, dont l'existence avait été suspectée en hybridation *in situ* (NAIMI *et al.* 2009b), a également été réalisée, notamment chez l'huître adulte. Ce NAT, nommé Cg-Foxl2os, jouerait un rôle clé dans l'inhibition de l'expression de l'ARNm de Cg-Foxl2 par la formation de duplex. Chez les futurs mâles, une forte expression de Cg-Foxl2os dès la fin du stade III pourrait ainsi entraîner une inhibition de Cg-Foxl2 et ainsi favoriser un développement mâle au cycle gamétogénétique suivant.

L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un modèle de cascade du déterminisme sexuel et de la différenciation gonadique chez l'huître adulte (Figure 43) qui complète celui précédemment proposé dans le chapitre II, le premier chez un lophotrochozoaire. Ainsi, le déterminisme sexuel serait sous le contrôle d'un gène majeur sous forme de trois génotypes, comme suggéré par HEDRICK et HEDGECOCK (2010). Les facteurs que nous avons étudiés seraient des gènes secondaires de la cascade, même s'il n'est pas exclu que l'un d'eux soit le gène majeur. Ils sont présents chez les deux sexes et c'est leur balance d'expression qui influencerait le sexe gonadique de l'animal. Ils pourraient être, eux aussi, sous forme de trois génotypes, mais la variabilité phénotypique observée chez l'huître laisserait plutôt supposer qu'ils seraient soit régulés différemment selon le nombre d'allèles M et F du gène majeur soit en nombre de copies variables. Dans tous les cas, chez les futurs mâles, les expressions de la Cg- β -caténine, Cg-Dax-1 et Cg-Foxl2 seraient stables en stade III, notamment pour Cg-Foxl2 à cause de son inhibition par Cg-Foxl2os. Ceci induirait l'augmentation des expressions de Cg-SoxE, Cg-SoxB1 et Cg-DMI en stade 0 du cycle suivant. Chez les futures femelles, l'augmentation des expressions de Cg-Foxl2, Cg-Dax-1 et de Cg- β -caténine en stade III associée à une faible expression de Cg-Foxl2os, induirait de faibles expressions de Cg-SoxE, Cg-DMI et Cg-SoxB1 en stade 0 du cycle suivant. Ce modèle suggère aussi que le déterminisme sexuel de l'huître serait initié en fin du stade III et se poursuivrait au stade 0 avant la reprise de la gamétogenèse.

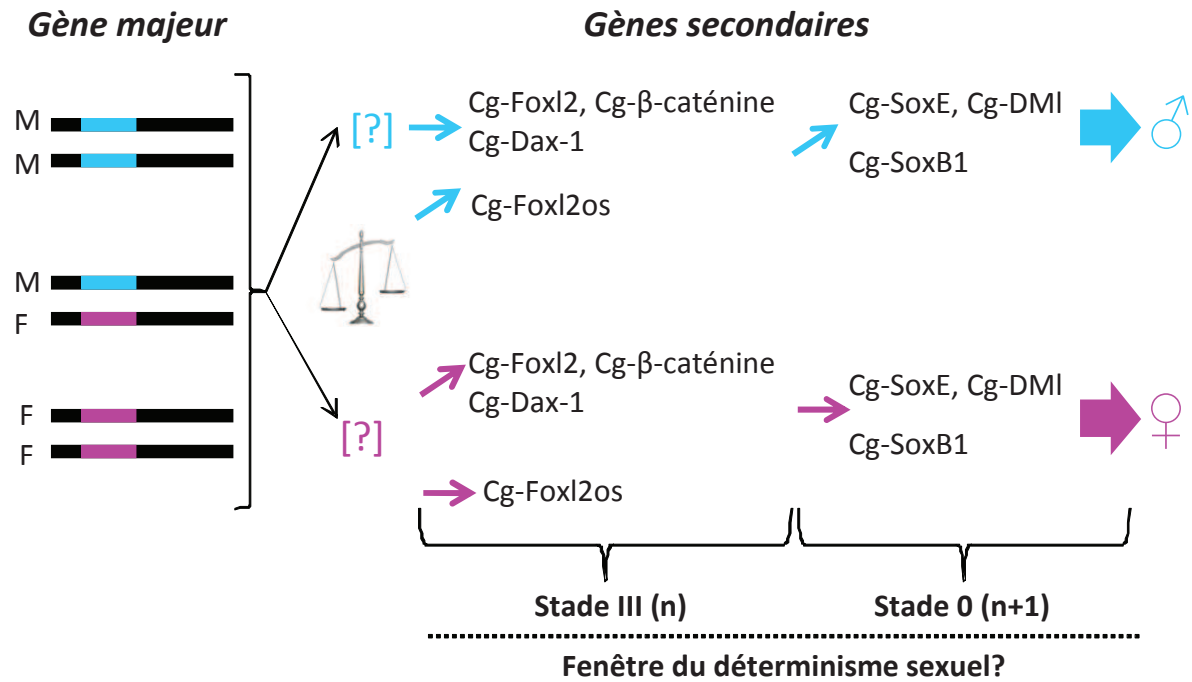


Figure 43 : Modèle de cascade du déterminisme sexuel chez l'adulte.

2. Comment valider ce modèle ?

Ce modèle de cascade doit être validé, en précisant par exemple les profils d'expressions des ARNm de Cg-Dax-1 et Cg-SoxB1, mais surtout en appréhendant la fonction physiologique de chaque facteur de la cascade. Plusieurs approches peuvent ainsi être envisagées, notamment l'étude des expressions protéiques, comme initiée au cours de cette thèse pour Cg-Foxl2 et la Cg-β-caténine. Pour cette dernière, les premiers travaux avec un anticorps hétérologue sont prometteurs et doivent être poursuivis. Pour les facteurs où l'utilisation d'anticorps hétérologues est rendue difficile à cause d'une faible conservation des séquences, l'utilisation d'anticorps homologues doit être privilégiée. Leur synthèse à partir d'une protéine recombinante augmenterait aussi leur spécificité. Pour les facteurs de transcription comme la Cg-β-caténine, Cg-SoxE, Cg-SoxB1 ou Cg-DMI, des études à l'aide des techniques de ChIP (immunoprécipitation de la chromatine) ou de gel retard pourraient aussi permettre de mettre en évidence les interactions entre la protéine codée par ces gènes et l'ADN de leurs cibles respectives. Dans ce sens, la publication du génome de l'huître sera un outil indispensable qui permettra, notamment, d'effectuer une analyse *in silico* des promoteurs des gènes cibles/d'intérêt. L'étude de la fonction des facteurs de ce modèle pourrait enfin être abordée en RNA interférence. Cette technique développée chez l'adulte

(FABIOUX *et al.* 2009) permettrait de mettre en évidence l'effet du facteur inhibé sur la gamétogenèse et sur les niveaux d'expression des autres facteurs de la cascade.

Ce modèle doit également être validé par des études sur des individus triploïdes qui présentent, en comparaison avec des diploïdes, des taux d'expression de facteurs du déterminisme sexuel plus variés et spécifiques, à l'instar de leurs phénotypes gamétogénétiques et génotypes. Cela implique, d'une part de confronter les balances d'expressions de ces acteurs chez les diploïdes et les triploïdes, et d'autre part de mieux appréhender le lien entre les génotypes potentiels, les phénotypes gamétogénétiques observés et ces taux d'expressions. Ainsi, il existe chez les huîtres triploïdes en stade III, deux phénotypes gamétogénétiques par sexe, l'un présentant une gamétogenèse complète ($3N\alpha$) avec production de gamètes mûres assimilable au phénotype diploïde, et l'autre avec une gamétogenèse bloquée ($3N\beta$) avec peu de gamètes mûres (JOUAUX *et al.* 2010). En ce qui concerne les génotypes associés au gène majeur du déterminisme sexuel, l'hypothèse de HEDRICK et HEDGECOCK (2010) proposée pour des huîtres diploïdes peut être transposée aux triploïdes, qui présenteraient alors des génotypes FFF, FFM, MMF et MMM (DHEILLY, communication personnelle). Ils pourraient correspondre respectivement aux femelles α et β et aux mâles β et α (Figure 44).

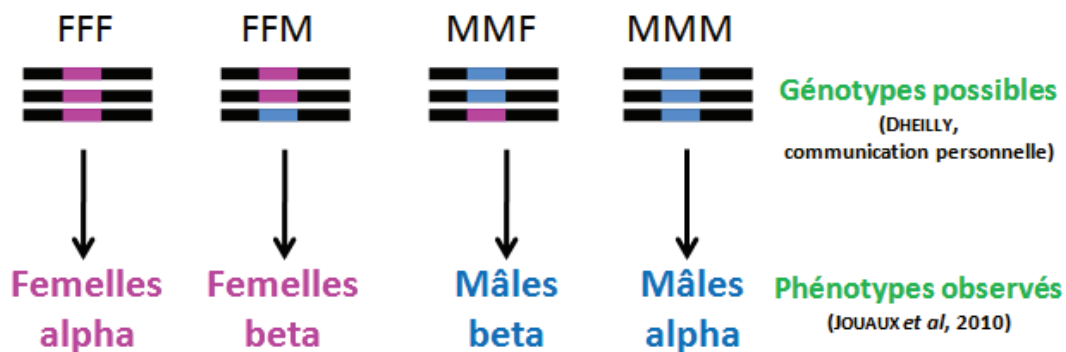


Figure 44 : Génotypes possibles associés aux quatre phénotypes gamétogénétiques définis chez les huîtres triploïdes.

Les taux d'expression des facteurs connus du déterminisme sexuel de l'huître mesurés par puces à ADN sur des aires gonadiques d'animaux triploïdes sont également corrélés à ces génotypes et phénotypes. Par exemple, l'ARNm de la Cg- β -caténine présente (Figure 45) : (i) une expression maximale chez les femelles α (StIII $F\alpha$), (ii) une expression minimale chez des mâles α (StIII $M\alpha$) et (iii) des expressions intermédiaires chez les femelles

et mâles β qui présentant une gamétogenèse bloquée (StIIIF β et StIIIM β). Des profils d'expression semblables ont été observés pour Cg-Foxl2 et Cg-Dax-1. Ces balances d'expression sont ainsi en accord avec l'hypothèse d'HEDRICK et HEDGECK (2010) et pourraient suggérer une régulation différente de l'expression de ces facteurs, en fonction du nombre d'allèles M et F du gène majeur. Ainsi, des femelles α qui auraient 3 allèles F présenteraient une expression des gènes femelles supérieure à celle observée chez des femelles β qui n'en présentent que 2. A l'inverse, des mâles β qui possèderaient 1 allèle F du gène majeur présenteraient une expression des gènes femelles plus élevée que les mâles α ne possédant que des allèles M. Cela n'exclut pas que ces facteurs du déterminisme sexuel soient, comme le gène majeur, sous forme de 3 génotypes, ce qui pourrait être vérifié par l'analyse du polymorphisme des séquences de leur ADN. Ces résultats sur les balances d'expressions des facteurs du déterminisme sexuel chez les triploïdes doivent encore être validés en qPCR et éventuellement précisés en hybridation *in situ*.

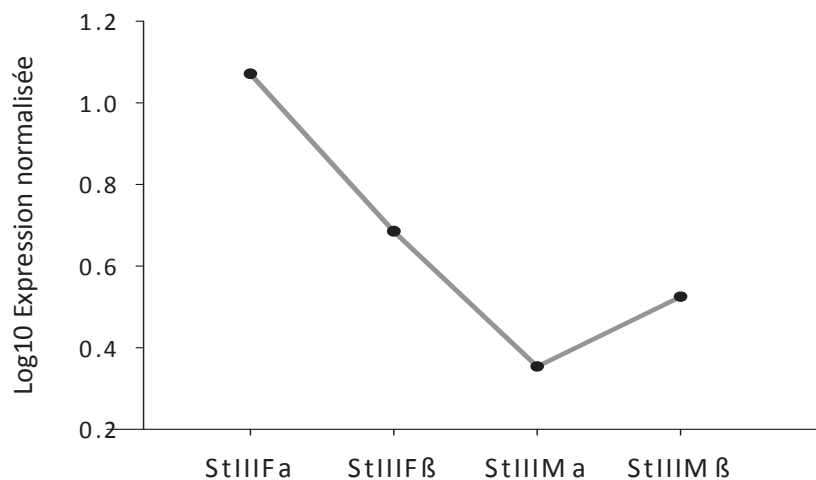


Figure 45 : Expression par puces à ADN de Cg- β -caténine pour les 4 phénotypes gamétogénétiques définis chez les huîtres triploïdes.

StIIIFa : stade III femelle α ; StIIIF β : stade III femelle β ; StIIIMa : stade III mâle α ; StIIIM β : stade III mâle β .

L'étude du lien entre génotypes, phénotypes et expressions doit aussi être poursuivie, dans un premier temps, par une localisation des gènes du déterminisme sexuel sur les chromosomes par la technique du FISH (*Fluorescent in situ hybridization*). Dans un deuxième temps, des puces d'hybridations génomiques comparatives pourraient être réalisées afin de mesurer le nombre de copies des gènes d'intérêt (CNV, *Copy Number Variant*). Enfin, des cartographies génétiques de régions génomiques d'intérêt pour le

déterminisme sexuel pourraient être réalisées en collaboration avec des généticiens, afin de préciser le(s) chromosome(s) lié(s) à ce caractère, le(s) locus(i) intéressant(s), les gènes présents, leurs clusters, leurs allèles. Ces cartographies pourraient faire appel à des techniques comme les QTL (*Quantitative Trait Loci*) comme cela a déjà été fait pour le déterminisme sexuel chez un moustique (GRAHAM *et al.* 2004) ou chez la daurade, poisson hermaphrodite (LOUKOVITIS *et al.* 2011). Quelle que soit l'approche, l'une des principales difficultés réside dans l'obtention de générations stables et phénotypiquement contrastées pour le caractère d'intérêt (ici la détermination du sexe) chez une espèce qui est hermaphrodite successive.

II. Cascade de la différenciation gonadique / du déterminisme sexuel mâle et femelle au cours du développement de *C. gigas*

1. Modèle proposé

Un autre objectif de la thèse était de compléter les données encore très fragmentaires concernant le déterminisme sexuel lors de la première mise en place gonadique. Ainsi, les expressions des facteurs d'intérêt sélectionnés chez l'adulte ont été étudiées chez le naissain, chez qui le déterminisme sexuel était suspecté avoir lieu à 18°C (NAIMI *et al.* 2009b). Dans un premier temps, notre étude des expressions de Cg-Foxl2 et de Cg-Foxl2os, mesurées en qPCR sur du naissain élevé *ad libitum* à 18°C, a mis en évidence un pic d'expression des deux transcrits chez les individus âgés d'environ 45-60 dpf, avec un ratio en faveur de Cg-Foxl2os. Ces données renforcent l'hypothèse d'un rôle régulateur de Cg-Foxl2os sur l'expression de Cg-Foxl2, ce qui induirait un développement mâle chez cette espèce protandre. Dans un deuxième temps, les expressions de Cg-Foxl2, Cg-Foxl2os, Cg- β -caténine, Cg-SoxE et Cg-DMI ont été mesurées en qPCR à quatre températures différentes, dont 18°C, chez du naissain nourri de façon constante et optimale [1500 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ d'un mix 50/50 d'*Isochrysis affinis galbana* (T) / *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* (Cg)]. Cette étude a permis de préciser que Cg-Foxl2 et Cg-Foxl2os intervenaient probablement en amont des autres gènes dans la cascade moléculaire chez le naissain et qu'ils seraient respectivement associés à un développement femelle et mâle. La Cg- β -caténine serait impliquée, comme chez l'adulte, dans la différenciation gonadique des femelles et Cg-SoxE

et Cg-DMI dans celle des mâles. Un modèle de cascade du déterminisme sexuel et de la première différenciation gonadique peut ainsi être proposé pour l'huître à 18°C dans ces conditions spécifiques de nutrition (Figure 46). Le déterminisme sexuel interviendrait chez le naissain entre 40 et 44 jpf, au moment du pic d'expression d'Oyvlg mais avant le début de la différenciation gonadique marquée par l'apparition des premiers canaux collecteurs aux environs de 49 jpf. Chez les futurs mâles, comme chez l'adulte, l'expression de Cg-Foxl2os pourrait inhiber celle de Cg-Foxl2 et induire une augmentation des expressions des facteurs mâles Cg-DMI et Cg-SoxE. Chez les femelles l'augmentation de l'expression de Cg-Foxl2 pourrait induire une augmentation de celle des autres facteurs de la voie femelle comme la Cg- β -caténine.

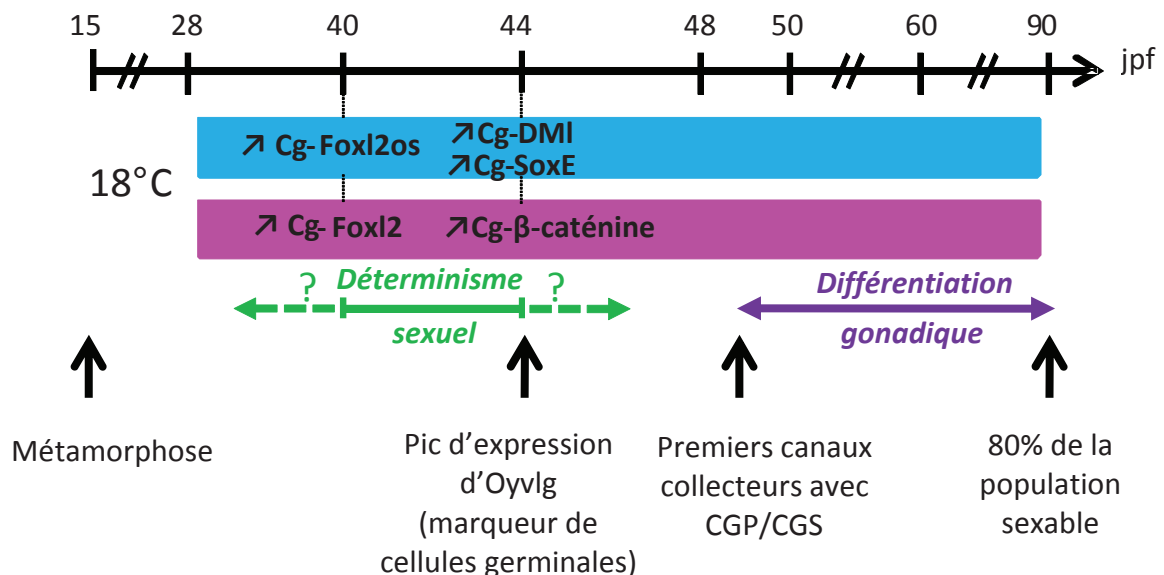


Figure 46 : Schéma de cascade du déterminisme sexuel lors de la première différenciation gonadique chez le naissain élevé à 18°C dans des conditions optimales de nourriture.

CGP : cellules germinales primordiales ; CGS : cellules germinales souches.

2. Comment valider ce modèle ?

Comme pour l'adulte, ce modèle pourrait être validé en appréhendant la fonction physiologique de chaque facteur de la cascade en étudiant, par exemple, leurs expressions protéiques à l'aide d'anticorps et celle de leurs ARNm en hybridation *in toto*.

Les travaux initiés à propos de la première mise en place gonadique devraient aussi être poursuivis afin de préciser, pour des conditions de température et de nourriture données, la cinétique et les événements cellulaires associés à ce mécanisme. Cela s'avère indispensable

pour enrichir les données très fragmentaires actuellement disponibles à ce sujet mais aussi pour favoriser la compréhension du déterminisme sexuel. En effet, caractériser et dénombrer les cellules germinales primordiales chez l'huître serait pertinent si l'on considère que le futur sexe pourrait être orienté par le nombre de cellules germinales, comme c'est le cas chez le médaka (KUROKAWA *et al.* 2007) et le poisson zèbre (WEIDINGER *et al.* 2003).

III. Comment le déterminisme sexuel est-il régulé chez l'huître?

1. Quels facteurs environnementaux interviennent ?

Bien que les observations sur le terrain laissent supposer une influence environnementale sur le déterminisme sexuel de l'huître adulte, rien n'était connu à ce sujet chez le naissain. L'un des objectifs de cette thèse a donc été de mieux comprendre l'influence d'un facteur environnemental, la température, sur ces mécanismes physiologiques lors du développement de l'huître. Les conditionnements réalisés à des températures de 18 et 22°C induisaient un sexe-ratio en faveur des femelles alors que des températures de 25 et 28°C étaient en faveur des mâles. De plus, les profils d'expressions des facteurs connus de la cascade du déterminisme sexuel chez l'huître étaient en accord avec ces sexe-ratios. Le déterminisme sexuel de l'huître serait donc non seulement génétique, mais également température-dépendant. Ce travail a également mis en évidence la difficulté d'étudier l'influence de facteurs environnementaux sur le déterminisme sexuel de l'huître. Ceci est dû, d'une part au fait qu'il est difficile de découpler l'effet de la température de celui de la disponibilité en nourriture. D'autre part, les animaux présentent souvent des origines génétiques différentes qui doivent être prises en compte chez un animal à déterminisme sexuel génétique. L'idéal serait donc d'étudier le déterminisme sexuel sur une population génétiquement définie et de faire alors varier divers paramètres environnementaux en parallèle.

En ce qui concerne l'effet de la température sur la première mise en place gonadique, les résultats obtenus lors de cette thèse ont montré que des températures élevées accélèrent le développement du naissain, la mise en place de sa gonade et sa gamétogenèse, sans que les trois ne soient réellement corrélés dans le temps. Par exemple, les animaux les plus gros ne présentent pas forcément une différenciation gonadique et une

gamétogenèse plus avancées. Ces résultats ont également mis en évidence des perturbations et ralentissements de la gamétogenèse à partir de 25°C, sans pour autant empêcher qu'elle aboutisse. Les conditions très favorables de nourriture pourraient en partie expliquer ce fait. Une autre explication pourrait être liée à la grande capacité d'adaptation de l'huître à son environnement, illustrée d'ailleurs par son existence dans un milieu très variable (estran) et sa répartition très large, voire même parfois invasive.

Ces travaux pourraient être poursuivis chez le naissain et entrepris chez l'adulte, en testant l'effet d'autres facteurs environnementaux biotiques ou abiotiques sur les sexe-ratios mais aussi sur les expressions de facteurs du déterminisme sexuel. L'hypothèse selon laquelle des conditions environnementales favorables induiraient des femelles pourrait alors être testée, sachant que cela a déjà été mentionné pour des huîtres adultes à propos de la nourriture (LANGO REYNOSO 1999). Ainsi, des conditionnements avec des disponibilités variables en nourriture pourraient par exemple être entrepris. Des pratiques culturelles différentes pourraient aussi être testées. En effet, il a été observé sur un même parc que des animaux de même origine génétique élevés sur corde ou en cage présentaient un sexe-ratio différent, en faveur des femelles sur cordes et des mâles en cages (ANTONIO, communication personnelle). Enfin, la taille des animaux pourrait être susceptible de réguler le déterminisme sexuel de l'huître à l'instar, par exemple, de la crépidule, autre hermaphrodite protandre. En effet chez cette dernière, un individu mâle devient femelle lorsqu'il est le plus grand des individus de la chaîne de crépidules. Cependant, la taille au changement de sexe est également variable selon les conditions de nourriture (MEROT et COLLIN 2012b) et de stress lié à la dessiccation (CHARNOV 1982).

Enfin, chez l'adulte de *C. gigas*, avant même d'étudier l'influence d'un facteur environnemental sur le déterminisme sexuel, il serait nécessaire de disposer de populations "monosexes" comme c'est le cas chez les poissons. Cela étant actuellement impossible, une alternative pourrait être de considérer une population génétiquement identique, maintenue dans des conditions environnementales identiques pendant plusieurs cycles gamétogénétiques, afin de distinguer les trois groupes définis selon la théorie de HEDRICK et HEDGECOCK (2010), les animaux mâles qui le restent, les femelles qui le restent et ceux qui changent de sexe. Ces groupes pourraient alors servir pour l'étude des régulations environnementales du déterminisme sexuel.

2. Existe-il une influence hormonale ?

Chez la plupart des espèces présentant un TSD, la détermination du sexe impliquerait l'activation/l'inhibition de l'aromatase afin de permettre/empêcher la production d'oestrogènes féminisants. Ainsi, une augmentation de l'expression gonadique de l'aromatase est observée lors de la différenciation ovarienne chez les amphibiens (KUNTZ *et al.* 2003 ; URBATZKA *et al.* 2007), chez le poulet (SMITH *et al.* 1997) ou encore chez les poissons (GUIGUEN *et al.* 2010). Chez les reptiles, le niveau d'expression de l'aromatase est plus élevée pendant la période thermosensible lorsque l'incubation des oeufs s'effectue à température féminisante (LANCE 2009). Chez l'huître, l'existence d'une activité *aromatase-like* a été démontrée (LE CURIEUX-BELFOND *et al.* 2001), sans qu'aucune enzyme orthologue à Cyp19 ne soit retrouvée dans son génome (ZHANG *et al.* 2012). Cependant, un récepteur aux œstrogènes a été identifié chez *C. gigas* sans pour autant identifier son ligand naturel (LAFONT ET MATHIEU 2007 ; MATSUMOTO *et al.* 2007). Par ailleurs, l'influence d'un œstrogène synthétique, le 17 α -ethynylestradiol, sur le sexe-ratio de l'huître australienne *Saccostrea glomerata*, renforce la possibilité d'une influence hormonale sur la différenciation gonadique (ANDREW *et al.* 2010). En attendant de trouver quel facteur joue ce rôle chez l'huître, l'activité *aromatase-like* pourrait être mesurée chez des individus à divers stades du cycle gamétogénétique adulte afin de voir si elle intervient à la période du déterminisme sexuel et si elle peut être corrélée à la différenciation gonadique femelle et aux profils d'expressions des gènes du déterminisme sexuel. Moduler l'activité aromatase chez l'huître serait un outil intéressant pour contrôler le sexe de géniteurs en écloséries. L'analyse de l'expression du récepteur aux oestrogènes pourrait aussi être envisagée.

3. Quelles sont les régulations épigénétiques du sexe ?

Au cours de cette thèse, une régulation épigénétique a été mise en évidence pour la première fois dans la gonade d'un mollusque et concerne la régulation de l'expression de Cg-Foxl2 par son ARN anti-sens naturel. Cependant, ce n'est sûrement pas le seul mécanisme épigénétique susceptible de réguler le déterminisme sexuel et la différenciation gonadique de l'huître. Il a ainsi été montré chez les mammifères que des régulations épigénétiques impliquant des modifications d'histones et de la structure de la chromatine influençaient directement la régulation de l'expression de Sox9 lors de la différenciation des chondrocytes

(FURUMATSU et ASAHARA 2010). Chez le bar, NAVARRO-MARTIN et collaborateurs (2011) ont montré que Foxl2 ne pouvait pas activer le promoteur gonadique du gène de l'aromatase (Cyp19a) lorsque ce dernier est méthylé, ceci étant modulé par la température (NAVARRO-MARTIN *et al.* 2011). Ces mécanismes épigénétiques pourraient ainsi réguler le déterminisme sexuel chez les espèces présentant un déterminisme dépendant de l'environnement. Chez l'huître, une première étude reporte l'existence de méthylations de l'ADN dans les branchies (GAVERY et ROBERTS 2010) et des études menées au laboratoire ont récemment mis en évidence le rôle des facteurs Jumonji dans les modifications de la structure des histones ou les méthylations de l'ADN lors du développement et chez les adultes (FELLOUS, communication personnelle). Il serait intéressant de déterminer si des facteurs connus de la cascade du déterminisme sexuel de l'huître, comme par exemple Cg-SoxE, présentent, comme pour Sox9 chez les vertébrés, des méthylations à certains moments du cycle gamétogénétique adulte et lors du développement. L'expression des facteurs Jumonji pourrait aussi être mesurée en parallèle.

IV. Comment identifier d'autres facteurs impliqués dans le déterminisme sexuel chez l'huître ?

Ce travail de thèse a permis d'enrichir la cascade du déterminisme sexuel, mais de nombreux autres facteurs, conservés ou non au cours de l'évolution, restent encore à caractériser. La poursuite de l'analyse *in silico* des puces à ADN chez les huîtres diploïdes et triploïdes permettra ainsi de sélectionner certains de ces nouveaux acteurs d'après leurs profils d'expression. Les séquences complètes des facteurs Cg-Dax-1 et Cg-SoxB1 sont maintenant disponibles et leur étude pourra être poursuivie. Des approches en cartographie génotypique pourraient également permettre de mettre d'autres acteurs en évidence, notamment le gène majeur. Il est actuellement difficile de l'identifier uniquement par comparaison avec d'autres espèces car (i) il n'a été mentionné que chez peu d'entre elles (mammifères, xénope, poulet, *Oryzias latipes* et *O. luzonensis*, la truite et le pejerrey *Odontesthes bonariensis*), (ii) il n'est pas toujours conservé dans les divers phyla et (iii) il est en général associé aux chromosomes sexuels dont est dépourvue l'huître. Enfin, le génome de *C. gigas* récemment publié (ZHANG *et al.* 2012) ainsi que celui de l'huître perlière *Pinctada fucata* (TAKEUCHI *et al.* 2012) sont également des outils précieux. Ainsi, en ce qui concerne les

acteurs de la voie mâle, l'huître semble dépourvue de facteurs de la famille de Fgf9, de Wt1 et Sf1, suggérant que l'activation du gène majeur ne passe pas par une voie similaire à celle activant Sry comme chez les mammifères. Concernant la famille de facteurs DM, contrairement à ce qui avait été supposé par NAIMI et collaborateurs (2009a), elle serait constituée de trois facteurs chez l'huître. Le premier Cg-DMI, déjà caractérisé par NAIMI et collaborateurs (2009a) s'apparente plutôt aux Dmrt5 des huîtres du genre *Pinctada*, à Cf-Dmrt4-like du clam *Chlamys farreri*, à Dmrt5 des vertébrés ou encore à DM99 de la daphnie et de la drosophile. Chez *P. martensii* et *C. Farreri*, l'expression de l'orthologue est supérieure dans les gonades mâles comparées aux femelles ou retrouvée uniquement dans le testicule (YU *et al.* 2009 ; FENG *et al.* 2010). Le second facteur de la famille DM retrouvé dans le génome de *C. gigas* a été annoté Dmrt2. Il semble plus apparenté à Dmrt3 de *P. fucata*, DmrtA2 des poissons *Danio rerio* et *Oreochromis niloticus* ou encore à DM93B de la daphnie. Chez le tilapia, DmrtA2, localisé sur un QTL lié au déterminisme sexuel, serait un des facteurs régulateurs clés de ce mécanisme (SHIRAK *et al.* 2006). Chez la daphnie, DM93B présente une expression uniquement dans le testicule adulte (KATO *et al.* 2008). Le troisième facteur à domaine DM présent chez l'huître a été annoté Dsx car il est apparenté au facteur Double-sex de plusieurs espèces d'insectes, l'effecteur principal de la cascade du déterminisme mâle (SHUKLA et NAGARAJU 2010). Ainsi, l'étude plus approfondie des deux derniers facteurs à domaine DM présents chez l'huître perlière comme chez l'huître creuse serait pertinente.

Concernant la voie femelle, un facteur appartenant à la famille R-spondine a été identifié chez l'huître. Il semble proche phylogénétiquement de la R-spondine 3 des vertébrés. Bien moins connue que la R-spondine 1, la R-spondine 3 activerait la voie Wnt/ β -caténine notamment lors des processus de vascularisation au cours du développement chez les mammifères ou chez le xénope *Xenopus tropicalis* (KAZANSKAYA *et al.* 2008). Ce facteur étant unique chez l'huître, il aurait probablement une fonction plus large que chez les vertébrés. Il serait donc un candidat intéressant à étudier pour la compréhension du déterminisme sexuel de l'huître, d'autant plus qu'il présente, en puce à ADN chez les huîtres diploïdes, un pic d'expression en stade 0 du cycle gamétogénétique.

Chez l'huître, l'émergence, ces dernières années, d'analyses transcriptomiques à grande échelle associée à la parution récente de son génome ont ouvert de nombreuses

pistes d'études, notamment concernant le déterminisme sexuel. Cependant beaucoup de travail reste à faire notamment pour associer une fonction physiologique à chacun des gènes identifiés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

AKIYAMA H., LYONS J. P., MORI-AKIYAMA Y., YANG X., ZHANG R., ZHANG Z., DENG J. M., TAKETO M. M., NAKAMURA T., BEHRINGER R. R., MCCREA P. D., CROMBRUGGHE B. DE, 2004 Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* **18**: 1072–1087.

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.

ALLEN JR S. K., HIDU H., STANLEY J. G., 1986 Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* **170**: 198–210.

ANDREW M. N., O'CONNOR W. A., DUNSTAN R. H., MACFARLANE G. R., 2010 Exposure to 17 α -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. *Ecotoxicology* **19**: 1440–1451.

ARANGO N. A., LOVELL-BADGE R., BEHRINGER R. R., 1999 Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* **99**: 409–419.

B

BAROILLER J. F., D'COTTA H., 2001 Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol.* **130**: 399–409.

BAROILLER J. F., D'COTTA H., SAILLANT E., 2009 Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sex. Dev.* **3**: 118–135.

BARRIONUEVO F., SCHERER G., 2010 SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell. B.* **42**: 433–436.

BEITER T., REICH E., WILLIAMS R. W., SIMON P., 2009 Antisense transcription: a critical look in both directions. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 94–112.

BERGERON J. M., GAHR M., HORAN K., WIBBELS T., CREWS D., 1998 Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Growth Differ.* **40**: 243–254.

BERNARD I., 2011 Écologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : vers une explication de la variabilité du captage. Thèse de l'Université de La Rochelle, 196 p.

BERNARD I., KERMOYSAN G. DE, POUVREAU S., 2011 Effect of phytoplankton and temperature on the reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Investigation through DEB theory. *J. Sea Res.* **66**: 349–360.

BERNARD P., HARLEY V. R., 2007 Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 31–43.

BERNARD P., RYAN J., SIM H., CZECH D. P., SINCLAIR A. H., KOOPMAN P., HARLEY V. R., 2012 Wnt Signaling in Ovarian Development Inhibits Sf1 Activation of Sox9 via the Tesco Enhancer. *Endocrinology* **153**: 901–912.

BIENZ M., 2005 beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* **15**: R64–67.

BIENZ M., CLEVERS H., 2003 Armadillo/ β -catenin signals in the nucleus – proof beyond a reasonable doubt? *Nat. Cell. Biol.* **5**: 179–182.

BOUMA G. J., ALBRECHT K. H., WASHBURN L. L., RECKNAGEL A. K., CHURCHILL G. A., EICHER E. M., 2005 Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development* **132**: 3045–3054.

BOWLES J., SCHEPERS G., KOOPMAN P., 2000 Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* **227**: 239–255.

BRAKE J., DAVIDSON J., DAVIS J., 2004 Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture* **236**: 179–191.

BRENNECKE J., COHEN S. M., 2003 Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes. *Genome Biol.* **4**.

BRETON S., BEAUPRÉ H. D., STEWART D. T., HOEH W. R., BLIER P. U., 2007 The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends Genet.* **23**: 465–474.

BRETON S., STEWART D. T., BLIER P. U., 2009 Role-reversal of gender-associated mitochondrial DNA affects mitochondrial function in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *J Exp Zool Part B : Mol. Dev. Evol.* **312**: 108–117.

BRETON S., STEWART D. T., HOEH W. R., 2010 Characterization of a mitochondrial ORF from the gender-associated mtDNAs of *Mytilus spp.*(Bivalvia: Mytilidae): Identification of the the "missing" ATPase 8 gene. *Mar. Genomics* **3**: 11–18.

C

CASTILLO A. F., FAN J., PAPADOPOULOS V., PODESTÁ E. J., 2011 Hormone-Dependent Expression of a Steroidogenic Acute Regulatory Protein Natural Antisense Transcript in MA-10 Mouse Tumor Leydig Cells. *PLoS One* **6**.

- CHABOISSIER M.-C., KOBAYASHI A., VIDAL V. I. P., LÜTZKENDORF S., KANT H. J. G. van de, WEGNER M., ROOIJ D. G. de, BEHRINGER R. R., SCHEDL A., 2004 Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* **131**: 1891–1901.
- CHANG H., GAO F., GUILLOU F., TAKETO M. M., HUFF V., BEHRINGER R. R., 2008 Wt1 Negatively Regulates B-Catenin Signaling During Testis Development. *Development* **135**: 1875–1885.
- CHANG H., GUILLOU F., TAKETO M. M., BEHRINGER R. R., 2009 Overactive Beta-Catenin Signaling Causes Testicular Sertoli Cell Tumor Development in the Mouse. *Biol.Reprod.* **81**: 842–849.
- CHANG Y.-F., LEE-CHANG J. S., HARRIS K. Y., SINHA-HIKIM A. P., RAO M. K., 2011 Role of β -Catenin in Post-Meiotic Male Germ Cell Differentiation. *PLoS One* **6**.
- CHARNOV E. L., 1982 *The Theory of Sex Allocation.(MPB-18)*. Princeton University Press. 355 p.
- CHASSOT A.-A., GREGOIRE E. P., LAVERY R., TAKETO M. M., ROOIJ D. G. DE, ADAMS I. R., CHABOISSIER M.-C., 2011 RSPO1/ β -Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary. *PLoS One* **6**.
- CHASSOT A.-A., RANC F., GREGOIRE E. P., ROEPERS-GAJADIEN H. L., TAKETO M. M., CAMERINO G., ROOIJ D. G. DE, SCHEDL A., CHABOISSIER M.-C., 2008 Activation of β -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 1264–1277.
- CHÁVEZ-VILLALBA J., POMMIER J., ANDRIAMISEZA J., POUVREAU S., BARRET J., COCHARD J. C., PENNEC M. LE, 2002 Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* **214**: 115–130.
- CHÁVEZ-VILLALBA J., HERNÁNDEZ-IBARRA A., LÓPEZ-TAPIA M. R., MAZÓN-SUÁSTEGUI J. M., 2008 Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from northwestern Mexico: Growth, gametogenic activity, and condition index. *J. Shellfish Res.* **27**: 711–720.
- CHÁVEZ-VILLALBA J., SOYEZ C., HUVET A., GUEGUEN Y., LO C., MOULLAC G. L., 2011 Determination of Gender in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *J. Shellfish Res.* **30**: 231–240.
- CHEN P., ELLIS R. E., 2000 TRA-1A regulates transcription of fog-3, which controls germ cell fate in *C. elegans*. *Development* **127**: 3119–3129.
- CHUE J., SMITH C. A., 2011 Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS Journal* **278**: 1027–1034.
- CLINE T. W., 1988 Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of several discrete “numerator elements” of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch Sxl between two alternative stable expression states. *Genetics* **119**: 829–862.
- COCQUET J., PANNETIER M., FELLOUS M., VEITIA R. A., 2005 Sense and antisense Foxl2 transcripts in mouse. *Genomics* **85**: 531–541.
- COLVIN J. S., GREEN R. P., SCHMAHL J., CAPEL B., ORNITZ D. M., 2001 Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9. *Cell* **104**: 875–889.

COSTA F. F., 2005 Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology. *Gene* **357**: 83–94.

CURIEUX-BELFOND O. LE, MOSLEMI S., MATHIEU M., SÉRALINI G. ., 2001 Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 β -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **78**: 359–366.

D

DAVISON A., 2006 The ovotestis: an underdeveloped organ of evolution. *BioEssays* **28**: 642–650.

DEGREMONT L., 2003 Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen Basse-Normandie. 334 p.

DEVLIN R. H., NAGAHAMA Y., 2002 Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**: 191–364.

DHEILLY N. M., LELONG C., HUVET A., KELLNER K., DUBOS M.-P., RIVIÈRE G., BOUDRY P., FAVREL P., 2012 Gametogenesis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* : a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One* **7**.

DUMOND H., AL-ASAAD I., CHESNEL A., CHARDARD D., BOIZET-BONHOURE B., FLAMENT S., KUNTZ S., 2011 Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool. Part B: Mol. Dev. Evol.* **316B**: 199–211.

DUTERTRE M., BENINGER P. G., BARILLÉ L., PAPIN M., ROSA P., BARILLÉ A.-L., HAURE J., 2009 Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquat. Living Resour.* **22**: 319–329.

E

EGGERS S., SINCLAIR A., 2012 Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res.* **20**: 215–238.

EGGERT C., 2004 Sex determination: the amphibian models. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**: 539–549.

EL JAMIL A., KANHOUSH R., MAGRE S., BOIZET-BONHOURE B., PENRAD-MOBAYED M., 2008 Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev. Dyn.* **237**: 2996–3005.

ENRÍQUEZ-DÍAZ M., POUVREAU S., CHÁVEZ-VILLALBA J., PENNEC M. LE, 2009 Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* **17**: 491–506.

EZAZ T., QUINN A. E., MIURA I., SARRE S. D., GEORGES A., MARSHALL GRAVES J. A., 2005 The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Res.* **13**: 763–776.

EZAZ T., VALENZUELA N., GRÜTZNER F., MIURA I., GEORGES A., BURKE R., MARSHALL GRAVES J., 2006 An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosome Res.* **14**: 139–150.

F

FABIOUX C., 2004 Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Thèse de l'université de Bretagne Occidentale. 199 p.

FABIOUX C., POUVREAU S., ROUX F. L., 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. ., MINGUANT C., PENNEC M. LE, 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., SOUCHU P. LE, PENNEC M. LE, POUVREAU S., 2005 Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* **250**: 458–470.

FABIOUX C., CORPOREAU C., QUILLIEN V., FAVREL P., HUVET A., 2009 In vivo RNA interference in oyster--vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS J.* **276**: 2566–2573.

FAN H.-Y., O'CONNOR A., SHITANAKA M., SHIMADA M., LIU Z., RICHARDS J. S., 2010 B-Catenin (CTNNB1) Promotes Preovulatory Follicular Development but Represses LH-Mediated Ovulation and Luteinization. *Mol. Endocrinol.* **24**: 1529–1542.

FENG Z., SHAO M., SUN D., ZHANG Z., 2010 Cloning, characterization and expression analysis of Cf-dmrt4-like gene in *Chlamys farreri*. *JFSC* **5**: 8.

FERGUSON-SMITH M., 2007 The Evolution of Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates and the Key Role of *DMRT1*. *Sex. Dev.* **1**: 2–11.

FLEURY E., HUVET A., LELONG C., LORGERIL J. DE, BOULO V., GUEGUEN Y., BACHÈRE E., TANGUY A., MORAGA D., FABIOUX C., OTHERS, 2009 Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC genomics* **10**: 341.

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**: 251–260.

FRANCO A., KELLNER K., GOUX D., MATHIEU M., HEUDE BERTHELIN C., 2011a Intronodal Somatic Cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: Morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron* **42**: 718–725.

FRANCO A., KELLNER K., MATHIEU M., LELONG C., GOUX D., BERTHELIN C. H., 2011b Male germ cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: flow cytometry analysis, cell sorting and molecular expression. *Aquat. Living Res.* **24**: 237–245.

FURUMATSU T., ASAHARA H., 2010 Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med Okayama* **64**: 351–7.

G

GALTSOFF P., 1964 The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **64**: 11–28.

GAMBLE T., ZARKOWER D., 2012 Sex determination. *Curr. Biol.* **22**: R257–R262.

GARCIA-ORTIZ J. E., PELOSI E., OMARI S., NEDOREZOV T., PIAO Y., KARMAZIN J., UDA M., CAO A., COLE S. W., FORABOSCO A., SCHLESSINGER D., OTTOLENGHI C., 2009 Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev. Biol.* **9**: 36.

GASCA S., CAÑIZARES J., SANTA BARBARA P. DE, MÉJEAN C., POULAT F., BERTA P., BOIZET-BONHOURE B., 2002 A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *PNAS* **99**: 11199–11204.

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

GEORGES A., EZAZ T., QUINN A. E., SARRE S. D., 2010 Are Reptiles Predisposed to Temperature-Dependent Sex Determination? *Sex.Dev.* **4**: 7–15.

GHISELIN M. T., 1969 The evolution of hermaphroditism among animals. *Q Rev. Biol.*: **44**: 189–208.

GRAHAM D. H., HOLMES J. L., BLACK W. C., 2004 Identification of quantitative trait loci affecting sex determination in the eastern treehole mosquito (*Ochlerotatus triseriatus*). *J. Hered.* **95**: 35–45.

GRIFFITHS A. J., MILLER J. H., SUZUKI D. T., LEWONTIN R. C., GELBART W., 2000 An Introduction to Genetic Analysis . 7th edition. Drosophila sex determination: every cell for itself. New York: W. H. Freeman.

GRIZEL H., 1985 Etude des récentes épizooties de l’huitres plate *Ostrea edulis* Linne et de leur impact sur l’ostréiculture bretonne. Thèse de l’université de Montpellier. 153 p.

- GRIZEL H., HERAL M., 1991 Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES J. Mar. Sci.* **47**: 399–403.
- 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.
- GUIGUEN Y., FOSTIER A., PIFERRER F., CHANG C.-F., 2010 Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**: 352–366.
- GUMBINER B. M., 2005 Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 622–634.
- GUO X., ALLEN-JR S. K., 1994 Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics* **138**: 1199–1206.
- GUO X., ALLEN JR. S. K., 1997 Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome* **40**: 397–405.
- 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 X., LI Q., WANG Q. Z., KONG L. F., 2012 Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. *Mar. Biotechnol.* **14**: 218–226.

H

- HAAG E., 2005 The evolution of nematode sex determination: *C. elegans* as a reference point for comparative biology. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community.
- HALEY L. E., 1977 Sex determination in the American oyster. *J. Hered.* **68**: 114–116.
- HALEY L. E., 1979 Oyster breeding: an analysis of selection, strain crossing and electrophoretic variability. *Proceedings*. 13 p.
- HARLOS J., BRUST R. A., GALLOWAY T. D., 1980 Observations on a nematode parasite of *Aedes vexans* (Diptera:Culicidae) in Manitoba. *Can. J. Zool.* **58**: 215–220.
- HATTORI R. S., MURAI Y., OURA M., MASUDA S., MAJHI S. K., SAKAMOTO T., FERNANDINO J. I., SOMOZA G. M., YOKOTA M., STRÜSSMANN C. A., 2012 A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 2955–2959.
- 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 schlegeli*. *Cytogenet. Genome Res.* **101**: 309–313.

- HEDRICK P. W., HEDGECOCK D., 2010 Sex determination: genetic models for oysters. *J. Hered.* **101**: 602–611.
- HEIKKILÄ M., PRUNSKAITE R., NAILLAT F., ITÄRANTA P., VUORISTO J., LEPPÄLUOTO J., PELTOKETO H., VAINIO S., 2005 The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* **146**: 4016–4023.
- HEIMPEL G. E., BOER J. G. DE, 2008 Sex determination in the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **53**: 209–230.
- HELLER J., 1993 Hermaphroditism in molluscs. *Biol. J. Linn. Soc.* **48**: 19–42.
- HELLOU J., LAW R. J., 2003 Stress on stress response of wild mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health. *Environ. Pollut.* **126**: 407–416.
- HENRY J. Q., PERRY K. J., MARTINDALE M. Q., 2010 β -catenin and early development in the gastropod, *Crepidula fornicata*. *Integr. Comp. Biol.* **50**: 707–719.
- HERPIN A., SCHARTL M., 2011 Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J.* **278**: 1010–1019.
- HEUDE-BERTHELIN C., LAISNEY J., ESPINOSA J., MARTIN O., HERNANDEZ G., MATHIEU M., KELLNER K., 2001 Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebr. Repr. Dev.* **40**: 79–86.
- HOAGLAND K. E., 1978 Protandry and the evolution of environmentally mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia* **17**: 365–391.
- HOLMEN S. L., SALIC A., ZYLSTRA C. R., KIRSCHNER M. W., WILLIAMS B. O., 2002 A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate β -catenin-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 34727–34735.
- HOLTER E., KOTAJA N., MÄKELÄ S., STRAUSS L., KIETZ S., JÄNNE O. A., GUSTAFSSON J. AA, PALVIMO J. J., TREUTER E., 2002 Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol. Endocrinol.* **16**: 515–528.
- HOSHI H., NAKAO A., 2008 Molecular cloning of full-length Dmrt1 cDNA of Reeves turtle (*Chinemys reevesii*). *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 687–692.
- HU W., LI S., TANG B., WANG Y., LIN H., LIU X., ZOU J., ZHU Z., 2007 Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal development in transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* **271**: 498–506.
- HUANG X., GUO Y., SHUI Y., GAO S., YU H., CHENG H., ZHOU R., 2005 Multiple Alternative Splicing and Differential Expression of dmrt1 During Gonad Transformation of the Rice Field Eel. *Biol. Reprod.* **73**: 1017–1024.

HUDSON Q. J., SMITH C. A., SINCLAIR A. H., 2005 Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev. Dyn.* **233**: 1052–1055.

HULIN V., DELMAS V., GIRONDOT M., GODFREY M., GUILLON J.-M., 2009 Temperature-dependent sex determination and global change: are some species at greater risk? *Oecologia* **160**: 493–506.

I

IJIRI S., KANEKO H., KOBAYASHI T., WANG D.-S., SAKAI F., PAUL-PRASANTH B., NAKAMURA M., NAGAHAMA Y., 2008 Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* **78**: 333–341.

IKEDA Y., TAKEDA Y., SHIKAYAMA T., MUKAI T., HISANO S., MOROHASHI K.-I., 2001 Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev. Dyn.* **220**: 363–376.

INAMDAR-DODDAMANI L. S., V. V., SESHAGIRI P. B., 2012 A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool. A: Ecol. Genet. Physiol.* **317A**: 32–46.

J

JÄÄSKELÄINEN M., PRUNSKAITE-HYYRYLÄINEN R., NAILLAT F., PARVIAINEN H., ANTTONEN M., HEIKINHEIMO M., LIAKKA A., OLA R., VAINIO S., VASKIVUO T. E., OTHERS, 2010 WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol. cell. endocrinol.* **317**: 106–111.

JAKOB S., 2010 FOXL2 represses the testis-specific enhancer of Sox9 to maintain ovary differentiation. Thèse de l'université de Londres. 208 p.

JAKOB S., LOVELL-BADGE R., 2011 Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS J.* **278**: 1002–1009.

JANOWSKI B. A., YOUNGER S. T., HARDY D. B., RAM R., HUFFMAN K. E., COREY D. R., 2007 Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat. Chem. Biol* **3**: 166–173.

JEONG H.-B., PARK J.-G., PARK Y.-J., TAKEMURA A., HUR S.-P., LEE Y.-D., KIM S.-J., 2009 Isolation and characterization of DMRT1 and its putative regulatory region in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Gene* **438**: 8–16.

JORDAN B. K., SHEN J. H.-C., OLASO R., INGRAHAM H. A., VILAIN E., 2003 Wnt4 Overexpression Disrupts Normal Testicular Vasculature and Inhibits Testosterone Synthesis by Repressing Steroidogenic Factor 1/B-Catenin Synergy. *PNAS* **100**: 10866–10871.

JOUAUX A., HEUDE-BERTHELIN C., SOURDAINE P., MATHIEU M., KELLNER K., 2010 Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **395**: 162–170.

K

KASHIMADA K., PELOSI E., CHEN H., SCHLESSINGER D., WILHELM D., KOOPMAN P., 2011 FOXL2 and BMP2 Act Cooperatively to Regulate Follistatin Gene Expression during Ovarian Development. *Endocrinology* **152**: 272–280.

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.

KATO Y., KOBAYASHI K., WATANABE H., IGUCHI T., 2011 Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-Determining Pathway. *PLoS Genet* **7**.

KATO M., KATO M., 2007 WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clin. Cancer Res.* **13**: 4042–4045.

KAZANSKAYA O., OHKAWARA B., HEROULT M., WU W., MALTRY N., AUGUSTIN H. G., NIEHRS C., 2008 The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* **135**: 3655–3664.

KELLEY C., BLUMBERG H., ZON L. I., EVANS T., 1993 GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* **118**: 817–827.

KENT J., WHEATLEY S. C., ANDREWS J. E., SINCLAIR A. H., KOOPMAN P., 1996 A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* **122**: 2813–2822.

KETTLEWELL J. R., RAYMOND C. S., ZARKOWER D., 2000 Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis* **26**: 174–178.

KIM K.-A., WAGLE M., TRAN K., ZHAN X., DIXON M. A., LIU S., GROS D., KORVER W., YONKOVICH S., TOMASEVIC N., BINNERTS M., ABO A., 2008 R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol. Biol. Cell* **19**: 2588–2596.

KIM Y., KOBAYASHI A., SEKIDO R., DINAPOLI L., BRENNAN J., CHABOISSIER M.-C., POULAT F., BEHRINGER R. R., LOVELL-BADGE R., CAPEL B., 2006 Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biol* **4**.

- KISS T., 2002 Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**: 145–148.
- KIYOMOTO M., KOMARU A., SCARPA J., WADA K. T., DANTON E., AWAJI M., 1996 Abnormal Gametogenesis, Male Dominant Sex Ratio, and Sertoli Cell Morphology in Induced Triploid Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Zoo. sci.* **13**: 393–402.
- KOBAYASHI Y., Horiguchi R., NOZU R., NAKAMURA M., 2010 Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (Foxl2) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Biol. sex. dif.* **1**: 3.
- KOBAYASHI T., NAGAHAMA Y., 2009 Molecular Aspects of Gonadal Differentiation in a Teleost Fish, the Nile Tilapia. *Sex. Dev.* **3**: 108–117.
- KOOPMAN P., GUBBAY J., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R., 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**: 117–121.
- KORPELAINEN H., 1990 Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol. Rev.* **65**: 147–184.
- KUNTZ S., CHESNEL A., DUTERQUE-COQUILAUD M., GRILLIER-VUISOZ I., CALLIER M., DOURNON C., FLAMENT S., CHARDARD D., 2003 Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **84**: 89–100.
- KUROKAWA H., SAITO D., NAKAMURA S., KATOH-FUKUI Y., OHTA K., BABA T., MOROHASHI K., TANAKA M., 2007 Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *PNAS* **104**: 16958–16963.

L

- LANGO REYNOSO F., 1999 Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale. 139 p.
- LAFONT R., MATHIEU M., 2007 Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* **16**: 109–130.
- LANCE V. A., 2009 Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **311**: 314–322.
- LAPOINTE E., BOERBOOM D., 2011 WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci* **3**: 276–285.
- LEHNER B., WILLIAMS G., CAMPBELL R. D., SANDERSON C. M., 2002 Antisense transcripts in the human genome. *Trends Genet.* **18**: 63–65.

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**: 466–475.

LI J., CHEN W., WANG D., ZHOU L., SAKAI F., GUAN G., NAGAHAMA Y., 2012 GATA4 is involved in the gonadal development and maturation of the teleost fish tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Reprod. Dev.* **58**: 237–242.

LIARTE S., CHAVES-POZO E., GARCÍA-ALCAZAR A., MULERO V., MESEGUER J., GARCÍA-AYALA A., 2007 Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in DMRT1 gene expression and by massive leukocyte infiltration. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **5**: 20.

LIEW W. C., BARTFAI R., LIM Z., SREENIVASAN R., SIEGFRIED K. R., ORBAN L., 2012 Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS one* **7**.

LIU C.-F., BINGHAM N., PARKER K., YAO H. H.-C., 2009 Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum. Mol. Genet.* **18**: 405–417.

LOUKOVITIS D., SARROPOULOU E., TSIGENOPOULOS C. S., BATARGIAS C., MAGOULAS A., APOSTOLIDIS A. P., CHATZIPLIS D., KOTOULAS G., 2011 Quantitative trait loci involved in sex determination and body growth in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) through targeted genome scan. *PloS one* **6**.

LUBET P., 1976 Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliotis* **7**: 49–55.

LUBET P., HERLIN-HOUTTEVILLE P., MATTHIEU M., 1976 La lignée germinale des mollusques pélécytopodes. Origine et évolution. *Bull. Soc. Zool. France* **101**: 22–27.

LUDBROOK L. M., HARLEY V. R., 2004 Sex determination: a “window” of DAX1 activity. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**: 116–121.

LUO Y.-S., HU W., LIU X.-C., LIN H.-R., ZHU Z.-Y., 2010 Molecular cloning and mRNA expression pattern of Sox9 during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* **306**: 322–328.

M

MAATOUK D. M., DINAPOLI L., ALVERS A., PARKER K. L., TAKETO M. M., CAPEL B., 2008 Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 2949–2955.

MANN R., 1979 Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *JMBA* **59**: 95–110.

- MANOLAKOU P., LAVRANOS G., 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.
- MARCHAND O., GOVOROUN M., D'COTTA H., McMEEL O., LAREYRE J.-J., BERNOT A., LAUDET V., GUIGUEN Y., 2000 DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gene Struct. Expr.* **1493**: 180–187.
- MASUYAMA H., YAMADA M., KAMEI Y., FUJIWARA-ISHIKAWA T., TODO T., NAGAHAMA Y., MATSUDA M., 2012 Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res.* **20**: 163–176.
- MATSON C. K., MURPHY M. W., SARVER A. L., GRISWOLD M. D., BARDWELL V. J., ZARKOWER D., 2011 DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* **476**: 101–104.
- MATSON C. K., ZARKOWER D., 2012 Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nature Rev. Genet.* **13**: 163–174.
- MATSUDA M., SHINOMIYA A., KINOSHITA M., SUZUKI A., KOBAYASHI T., PAUL-PRASANTH B., LAU E., HAMAGUCHI S., SAKAIZUMI M., NAGAHAMA Y., 2007 DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *PNAS* **104**: 3865–3870.
- MATSUMOTO T., NAKAMURA A. M., MORI K., AKIYAMA I., HIROSE H., TAKAHASHI Y., 2007 Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen. Comp. Endocrinol.* **151**: 195–201.
- MATSUMOTO Y., CREWS D., 2012 Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **354**: 103–110.
- McIVER S. C., ROMAN S. D., NIXON B., McLAUGHLIN E. A., 2012 miRNA and mammalian male germ cells. *Hum. Reprod. Update* **18**: 44–59.
- MÉROT C., COLLIN R., 2012a Effects of food availability on sex change in two species of *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **449**: 173–181.
- MÉROT C., COLLIN R., 2012b Effects of stress on sex change in *Crepidula cf. marginalis* (Gastropoda: Calyptraeidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **416-417**: 68–71.
- MITCHESON Y. S. DE, LIU M., 2008 Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries* **9**: 1–43.
- MIYAGI S., KATO H., OKUDA A., 2009 Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 3675–3684.

MIYAMOTO Y., TANIGUCHI H., HAMEL F., SILVERSIDES D., VIGER R., 2008 A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC mol. biol.* **9**: 44.

MODI W. S., CREWS D., 2005 Sex chromosomes and sex determination in reptiles: commentary. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 660–665.

MONIOT B., DECLOSMENIL F., BARRIONUEVO F., SCHERER G., ARITAKE K., MALKI S., MARZI L., COHEN-SOLAL A., GEORG I., KLATTIG J., ENGLERT C., KIM Y., CAPEL B., EGUCHI N., URADE Y., BOIZET-BONHOURE B., POULAT F., 2009 The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* **136**: 1813–1821.

MUNDAY P. L., BUSTON P. M., WARNER R. R., 2006 Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 89–95.

MYOSHO T., OTAKE H., MASUYAMA H., MATSUDA M., KUROKI Y., FUJIYAMA A., NARUSE K., HAMAGUCHI S., SAKAIZUMI M., 2012 Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* **191**: 163–170.

N

NACHTIGAL M. W., HIROKAWA Y., ENYEART-VANHOUTEN D. L., FLANAGAN J. N., HAMMER G. D., INGRAHAM H. A., 1998 Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**: 445–454.

NAIMI A., 2009 Le déterminisme du sexe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours de son développement et du cycle gamétogénétique adulte : recherche de déterminants moléculaires. Thèse de l'université de Caen Basse-Normandie. 190 p.

NAIMI A., MARTINEZ A.-S., SPECQ M.-L., MRAC A., DISS B., MATHIEU M., SOURDAINE P., 2009a Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **152**: 189–196.

NAIMI A., MARTINEZ A.-S., SPECQ M.-L., DISS B., MATHIEU M., SOURDAINE P., 2009b Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **154**: 134–142.

NAKAMOTO M., SUZUKI A., MATSUDA M., NAGAHAMA Y., SHIBATA N., 2005 Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**: 729–736.

NAKAMOTO M., MATSUDA M., WANG D.-S., NAGAHAMA Y., SHIBATA N., 2006 Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**: 353–361.

NAKAMOTO M., WANG D.-S., SUZUKI A., MATSUDA M., NAGAHAMA Y., SHIBATA N., 2007 Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **74**: 1239–1246.

NAKAMURA M., 2009 Sex determination in amphibians. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 271–282.

NAM J.-S., TURCOTTE T. J., SMITH P. F., CHOI S., YOON J. K., 2006 Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**: 13247–13257.

NANDA S., DEFALCO T. J., HUI YONG LOH S., PHOCHANUKUL N., CAMARA N., DOREN M. VAN, RUSSELL S., 2009 Sox100B, a Drosophila Group E Sox-domain Gene, Is Required for Somatic Testis Differentiation. *Sex. Dev.* **3**: 26–37.

NANDA I., ZEND-AJUSCH E., SHAN Z., GRÜTZNER F., SCHARTL M., BURT D. W., KOEHLER M., FOWLER V. M., GOODWIN G., SCHNEIDER W. J., OTHERS, 2000 Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re) view on avian sex determination. *Cytogenet. Genome Res.* **89**: 67–78.

NAVARRO-MARTÍN L., VIÑAS J., RIBAS L., DÍAZ N., GUTIÉRREZ A., CROCE L. DI, PIFERRER F., 2011 DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLoS Genet.* **7**.

NEF S., VASSALLI J.-D., 2009 Complementary pathways in mammalian female sex determination. *J. Biol.* **8**: 74.

NEUWALD J. L., VALENZUELA N., 2011 The Lesser Known Challenge of Climate Change: Thermal Variance and Sex-Reversal in Vertebrates with Temperature-Dependent Sex Determination. *PLoS one* **6**.

NICOL B., GUERIN A., FOSTIER A., GUIGUEN Y., 2012 Ovary-predominant wnt4 expression during gonadal differentiation is not conserved in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* **79**: 51–63.

NUMATA K., KIYOSAWA H., 2012 Genome-wide impact of endogenous antisense transcripts in eukaryotes. *Front. Biosci.* **17**: 300–315.

O

O'BRYAN M. K., TAKADA S., KENNEDY C. L., SCOTT G., HARADA S., RAY M. K., DAI Q., WILHELM D., KRETZER D. M. DE, EDDY E. M., KOOPMAN P., MISHINA Y., 2008 Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev. Biol.* **316**: 359–370.

ÖÇAL G., 2011 Current Concepts in Disorders of Sexual Development. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **3**: 105–114.

OKADA E., YOSHIMOTO S., IKEDA N., KANDA H., TAMURA K., SHIBA T., TAKAMATSU N., ITO M., 2009 Xenopus W-linked DM-W induces Foxl2 and Cyp19 expression during ovary formation. *Sex. Dev.* **3**: 38–42.

OREAL E., PIEAU C., MATTEI M. G., JOSSO N., PICARD J. Y., CARRÉ-EUSÈBE D., MAGRE S., 1998 Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* **212**: 522–532.

ORÉAL E., MAZAUD S., PICARD J. Y., MAGRE S., CARRÉ-EUSÈBE D., 2002 Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev. Dyn.* **225**: 221–232.

ORTIZ-ZARRAGOITIA M., CAJARAVILLE M. P., 2010 Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotox. Environ. Safe.* **73**: 693–701.

OSHIMA Y., HAYASHI T., TOKUNAGA S., NAKAMURA M., 2005 Wnt4 expression in the differentiating gonad of the frog *Rana rugosa*. *Zool. sci.* **22**: 689–693.

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**: 170–177.

OSPINA-ÁLVAREZ N., PIFERRER F., 2008 Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS one* **3**.

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**: 2053–2062.

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. Gen.* **16**: 2795–2804.

P

PAILHOX E., VIGIER B., VAIMAN D., SERVEL N., CHAFFAUX S., CRIBIU E. P., COTINOT C., 2002 Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev. dyn.* **224**: 39–50.

PANNETIER M., PAILHOX E., 2010 FOXL2, le gardien de l'identité ovarienne FOXL2, the gatekeeper of ovarian identity. *Med Sci (Paris)* **26**: 470–473.

PAPS J., BAGUÑA J., RIUTORT M., 2009 Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc. R. Soc. B* **276**: 1245–1254.

PARR B. A., MCMAHON A. P., 1998 Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* **395**: 707–710.

PASK A. J., CALATAYUD N. E., SHAW G., WOOD W. M., RENFREE M. B., 2010 Oestrogen blocks the nuclear entry of SOX9 in the developing gonad of a marsupial mammal. *BMC Biology* **8**: 113.

Q

QUINN A. E., RADDER R. S., SARRE S. D., GEORGES A., EZAZ T., SHINE R., 2009 Isolation and development of a molecular sex marker for *Bassiana duperreyi*, a lizard with XX/XY sex chromosomes and temperature-induced sex reversal. *Mol. Genet. Genomics* **281**: 665–672.

R

RADDER R. S., QUINN A. E., GEORGES A., SARRE S. D., SHINE R., 2008 Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol. Lett.* **4**: 176–178.

RAYMOND C. S., SHAMU C. E., SHEN M. M., SEIFERT K. J., HIRSCH B., HODGKIN J., ZARKOWER D., 1998 Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* **391**: 691–695.

RHEN T., METZGER K., SCHROEDER A., WOODWARD R., 2007 Expression of Putative Sex-Determining Genes during the Thermosensitive Period of Gonad Development in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. *Sex. Dev.* **1**: 255–270.

RICO-VILLA B., COZ J. R. LE, MINGANT C., ROBERT R., 2006 Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **256**: 377–388.

RODRÍGUEZ-JARAMILLO C., HURTADO M. A., ROMERO-VIVAS E., RAMÍREZ J. L., MANZANO M., PALACIOS E., 2008 Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J. shellfish res.* **27**: 1129–1141.

RODRÍGUEZ-MARÍ A., YAN Y.-L., BREMILLER R. A., WILSON C., CAÑESTRO C., POSTLETHWAIT J. H., 2005 Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns GEP* **5**: 655–667.

RUESINK J., ROEGNER G., DUMBAULD B., NEWTON J., ARMSTRONG D., 2003 Contributions of coastal and watershed energy sources to secondary production in a Northeastern Pacific Estuary. *Estuar. Coast.* **26**: 1079–1093.

S

SAITOU N., NEI M., 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.

SATO A., KHADKA D. K., LIU W., BHARTI R., RUNNELS L. W., DAWID I. B., HABAS R., 2006 Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development* **133**: 4219–4231.

- SAUCEDO P., RACOTTA I., BERVERA H., VILLARREAL H., MONTEFORTE M., 2001 Differential gonadal development of grafted and ungrafted specimens of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* **39**: 183–193.
- SCHEPERS G., WILSON M., WILHELM D., KOOPMAN P., 2003 SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* **278**: 28101–28108.
- SCHWARTZ J. C., YOUNGER S. T., NGUYEN N. B., HARDY D. B., MONIA B. P., COREY D. R., JANOWSKI B. A., 2008 Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nature Struct. Mol. Biol.* **15**: 842–848.
- SEKIDO R., LOVELL-BADGE R., 2008 Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**: 930–934.
- SHEN J. H.-C., INGRAHAM H. A., 2002 Regulation of the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1 by Sox Proteins. *Mol. Endocrinol.* **16**: 529–540.
- SHIBATA K., TAKASE M., NAKAMURA M., 2002 The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **127**: 232–241.
- SHIN H. S., AN K. W., PARK M. S., JEONG M. H., CHOI C. Y., 2009 Quantitative mRNA expression of sox3 and DMRT1 during sex reversal, and expression profiles after GnRHa administration in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **154**: 150–156.
- SHIRAK A., SEROUSSI E., CNAANI A., HOWE A. E., DOMOKHOVSKY R., ZILBERMAN N., KOCHER T. D., HULATA G., RON M., 2006 Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics* **174**: 1573–1581.
- SHOEMAKER C.M., RAMSEY M., QUEEN J., CREWS D., 2007a Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Dyn.* **236**: 1055–1063.
- SHOEMAKER C. M., QUEEN J., CREWS D., 2007b Response of Candidate Sex-Determining Genes to Changes in Temperature Reveals Their Involvement in the Molecular Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination. *Mol. Endocrinol.* **21**: 2750–2763.
- SHOEMAKER C. M., CREWS D., 2009 Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin. Cell Devel. Biol.* **20**: 293–303.
- SHOEMAKER-DALY C. M., JACKSON K., YATSU R., MATSUMOTO Y., CREWS D., 2010 Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Dev. Dyn.* **239**: 1061–1075.
- SHUKLA J. N., NAGARAJU J., 2010 Doublesex: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators. *J. Genet.* **89**: 341–356.

- SMITH C. A., ANDREWS J. E., SINCLAIR A. H., 1997 Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **60**: 295–302.
- SMITH C. A., MCCLIVE P. J., WESTERN P. S., REED K. J., SINCLAIR A. H., 1999 Evolution: Conservation of a sex-determining gene. *Nature* **402**: 601–602.
- SMITH C. A., ROESZLER K. N., OHNESORG T., CUMMINS D. M., FARLIE P. G., DORAN T. J., SINCLAIR A. H., 2009 The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* **461**: 267–271.
- SMITH C. A., SHOEMAKER C. M., ROESZLER K. N., QUEEN J., CREWS D., SINCLAIR A. H., 2008 Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev. Biol.* **8**: 72.
- SMITH C. A., SINCLAIR A. H., 2004 Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays* **26**: 120–132.
- SMITH C. A., SHOEMAKER C. M., ROESZLER K. N., QUEEN J., CREWS D., SINCLAIR A. H., 2008 Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev. Biol.* **8**: 72.
- SOLECHNIK P., RAZET D., GEAIRON P., FAURY N., GOULLETQUER P., 1997 Écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Res.* **10**: 177–185.
- SOTTILE V., LI M., SCOTTING P. J., 2006 Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res.* **1099**: 8–17.
- SPLINTER E., WIT E. DE, NORA E. P., KLOUS P., WERKEN H. J. G. VAN DE, ZHU Y., KAAIJ L. J. T., IJCKEN W. VAN, GRIBNAU J., HEARD E., LAAT W. DE, 2011 The inactive X chromosome adopts a unique three-dimensional conformation that is dependent on Xist RNA. *Genes Dev.* **25**: 1371–1383.
- STEELE S., MULCAHY M. f., 1999 Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *JMBA* **79**: 673–686.
- STENYAKINA A., WALTERS L. J., HOFFMAN E. A., CALESTANI C., 2010 Food availability and sex reversal in *Mytella charruana*, an introduced bivalve in the southeastern United States. *Mol. Reprod. Dev.* **77**: 222–230.
- SU W.-Y., XIONG H., FANG J.-Y., 2010 Natural antisense transcripts regulate gene expression in an epigenetic manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**: 177–181.
- SUN Y.-L., ZENG S., YE K., YANG C., LI M.-H., HUANG B.-F., SUN L.-N., ZHOU L.-Y., WANG D.-S., 2012 Involvement of FGF9 subfamily in female germ cell development of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* **38**: 1427–1439.

SUTTON E, HUGHES J, WHITE S, SEKIDO R, TAN J, ARBOLEDA V, ROGERS N, KNOWER K, ROWLEY L, EYRE H, RIZZOTI K, McANINCH D, GONCALVES J, SLEE J, TURBITT E, BRUNO D, BENGTSSON H, HARLEY V, VILAIN E, SINCLAIR A, LOVELL-BADGE R, THOMAS P, 2011 Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**: 328–341.

SWAIN A., ZANARIA E., HACKER A., LOVELL-BADGE R., CAMERINO G., 1996 Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genet.* **12**: 404–409.

T

TAKEHANA Y., NARUSE K., HAMAGUCHI S., SAKAIZUMI M., 2007 Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma* **116**: 463–470.

TAKEUCHI T., KAWASHIMA T., KOYANAGI R., GYOJA F., TANAKA M., IKUTA T., SHOGUCHI E., FUJIWARA M., SHINZATO C., HISATA K., FUJIE M., USAMI T., NAGAI K., MAEYAMA K., OKAMOTO K., AOKI H., ISHIKAWA T., MASAOKA T., FUJIWARA A., ENDO K., ENDO H., NAGASAWA H., KINOSHITA S., ASAKAWA S., WATABE S., SATOH N., 2012 Draft Genome of the Pearl Oyster *Pinctada fucata*: A Platform for Understanding Bivalve Biology. *DNA Res* **19**: 117–130.

TAKEZAWA Y., YOSHIDA K., MIYADO K., SATO M., NAKAMURA A., KAWANO N., SAKAKIBARA K., KONDO T., HARADA Y., OHNAMI N., KANAI S., MIYADO M., SAITO H., TAKAHASHI Y., AKUTSU H., UMEZAWA A., 2011 β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep* **1**.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S., 2011 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.

TARDY M. J., 1970 Organogenèse de l'appareil génital chez les Mollusques. *Bull. Soc. Zool. France* **95**: 407–427.

TEVOSIAN S. G., MANUYLOV N. L., 2008 To β or not to β : Canonical β -catenin signaling pathway and ovarian development. *Dev. Dyn.* **237**: 3672–3680.

THIRIOT-QUIEVREUX C., 1984 Les caryotypes de quelques Ostreidae et Mytilidae. *Malacologia* **25**: 465–476.

THOMPSON J. D., HIGGINS D. G., GIBSON T. J., 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.

TOMASELLI S., MEGIORNI F., BERNARDO C. DE, FELICI A., MARROCCO G., MAGGIULLI G., GRAMMATICO B., REMOTTI D., SACCUCCI P., VALENTINI F., OTHERS, 2008 Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum. Mutat.* **29**: 220–226.

TOMASELLI S., MEGIORNI F., LIN L., MAZZILLI M. C., GERRELLI D., MAJORE S., GRAMMATICO P., ACHERMANN J. C., 2011 Human RSPO1/R-spondin1 Is Expressed during Early Ovary Development and Augments β -Catenin Signaling. *PLoS ONE* **6**: 16366.

TOMIZUKA K., HORIKOSHI K., KITADA R., SUGAWARA Y., IBA Y., KOJIMA A., YOSHITOME A., YAMAWAKI K., AMAGAI M., INOUE A., OSHIMA T., KAKITANI M., 2008 R-Spondin1 Plays an Essential Role in Ovarian Development Through Positively Regulating Wnt-4 Signaling. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 1278–1291.

TOPOL L., CHEN W., SONG H., DAY T. F., YANG Y., 2009 Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting B-Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **284**: 3323–3333.

TORRES MALDONADO L. C., LANDA PIEDRA A., MORENO MENDOZA N., MARMOLEJO VALENCIA A., MEZA MARTÍNEZ A., 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.

TRIPATHI V., RAMAN R., 2010 Identification of Wnt4 as the ovary pathway gene and temporal disparity of its expression vis-a-vis testis genes in the garden lizard, *Calotes versicolor*. *Gene* **449**: 77–84.

U

UHLENHAUT N. H., JAKOB S., ANLAG K., EISENBERGER T., SEKIDO R., KRESS J., TREIER A.-C., KLUGMANN C., KLASSEN C., HOLTER N. I., RIETHMACHER D., SCHÜTZ G., COONEY A. J., LOVELL-BADGE R., TREIER M., 2009 Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139**: 1130–1142.

URBATZKA R., LUTZ I., KLOAS W., 2007 Aromatase, steroid-5-alpha-reductase type 1 and type 2 mRNA expression in gonads and in brain of *Xenopus laevis* during ontogeny. *Gen. and Comp. Endocrinol.* **153**: 280–288.

V

VAINIO S., HEIKKILÄ M., KISPERT A., CHIN N., MCMAHON A. P., 1999 Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**: 405–409.

VALENZUELA N., ADAMS D. C., JANZEN F. J., 2003 Pattern Does Not Equal Process: Exactly When Is Sex Environmentally Determined? *Amer. Nat.* **161**: 676–683.

VEITH A.-M., FROSCHAUER A., KÖRTING C., NANDA I., HANEL R., SCHMID M., SCHARTL M., 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.

VIGER R. S., GUITTOT S. M., ANTONEN M., WILSON D. B., HEIKINHEIMO M., 2008 Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol. Endocrinol.* **22**: 781–798.

VITTURI R., CATALANO E., 1988 A male XO sex-determining mechanism in *Theodoxus meridionalis* (Neritidae)(Prosobranchia, Archaeogastropoda). *Cytologia* **53**: 131–138.

VITTURI R., CATALANO E., MACALUSO M., ZAVA B., 1988 The karyology of *Littorina neritoides* (Linnaeus, 1758)(Mollusca, Prosobranchia). *Malacologia* **29**: 319–324.

VITTURI R., LIBERTINI A., PANOZZO M., MEZZAPELLE G., 1995 Karyotype analysis and genome size in three Mediterranean species of periwinkles (Prosobranchia: Mesogastropoda). *Malacologia* **37**: 123–132.

VITTURI R., COLOMBA M. S., CAPUTO V., PANDOLFO A., 1998 Brief communication. XY chromosome sex systems in the neogastropods *Fasciolaria lignaria* and *Pisania striata* (Mollusca: Prosobranchia). *J. Hered.* **89**: 538–543.

VIZZIANO D., BARON D., RANDUINEAU G., MAHÈ S., CAUTY C., GUIGUEN Y., 2008 Rainbow Trout Gonadal Masculinization Induced by Inhibition of Estrogen Synthesis Is More Physiological Than Masculinization Induced by Androgen Supplementation. *Biol. Reprod.* **78**: 939–946.

VOLFF J.-N., ZARKOWER D., BARDWELL V. J., SCHARTL M., 2003 Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J. Mol. Evol.* **57 Suppl 1**: S241–249.

W

WALLIS M. C., WATERS P. D., GRAVES J. A. M., 2008 Sex determination in mammals—before and after the evolution of SRY. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 3182–3195.

WANG D.-S., KOBAYASHI T., ZHOU L.-Y., PAUL-PRASANTH B., IJIRI S., SAKAI F., OKUBO K., MOROHASHI K., 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**: 712–725.

WARNER R. R., 1975 The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animals. *Amer. Nat.*: **109**: 61–82.

WEIDINGER G., STEBLER J., SLANCHEV K., DUMSTREI K., WISE C., LOVELL-BADGE R., THISSE C., THISSE B., RAZ E., 2003 dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.* **13**: 1429.

WESTERN P. S., HARRY J. L., GRAVES J. A. M., SINCLAIR A. H., 1999 Temperature-dependent sex determination: Upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev. Dyn.* **214**: 171–177.

WILHELM D., PALMER S., KOOPMAN P., 2007 Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol. Rev.* **87**: 1–28.

WILLERTON L., SMITH R. A., RUSSELL D., MACKAY S., 2004 Effects of FGF9 on embryonic Sertoli cell proliferation and testicular cord formation in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* **48**: 637–643.

WILSON M. J., DEARDEN P. K., 2008 Evolution of the insect Sox genes. *BMC Evol. Biol.* **8**: 120.

WU G.-C., TOMY S., CHANG C.-F., 2008 The Expression of nr0b1 and nr5a4 During Gonad Development and Sex Change in Protandrous Black Porgy Fish, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol. Reprod.* **78**: 200–210.

WU G. C., CHANG C. F., 2009 wnt4 is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol. Reprod.* **81**: 1073.

WU G.-C., TOMY S., LEE M.-F., LEE Y.-H., YUEH W.-S., LIN C.-J., LAU E.-L., CHANG C.-F., 2010 Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **167**: 417–421.

X

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.

Y

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.

YAMAMURA Y., AOYAMA S., OSHIMA Y., KATO T., OSAWA N., NAKAMURA M., 2005 Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* WT1 and Fgf9. *Zool. Sci.* **22**: 1045–1050.

YANO A., GUYOMARD R., NICOL B., JOUANNO E., QUILLET E., KLOPP C., CABAU C., BOUCHEZ O., FOSTIER A., GUIGUEN Y., 2012 An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol.* **22**: 1423–1428.

YAO B., ZHOU L., WANG Y., XIA W., GUI J. F., 2007 Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish. *J. Exp. Zool. A: Ecol. Genet. Physiol.* **307**: 207–219.

YOKOI H., KOBAYASHI T., TANAKA M., NAGAHAMA Y., WAKAMATSU Y., TAKEDA H., ARAKI K., MOROHASHI K.-I., OZATO K., 2002 sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* **63**: 5–16.

YOKOI H., POSTLETHWAIT J. H., 2011 Genome Duplication and Subfunction Partitioning: Sox9 in Medaka and Other Vertebrates. Naruse K, Tanaka M, Takeda H (Eds.), *Medaka*, Springer Japan, Tokyo, pp. 323–337.

YOSHIMOTO S., ITO M., 2011 A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS J.* **278**: 1020–1026.

YU F.-F., GUI J.-F., ZHOU L., WANG M.-F., YU X.-Y., 2009 Cloning and expression characterization of Dmrt5 in *Pinctada martensii*. *Acta Hydrobiol. Sin.* **33**: 844–850.

YU H., PASK A., SHAW G., RENFREE M., 2006 Differential expression of WNT4 in testicular and ovarian development in a marsupial. *BMC Dev. Biol.* **6**: 1–13.

YUSA Y., 2007 Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca-an overview*. *Am. Malacol. Bull.* **23**: 89–98.

Z

ZABALA M., LOUISY P., GARCIA-RUBIES A., GRACIA V., 1997 Socia-behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834)(Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci Mar.* **61**: 79–89.

ZHANG G., FANG X., GUO X., LI L., LUO R., *et al.*, 2012 The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* **490**: 49–54

ZHANG H., THOMSEN J. S., JOHANSSON L., GUSTAFSSON J. AA, TREUTER E., 2000 DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* **275**: 39855–39859.

ZHANG Y., LI F., SUN D., LIU J., LIU N., YU Q., 2010 Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. *Mol. Biol. Rep.* **38**: 275–282.

ZHAO Q., EBERSPAECHER H., LEFEBVRE V., CROMBRUGGHE B. DE, 1997 Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev. Dyn.* **209**: 377–386.

ZHOU L., TAPAS C., WANG D., NAGAHAMA Y., 2009 R-Spondin1 is essential for ovarian differentiation in fish. 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China.

ZHOU L., GUI J.-F., 2010 Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiol. Biochem.* **36**: 181–193.

ZHOU R., LIU L., GUO Y., YU H., CHENG H., HUANG X., TIERSCH T. R., BERTA P., 2003 Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol. Reprod. Dev.* **66**: 211–217.

Résumé

Chez l'huître creuse, hermaphrodite successif irrégulier protandre, le mode et la période du déterminisme sexuel restent inconnus. Cette thèse a consisté à préciser la cascade moléculaire et la fenêtre temporelle de ce mécanisme chez l'adulte et lors du développement ainsi que ses régulations épigénétiques et environnementales potentielles. Deux nouveaux acteurs moléculaires respectivement mâle et femelle ont été identifiés, Cg-SoxE et Cg- β -caténine. L'ARN naturel anti-sens de Cg-Foxl2 a aussi été caractérisé ; il pourrait participer à la différenciation gonadique mâle en inhibant l'expression de Cg-Foxl2 par la formation de duplex. Chez l'adulte, les expressions de ces quatre facteurs analysées en qRT-PCR et en hybridation *in situ* suggèrent que le déterminisme sexuel aurait lieu du stade III d'un cycle gamétogénétique jusqu'au stade 0 du cycle suivant. Un modèle de cascade moléculaire chez l'adulte propose une balance d'expressions entre les facteurs mâles et femelles actuellement caractérisés (dont Cg-DMI, acteur de la différenciation gonadique mâle). Elle pourrait être régulée de façon épigénétique comme c'est le cas pour Cg-Foxl2. Chez le naissain, les profils d'expressions de ces mêmes facteurs (dont Cg-DMI) montrent une balance entre les acteurs mâles et femelles modulée par la température et qui est en accord avec les sexe-ratios, suggérant un déterminisme sexuel température-dépendant. Un modèle de cascade moléculaire proposé chez le naissain élevé à 18°C en conditions nutritionnelles optimales suggère que le déterminisme sexuel aurait lieu vers 40-44 jpf, avant l'apparition des premiers canaux collecteurs vers 49 jpf.

Mots clés : mollusque, GSD, TSD, Sox9, Foxl2, Dmrt, β -caténine, transcrit anti-sens naturel

Sex determination in oyster *Crassostrea gigas*: its molecular pathway, its temporal window and its potential regulations in adult and during development.

In the pacific oyster, successive irregular protandrous hermaphrodite, the mode and period of sex determination remain unknown. This thesis consisted in specifying the molecular pathway and the temporal window of this process in adult and during development as well as its epigenetic and environmental potential regulations. Two new molecular actors respectively male and female were identified, Cg-SoxE and Cg- β -catenin. The natural antisense transcript of Cg-Foxl2 was also characterized; it may take part in male gonadic differentiation by inhibiting the expression of Cg-Foxl2 through duplex formation. In adult, expressions of these four factors analyzed by qRT-PCR and by *in situ* hybridization suggest that sex determination would take place from stage III of a gametogenetic cycle to stage 0 of the following cycle. A model of molecular pathway in adult proposes a balance of expressions between male and female factors characterized up to now (including Cg-DMI, actor of male gonadic differentiation). This balance could be regulated by epigenetic mechanisms as is the case for Cg-Foxl2. In spat, expression profiles of these same factors (including Cg-DMI) show a balance of expressions between male and female actors modulated by temperature and in accordance with sex-ratios, suggesting a temperature-dependent sex determination. A model of molecular pathway proposed in spat raised at 18°C in optimal nutritional conditions suggests that sex determination would take place around 40-44 dpf, before first appearance of collecting ducts around 49 dpf.

Key words: mollusk, GSD, TSD, Sox9, Foxl2, Dmrt, β -catenin, natural antisense transcript

Discipline : Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions
IBFA, SFR ICORE

FRE3484 CNRS INEE : Biologie des Organismes Marins et des Ecosystèmes Associés

Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 CAEN Cedex, France