
Comparaison des effets sur le déterminisme du sexe d'un traitement thermique à un stade précoce ou tardif du développement chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)

Auteur : Degrange, Elise

Promoteur(s) : Rougeot, Carole

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biologie des organismes et écologie, à finalité didactique

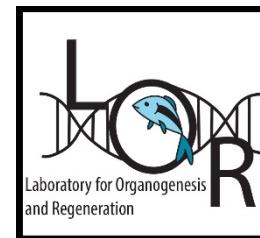
Année académique : 2018-2019

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/6182>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Département Biologie, Ecologie, Evolution

Faculté des Sciences

Comparaison des effets sur le déterminisme du sexe d'un traitement thermique à un stade précoce ou tardif du développement chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)

Degrange Elise

Master en Biologie des Organismes et Ecologie à finalité didactique

Janvier 2019

Laboratoires d'accueil :

Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (CEFRA)

GIGA - Laboratory for Organogenesis and Regeneration (GIGA - LOR)

Promotrice : Carole Rougeot

Encadrant : Renaud Nivelle

Remerciements

Je tiens à remercier ma promotrice, Carole Rougeot, pour sa confiance et ses conseils visant à améliorer ce travail à la fois sur la forme et le fond. Je la remercie, ainsi que tous les autres membres de l'équipe du CEFRA, pour leur accueil et leur bonne humeur que j'avais déjà ressentis lors des quelques cours d'aquaculture suivis durant mon master en océanographie. Cela m'a motivée encore davantage à travailler sur ce sujet.

Je remercie particulièrement mon encadrant, Renaud Nivelle, avec qui j'ai eu la chance de collaborer dans le cadre de sa thèse. Ses compétences et son expertise sur le sujet et dans le traitement informatique des données m'ont été d'une aide précieuse pour mener ce mémoire à bien. Il est aussi une personne pleine d'humour, passionnée et dévouée à son travail. Encore merci pour tous ces moments d'apprentissage (et parfois de stress) que nous avons partagés.

Je tiens également à remercier Marc Muller de m'avoir accueillie dans son laboratoire du GIGA – LOR pour toute la partie consacrée aux analyses biomoléculaires ainsi que pour sa relecture de mon travail et ses conseils avisés. Je remercie chaleureusement l'ensemble de son équipe à laquelle j'ai pu m'intégrer dans une atmosphère conviviale.

Enfin, je remercie de tout cœur mes parents, Joëlle et Benoît, qui m'ont permis de réaliser l'ensemble de mes études à l'université et qui m'ont soutenue avec amour et bienveillance lorsque je passais par toutes les palettes d'émotions possibles et imaginables. Je remercie également mon compagnon, Tanguy, de m'insuffler de précieuses doses de courage et d'amour au quotidien.

Comparaison des effets sur le déterminisme du sexe d'un traitement thermique à un stade précoce ou tardif du développement chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)

Elise Degrange Promotrice : Carole Rougeot Encadrant : Renaud Nivelle

Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (CEFRA)
GIGA - Laboratory for organogenesis and regeneration (GIGA - LOR)

Janvier 2019

Résumé

Le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) est un poisson de grand intérêt économique dont le génome a été entièrement séquencé. Il s'agit d'un modèle particulièrement intéressant pour l'étude du système de détermination du sexe génétique influencé par la température (GSD + TE). Dans cette étude, nous avons soumis une souche domestique à une haute température (HT) (36,5°C) de manière précoce (durant le stade embryonnaire) et de manière tardive (durant la période de différenciation des gonades). Ceci afin de provoquer une masculinisation et répondre aux objectifs suivants : enrichir les données quant à l'impact du traitement thermique précoce sur le sexe ratio de cette espèce ; comparer l'impact du traitement thermique précoce sur le transcriptome (dans les têtes et dans les gonades à 15 et 40 jpf*) à celui du traitement thermique tardif ; tester la répétabilité des résultats pour trois descendance issues d'un même couple de géniteurs. Un objectif secondaire était également de mettre au point la méthodologie de l'étude du méthylome (technologie du Nanopore), car les HTs entraîneraient des modifications épigénétiques suspectées d'influencer le niveau d'expression des gènes de la différenciation sexuelle. L'impact du traitement thermique tardif sur le sexe ratio était supérieur à ceux rapportés précédemment sur des populations sauvages (jusqu'à 100% de masculinisation) avec des gènes de la voie mâle sur-exprimés (*amh*, *dmrt1* et *cyp11b2*) et des gènes de la voie femelle sous-exprimés (*foxl2* et *cyp19a1a*) dans les gonades. Par contre, nous n'avons pas constaté d'influence significative du traitement thermique précoce, avec une seule descendance sur quatre montrant une masculinisation. Cela pourrait être attribué à un mauvais timing du traitement mais nous suspectons également l'influence d'un décalage dans le développement des cerveaux de cette descendance, ce qui aurait favorisé sa réponse au traitement thermique précoce. Bien qu'aucun gène différentiellement exprimé (GDE) n'a pu être mis en évidence dans les têtes suite au traitement précoce, les HTs semblent avoir un impact sur le cerveau. En effet, il y avait un nombre important de GDEs (119) dans les têtes des lots en cours de traitement thermique tardif, dont des gènes impliqués dans les modifications épigénétiques des histones (*jarid2b*, *MBTD1* et *kdm6bb*). Enfin, les descendances issues d'un même couple répondaient toutes trois au traitement thermique tardif et, de manière générale, cette étude ne permet pas de confirmer ni de réfuter l'existence d'un effet parental, même pour le traitement précoce, car d'autres facteurs pourraient être impliqués (comme des différences de vitesse de développement).

*jpf : jours post-fécondation

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messager

ARNc : ARN non codant

ESD : Environmental Sex Determination

FI : Facteur d’Inversion sexuelle

GDE : Gène Différenciellement Exprimé

GSD : Genetic Sex Determination

GSD + TE : Genetic Sex Determination + Temperature Effect

hpf : heures post-fécondation

HT : Haute Température

jpf : jours post-fécondation

lncARN : long non coding ARN

miARN : micro ARN

RIN : RNA Integrity Number

TSD : Temperature-dependent Sex Determination

« Etherm » : nom donné aux lots soumis au traitement thermique précoce

« Ltherm » : nom donné aux lots soumis au traitement thermique tardif

« Témoin 28 » : nom donné aux lots non traités maintenus à 28°C

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	p.1
1.1. Les mécanismes de détermination du sexe dans le règne animal.....	p.1
1.2. Déterminisme du sexe chez les poissons téléostéens.....	p.1
1.3. Le tilapia du Nil, une espèce au déterminisme sexuel complexe.....	p.3
1.4. Les gènes impliqués dans la différenciation du sexe.....	p.5
1.4.1. Gènes de la différenciation du sexe chez les femelles.....	p.5
1.4.2. Gènes de la différenciation du sexe chez les mâles.....	p.6
1.4.3. Autres gènes potentiellement impliqués dans la différenciation du sexe.....	p.6
1.5. Régulation par des mécanismes épigénétiques.....	p.8
1.5.1. Méthylation de l'ADN.....	p.9
1.5.2. Modification des histones.....	p.10
1.5.3. ARNs non codants.....	p.11
2. OBJECTIFS.....	p.11
3. MATERIEL ET METHODES.....	p.12
3.1. Géniteurs.....	p.12
3.2. Pontes et reproductions.....	p.13
3.3. Elevage en écloserie et traitement thermique précoce.....	p.13
3.4. Elevage des juvéniles et traitement thermique tardif.....	p.14
3.5. Echantillonnages à 15 jpf et à 40 jpf.....	p.14
3.6. Calcul des taux de survie de 0 à 9 jpf et de 10 à 100 jpf.....	p.15
3.7. Sexages et calcul du facteur d'inversion sexuelle.....	p.15
3.8. Prélèvement des gonades pour les analyses transcriptomiques.....	p.16
3.9. Extraction de l'ARN et de l'ADN.....	p.17
3.10. Contrôle de la qualité des ARNs totaux.....	p.19
3.11. Séquençage des ARNm.....	p.19
3.12. Contrôle de la qualité de l'ADN génomique.....	p.21
3.13. Mise au point de la méthodologie de l'étude du méthylome.....	p.21
3.14. Analyses statistiques.....	p.23
3.14.1. Sexe ratios et taux de survie.....	p.23
3.14.2. RNA seq.....	p.23

3.14.3. Méthylome.....	p.23
4. RESULTATS.....	p.24
4.1. Croisements et nombre de poissons échantillonnés.....	p.24
4.2. Taux de survie.....	p.25
4.2.1. Taux de survie entre 0 et 9 jpf.....	p.25
4.2.2. Taux de survie entre 10 et 100 jpf.....	p.26
4.3. Sexe ratios et facteurs d'inversion du sexe.....	p.27
4.4. Qualité des échantillons d'ARNm et de leur séquençage.....	p.29
4.5. Profils d'expression des gènes dans les têtes et les gonades.....	p.29
4.5.1. Expression des gènes dans les gonades à 15 jpf.....	p.30
4.5.2. Expression des gènes dans les gonades à 40 jpf.....	p.32
4.5.3. Expression des gènes dans les têtes à 15 jpf	p.33
4.6. Qualité du séquençage par le Nanopore.....	p.34
5. DISCUSSION.....	p.35
5.1. Effet des traitements thermiques sur le taux de survie.....	p.35
5.1.1. Taux de survie entre 0 et 9 jpf.....	p.35
5.1.2. Taux de survie entre 10 et 100 jpf.....	p.36
5.2. Effet des traitements thermiques sur le sexe ratio.....	p.37
5.2.1. Sexe ratios des lots « Témoin 28 ».....	p.37
5.2.2. Sexe ratios des lots « Etherm ».....	p.37
5.2.3. Sexe ratios des lots « Ltherm ».....	p.39
5.3. Effet des traitement thermiques sur les profils d'expression génétique.....	p.40
5.3.1. Expression des gènes dans les gonades à 15 jpf.....	p.40
5.3.2. Expression des gènes dans les gonades à 40 jpf.....	p.42
5.3.3. Expression des gènes dans les têtes à 15 jpf	p.45
6. CONCLUSION.....	p.47

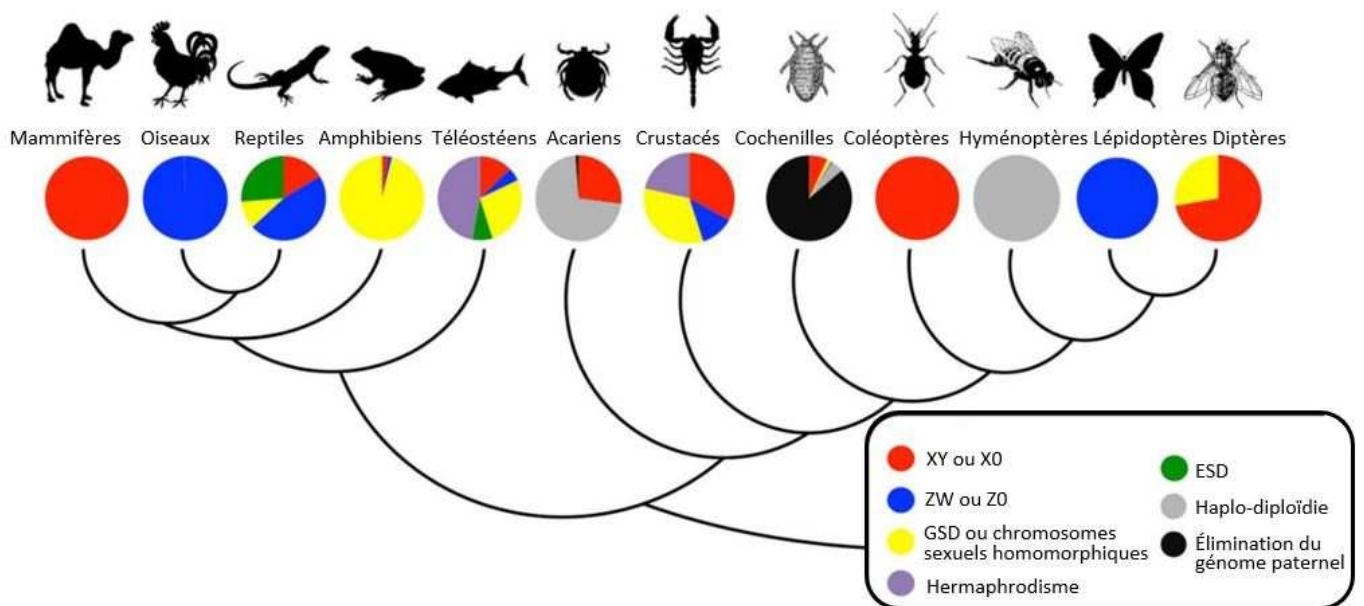


Figure 1 : Diversité des systèmes de détermination du sexe au sein des différents clades d'animaux (modifié d'après Bachtrog et al., 2014).

1. INTRODUCTION

1.1. Les mécanismes de détermination du sexe dans le règne animal

Parmi les différents clades représentatifs des animaux, les systèmes de détermination du sexe sont variés (**figure 1**). Il faut tout d'abord distinguer les espèces gonochoriques dont les sexes sont séparés entre des individus distincts et les espèces hermaphrodites pour lesquelles un individu présente les organes mâles et les organes femelles simultanément ou successivement dans le temps (hermaphrodisme séquentiel). De manière générale, l'hermaphrodisme est commun chez les poissons mais aussi chez de très nombreux invertébrés. Chez les animaux gonochoriques, il existe un continuum entre les espèces dont la détermination du sexe est génétique (Genetic Sex Determination -GSD) et celles dont la détermination du sexe est liée aux conditions environnementales (Environmental Sex Determination - ESD), ces deux systèmes pouvant coexister (Bachtrog et al., 2014).

Le sexe des animaux présentant un GSD est souvent sous le contrôle de chromosomes sexuels. On distingue le système à homogamétie femelle XX/XY (principalement chez les mammifères et les coléoptères), ainsi que le système à homogamétie mâle ZW/ZZ (principalement chez les oiseaux et les lépidoptères). Chez les mammifères ainsi que chez beaucoup d'oiseaux, de serpents et d'insectes, le chromosome Y ou W a dégénéré au cours de l'évolution et est devenu morphologiquement différent par rapport au deuxième chromosome sexuel, on parle de chromosomes hétéromorphiques. Certains insectes ont même complètement perdu leur chromosome Y ou W et possèdent donc un système dit X0 ou Z0. A l'opposé, d'autres espèces dont la majorité des poissons possèdent des chromosomes sexuels dits homomorphiques, c'est-à-dire qu'ils ne diffèrent pas morphologiquement l'un de l'autre. Enfin, certains animaux à GSD ne possèdent pas de chromosomes sexuels et utilisent un système de détermination du sexe polygénique (le sexe est déterminé par une série de gènes situés sur les autosomes) (Bachtrog et al., 2014).

1.2. Déterminisme du sexe chez les poissons téléostéens

Au regard de la **figure 1**, il apparaît que la diversité des mécanismes de détermination du sexe est particulièrement importante chez les poissons téléostéens. En effet, on retrouve chez ces derniers des cas d'hermaphrodisme, de GSD, d'ESD ou de polygénisme.

Parmi les poissons à GSD, on retrouve plusieurs systèmes dont les plus courants sont l'hétérogamétie mâle XX/XY, suivi de l'hétérogamétie femelle ZZ/ZW (J.-F. Baroiller, 1998). Ils représentent les facteurs majeurs de détermination du sexe. Cependant, le mode de détermination polygénique est également représenté, par exemple chez le zebrafish (Bachtrog et al., 2014).

En ce qui concerne les poissons à ESD, leur sexe-ratio est le plus souvent influencé par la température (on parlera donc plutôt de Temperature Sex Determination - TSD) (Wang et al., 2017). Le premier cas de TSD chez une espèce gonochorique, la capucette (*Medinia medinia*), a été découvert en 1980. Il s'agit d'une espèce de la côte est des Etats-Unis ne possédant pas de chromosomes sexuels et dont les populations sont majoritairement femelles à de faibles températures, en début de saison de reproduction (Bachtrog et al., 2014). Outre la température, d'autres facteurs peuvent également avoir une influence sur la détermination sexuelle. Par exemple, le sexe-ratio du xipho (*Xiphophorus helleri*) est influencé par le pH tandis que celui du poisson paradis (*Macropodus opercularis*) est influencé par la densité de population (J.-F. Baroiller, 1998).

Notons que chez certaines espèces de poissons, le déterminisme du sexe est poly-factoriel. Il est à la fois sous le contrôle des facteurs génétiques majeurs, mineurs et environnementaux. C'est par exemple le cas du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et du cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*). Ces deux espèces sont de type GSD + TE (détermination génotypique du sexe avec un effet de la température). Cela signifie que dans des conditions de vie normales, leur sexe est avant tout déterminé par le facteur génotypique majeur (lié aux chromosomes sexuels XX/XY) et mineur (lié aux autosomes) mais que dans des conditions thermiques particulières, la température peut également influer sur le sexe-ratio (Li et al., 2014; Wang et al., 2017).

Afin d'éviter toute confusion, il est important de souligner la différence entre ce que l'on nomme « détermination du sexe » et « différenciation du sexe » chez les poissons. D'une part, la détermination du sexe s'apparente aux processus génétiques et environnementaux (GSD et ESD) qui établissent le genre d'un organisme. La différenciation du sexe quant à elle correspond aux processus génétiques et physiologiques qui permettent le développement d'une gonade indifférenciée en une gonade femelle ou mâle adaptée au génotype (Hake et O'Connor, 2008; Piferrer, et al., 2012). La **figure 2** replace les deux processus sur la ligne du temps du développement.

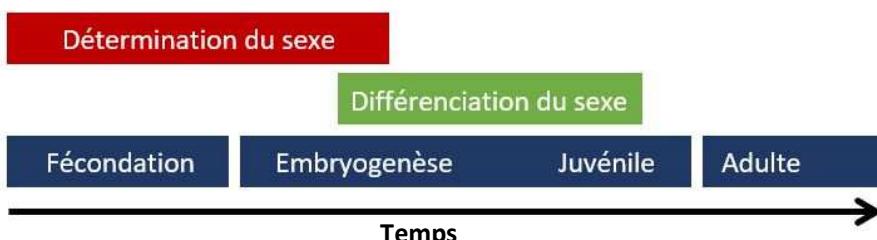


Figure 2 : Les processus de détermination du sexe et de différenciation du sexe représentés le long de la ligne du temps du développement (modifiée d'après Piferrer et al. 2012).

1.3. Le Tilapia du Nil, une espèce au déterminisme sexuel complexe

De son nom latin *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), le tilapia du Nil fait partie de l'ordre des actinoptérygiens, de la classe des perciformes, et de la famille des cichlidés. Il se distingue des autres espèces de tilapias par les rayures noires régulières présentes sur sa nageoire caudale (Fishbase). Sa nageoire dorsale est, quant à elle, continue et composée d'une partie épineuse et d'une partie de rayons mous. Pouvant vivre plus de 10 ans et peser plus de 5 kg, cette espèce tropicale d'Afrique possède une aire de répartition naturelle comprenant les bassins du Tchad et du Nil ainsi que des rivières de l'Afrique de l'ouest telles que le Niger, le Benue, la Volta, la Gambie et le Sénégal (FAO).



Figure 3 : Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (FAO).

Concernant son écologie, le tilapia du Nil est une espèce benthopélagique, potamodrome (c'est-à-dire qu'il migre uniquement au sein des eaux douces) et eurytherme dont l'étendue naturelle de température est comprise entre 13,5 et 33°C. Vivant à des profondeurs situées entre 0 et 20 mètres, il se nourrit principalement de phytoplancton et d'algues benthiques. Les habitats qu'il occupe sont variés (rivières, lacs, canaux d'irrigation) et il est également capable de survivre en eau saumâtre. Atteignant sa maturité sexuelle entre 3 et 6 mois, il se reproduit uniquement lorsque la température de l'eau est supérieure à 20°C (Fishbase). Lors de la saison de reproduction, le mâle tente d'attirer au moins une femelle sur son territoire. Une fois que la femelle a pondu, le mâle disperse son sperme sur les œufs qui sont ensuite incubés dans la bouche de la femelle (Longrie et al., 2013). Les juvéniles en sortent 1 à 2 semaines plus tard, lorsqu'ils ont éclos et que le sac vitellin a été absorbé (FAO).

D'un point de vue commercial, le tilapia du Nil est une espèce aquacole très répandue, l'une des plus importantes avec la Carpe et le Saumon (plus de 4 millions de tonnes produites au niveau mondial) (FAO). Il est surtout élevé dans les pays tropicaux ou subtropicaux où les températures sont favorables à sa croissance, principalement en Chine et en Egypte (FAO). Généralement, des populations mono-sexes mâles sont obtenues en incorporant une hormone sexuelle, la 17- α -méthyltestostérone, dans la nourriture des juvéniles indifférenciés. La raison de cette pratique est avant tout économique. En effet, il existe un dimorphisme sexuel de croissance en faveur des mâles dont la

taille augmente deux fois plus vite par rapport à celle des femelles. Cela permet également d'éviter une compétition accrue pour la nourriture ainsi que des reproductions incontrôlées pouvant aboutir à du nanisme (FAO).

Du point de vue du déterminisme génétique du sexe, le tilapia du Nil possède un système à homogamétie femelle XX/XY (facteur génétique majeur). La plupart des données montrent que celui-ci est lié à LG1 (LG pour « linkage group » : gènes physiquement proches sur un même chromosome ayant tendance à être transmis ensemble à la descendance). Cependant, d'autres marqueurs de la détermination du sexe ont également été trouvés sur LG3 et LG23 (facteurs génétiques mineurs) (Baroiller et al., 2009; Wessels et al., 2017).

En ce qui concerne l'effet de la température (TE) sur le déterminisme sexuel (facteur environnemental), une déviation du sexe-ratio en faveur des mâles peut être observée à la suite d'un traitement thermique sur des juvéniles sexuellement indifférenciés. Ainsi, des mâles phénotypiques fonctionnels peuvent être obtenus à partir de juvéniles XX ayant été exposés à des hautes températures (HTs > 34°C) (Poonlaphdecha et al., 2013). Pour ce faire, le traitement doit être appliqué durant une période thermosensible critique pour la différenciation des gonades. Celle-ci s'étend du 10^{ème} jour post-fécondation (jpf), c'est-à-dire juste après l'absorption du sac vitellin, jusqu'au 25-30^{ème} jpf (Wang et al., 2017). Il est également possible d'obtenir des inversions du sexe par un traitement thermique précoce durant le développement embryonnaire (Rougeot et al., 2008). Cependant, cet effet de la température sur le sexe-ratio semble varier en fonction des couples servant à la reproduction, ce qui suppose un effet familial non négligeable. Il a récemment été montré que la variabilité génétique liée à des SNPs (« single nucleotide polymorphism » : variation dans 1 nucléotide à une position donnée du génome) existant au niveau de LG23 pouvait être responsable de cette différence de sensibilité (Wessels et al., 2017).

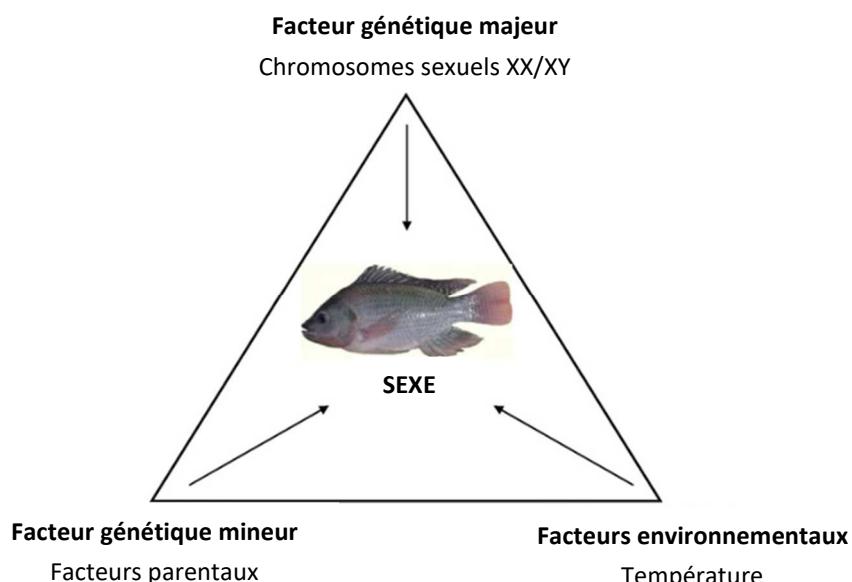


Figure 4 : Principaux facteurs influençant la détermination du sexe chez le tilapia du Nil (Baroiller et al. 2009).

1.4. Les gènes impliqués dans la différenciation du sexe

Le génome du tilapia du Nil étant entièrement séquencé depuis 2012, cette espèce constitue un bon modèle pour la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la différenciation du sexe (Wang et al., 2017). Le processus de masculinisation induit par les HTs s'expliquerait principalement par des changements au niveau de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle. En effet, une température élevée entraînerait l'activation ou la répression de certains gènes par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones (Li et al., 2014).

1.4.1. Gènes de la différenciation du sexe chez les femelles

Cyp19a1a et cyp19a1b

Chez les téléostéens, le gène *cyp19a1* code pour l'aromatase. De par la duplication de génome apparue chez les téléostéens il y a 300 m.a, ce gène existe en 2 copies (*cyp19a1a* et *cyp19a1b*) dont l'expression est spatialement différente. En effet *cyp19a1a* correspond à la copie spécifiquement exprimée au niveau gonadique tandis que *cyp19a1b* est spécifiquement exprimé au niveau cérébral (Li et al., 2014). L'expression du gène *cyp19a1a* est très importante chez les femelles génétiques XX et peu importante, voire indetectable, chez les mâles génétiques XY (Poonlaphdecha et al., 2013).

Concernant l'aromatase codée par le gène *cyp19a1*, il s'agit d'une enzyme bien connue pour catalyser la conversion des androgènes, hormones sexuelles mâles, en estrogènes, hormones sexuelles femelles. Chez les téléostéens, les estrogènes sont des inducteurs de la différenciation ovarienne. Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de l'aromatase chez le tilapia du Nil (avec du fadrozol, inhibiteur de l'aromatase), ayant pour effet de bloquer la production d'estrogènes, causait l'inversion sexuelle des individus XX en mâles fonctionnels. Inversement, si l'on traitait des juvéniles de poissons téléostéens indifférenciés avec des estrogènes, cela induisait une inversion du sexe de mâle à femelle (Poonlaphdecha et al., 2013; Li et al., 2014; Wang et al., 2017).

Lors de la masculinisation induite par la température chez le tilapia, la plie japonaise, le medaka et le zebrafish, il a été observé que l'expression du gène *cyp19a1a* était réprimée dans les gonades des juvéniles XX (Li et al., 2014).

Foxl2

A l'instar du gène *cyp19a1a*, *foxl2* est également un gène ayant un rôle crucial dans le développement ovarien (Ijiri et al., 2008). Il a en effet été montré que le niveau d'expression de *foxl2* augmentait dans les ovaires en différenciation de plusieurs poissons téléostéens dont le tilapia et que

ce gène codait pour un facteur de transcription activant le gène *cyp19a1a* chez le tilapia et le cardeau hirame (Li et al., 2014; Poonlaphdecha et al., 2013).

De plus, tout comme pour le gène *cyp19a1a*, l'expression de *foxl2* est réprimée sous l'effet de HTs chez les individus tilapias XX de 17 à 19 jpf (Li et al., 2014; Poonlaphdecha et al., 2013).

1.4.2. Gènes de la différenciation du sexe chez les mâles

Dmrt1 et *amh*

Chez les vertébrés, *dmrt1* et *amh* sont deux gènes impliqués dans le développement des testicules. *Dmrt1* est un facteur de transcription qui agit de manière précoce chez les vertébrés non mammaliens. Il est l'un des premiers gènes à voir son expression augmenter chez les tilapias XY donnant ultérieurement des mâles phénotypiques. Chez le tilapia du Nil, il a été montré que *dmrt1* et *amh* étaient des répresseurs du gène *cyp19a1a*. Ils permettent de bloquer la production d'estrogènes dans les gonades et donc d'empêcher la voie de différenciation sexuelle femelle. Ces gènes permettraient également de réduire l'expression du facteur de transcription *foxl2* (Poonlaphdecha et al., 2013).

Dmrt1 et *amh* seraient davantage exprimés lors de l'exposition aux hautes températures (HTs) et participeraient donc à l'effet masculinisant des HTs via la diminution de la production d'estrogènes (Poonlaphdecha et al., 2013).

1.4.3. Autres gènes potentiellement impliqués dans la différenciation du sexe

Era (gène codant pour un récepteur aux estrogènes – paralogues : *esr1*, *esr2a* et *esr2b*)

Les estrogènes impliqués dans les processus reproductifs des vertébrés agissent à travers leurs récepteurs intracellulaires. En absence de ligand, ces derniers sont dans le cytoplasme et forment des complexes avec des protéines de choc thermique inhibitrices (HSPs). Par exemple, les ERαs sont un type de récepteurs liés à HSP90 capables de stimuler les effets de l'estrogène sur l'expression du gène *cyp19a1a* (Li et al., 2014).

Dans les gonades, l'expression des ERα pourrait être affectée lors du traitement thermique car elle est induite par l'exposition aux estradiols dont le niveau change sous l'effet de la température. De plus, à haute température, il a été observé que l'expression du gène codant pour HSP90 augmentait dans les ovaires, ce qui doit également affecter l'activité des ERαs qui y sont liés (Li et al., 2014).

AR α (gène codant pour un récepteur aux androgènes)

Les androgènes agissent sur les cellules cibles à travers les ARs qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Il a été observé que les hautes températures induisaient une hausse de l'expression de *AR α* chez les femelles XX tilapias mais pas chez les mâles XY (Li et al., 2014).

Cyp11b2

Le gène *cyp11b2* contribue à la synthèse du principal androgène actif chez les téléostéens, la 11-cétotestostérone (11-KT). Chez le tilapia du Nil, les androgènes ne joueraient pas de rôle déterminant dans la différenciation des testicules, celle-ci se faisant en absence d'oestrogène. Le niveau de 11-KT devient seulement plus élevé chez les mâles par rapport aux femelles lors de la période d'initiation de la spermatogenèse (70 jours après éclosion) (Ijiri et al., 2008). Cependant, il a déjà été observé que le niveau d'expression de *cyp11b2* était significativement réduit dans les ovaires des femelles tilapia traitées aux HTs (Li et al., 2014).

Gènes impliqués dans la voie de stéroïdogenèse (*Nr0b1* et *Nr5a1*)

Chez les mammifères, *Nr5a1* est un activateur de la transcription des gènes codant pour des enzymes stéroïdogènes dont l'aromatase tandis que *Nr0b1* agit comme un régulateur négatif de la stéroïdogenèse en inhibant l'activité transcriptionnelle du gène *Nr5a1* (Iyer et Mccabe, 2004).

Gène codant pour le récepteur à la gonadotropine FSH (*Fshra*)

Les gonadotropines (GTHs) sont des hormones glycoprotéiques jouant un rôle majeur dans la régulation de la gamétogénèse chez les poissons adultes. Récemment, il a également été montré qu'elles étaient exprimées avant ou pendant la différenciation des gonades et l'on pense qu'elles initieraient cette différenciation de manière précoce. Parmi les GTHs, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) sont toutes deux produites par l'hypophyse antérieure et se lient à leur récepteurs (codés par *fshra* et *lhcrbb* respectivement) dans les gonades des tilapias. On pense que la FSH contrôle à la fois la vitellogenèse et la spermatogenèse tandis que la LH facilite la maturation des gamètes ainsi que la ponte durant le cycle reproductif du poisson (Yan et al., 2012).

Yan et al. (2012) indiquent que l'expression de *fshra* dans les gonades indifférenciées du tilapia du Nil semble être impliquée dans la différenciation sexuelle. En effet, ils ont observé qu'entre 6 et 25 jours après l'éclosion, l'expression de ce gène était significativement plus élevée dans les gonades XX que dans les gonades XY. Il est probable que cette expression plus élevée du récepteur de la FSH dans les gonades permette d'induire l'expression de *cyp19a1a*, stimulant la production d'estrogène.

Gènes de réponse au stress thermique (codant pour les HSPs)

Les HSPs (protéines du choc thermique) sont une classe particulière de protéines dont l'expression est activée lorsque l'organisme est soumis à une température anormalement élevée ou d'autres stress. Ce mécanisme a été conservé à travers l'évolution, des bactéries jusqu'à l'homme. Les différentes familles d'HSPs sont désignées par leur masse moléculaire (Hsp25, 40, 70, 90, 105). Elles aident à la conformation correcte et à l'élimination d'autres protéines auxquelles elles sont associées, empêchant ainsi l'accumulation de protéines anormales. Il est bien connu que plusieurs récepteurs stéroïdiens doivent être associés sous forme de complexes stables à HSP90 pour être stabilisés sous une forme inactive. Cela permet d'éviter toute interaction inappropriée en l'absence de l'hormone spécifique. Par contre, lors de la liaison avec cette dernière, le récepteur se dissocie d'HSP90 et se convertit dans un état lui permettant de lier l'ADN (Li et al., 2014; Wirth et al., 2002).

L'action des hautes températures augmente l'expression de certaines HSPs chez le tilapia, en particulier celle de HSP70. Selon certaines corrélations mises en évidence par Li et al. (2014), un lien indirect serait possible entre l'expression des HSPs et des changements dans l'expression des gènes de différenciation du sexe (*cyp19a1a*, *foxl2*, *dmrt1*).

1.5. Régulation par des mécanismes épigénétiques

L'épigénétique est une discipline qui a pour but de « *souligner les limites des modèles proposés par la génétique, et vient parfois s'opposer à ces modèles* » (Théry, 2014). Elle fait référence à des mécanismes régulateurs qui, sous l'influence de signaux environnementaux, entraînent un remaniement de la structure chromatidienne et donc des changements dans l'activité des gènes sans modifier la séquence de ces derniers. Ces mécanismes comprennent la méthylation de l'ADN, des modifications des histones et l'action d'ARNs non codant (Labbé et al., 2017; Théry, 2014).

Notons également que ces changements épigénétiques se transmettent au fil des divisions cellulaires chez un même organisme vivant et que l'on met de plus en plus en évidence l'existence d'une héritabilité transgénérationnelle. Certains prônent même une réintroduction de la théorie évolutive de Lamarck. Selon cette dernière, l'organisme change tout au long de sa vie en fonction des contraintes de son environnement et ces adaptations rapides sont ensuite héritées par sa descendance (Labbé et al., 2017; Théry, 2014).

1.5.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN par des méthyltransférases (DNMTs) est commune chez les eucaryotes. Chez les vertébrés, elle consiste en la liaison covalente d'un groupe méthyle au 5^{ème} carbone d'une cytosine (formation d'une 5mC) mais seulement si cette cytosine est suivie d'une guanine (contexte de dinucléotide CpG) (**figure 5**) (Labbé et al., 2017; Messerschmidt et al., 2014). Il a été démontré que la méthylation de cytosines au niveau de locus spécifiques induisait un état silencieux de la chromatine et, tout comme chez les mammifères, on constate un lien entre la méthylation de l'ADN et l'arrêt de l'expression de gènes chez les poissons (Labbé et al., 2017).

Lors de la division cellulaire, le modèle de méthylation de l'ADN est transmis à la cellule fille grâce à l'enzyme DNMT1 (codée par le gène *dnmt1*) qui reconnaît spécifiquement l'ADN hémiméthylé et catalyse la méthylation du nouveau brin. Les méthylations *de novo* sont quant à elles catalysées par les enzymes DNMT3s (codées par les gènes paralogues *dnmt3aa*, *dnmt3ba*, *dnmt3bb.1*, *dnmt3bb.2* et *dnmt3ab*) (Labbé et al., 2017).

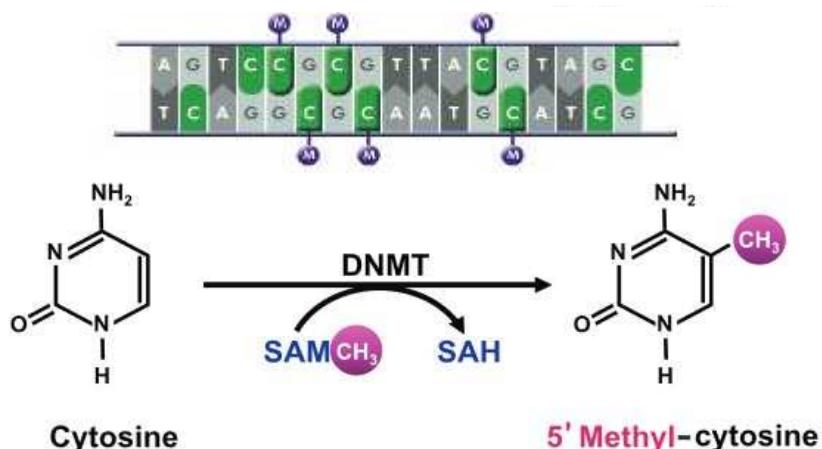


Figure 5 : Représentation schématique de la méthylation de l'ADN par une ADN-méthyltransférase (DNMT) dans un contexte CpG, convertissant une cytosine en 5'méthyl-cytosine. SAM = S-adenosylmethionine; SAH = S-adenosylhomocysteine (modifiée d'après Zakhari, 2013).

Méthylation de l'ADN chez les téléostéens

Chez les poissons, les modifications épigénétiques sont généralement liées à la température et à la qualité de l'eau à laquelle ils sont exposés (Labbé et al., 2017).

Il a été montré que lors de l'exposition de tilapias du Nil aux HTs durant la période thermosensible, le taux de méthylation du promoteur du gène *cyp19a1a* (codant pour l'aromatase) augmentait chez les individus XY et XX. De plus, l'expression de ce même gène diminuait

significativement chez les individus XX. Le même phénomène a été observé lors de l'exposition de larves indifférenciées de bars européens aux HTs. Chez ces deux espèces à déterminisme de type GSD + TE, l'effet masculinisant observé aux HTs pourrait donc être causé par la méthylation du promoteur du gène *cyp19a1a*. En effet, il a été suggéré par les auteurs que cette dernière serait à l'origine de la répression du gène et donc d'une baisse de l'expression de l'aromatase, induisant une diminution du taux d'estrogènes (Navarro-Martín et al., 2011; Wang et al., 2017).

1.5.2. Modification des histones

Les histones (H2A, H2B, H3 et H4) sont des protéines formant des octamères autour desquelles l'ADN s'enroule pour former la chromatine. Leur queue à l'extrémité N-terminale comprend plusieurs sites pouvant subir des modifications post-traductionnelle (dont la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation) (**figure 6**). Selon la combinaison de ces modifications, les histones présentent une énorme diversité de codes pouvant être lus par d'autres protéines régulant l'organisation de la chromatine et par conséquent la transcription de l'ADN (Lennartsson et Ekwall, 2009).

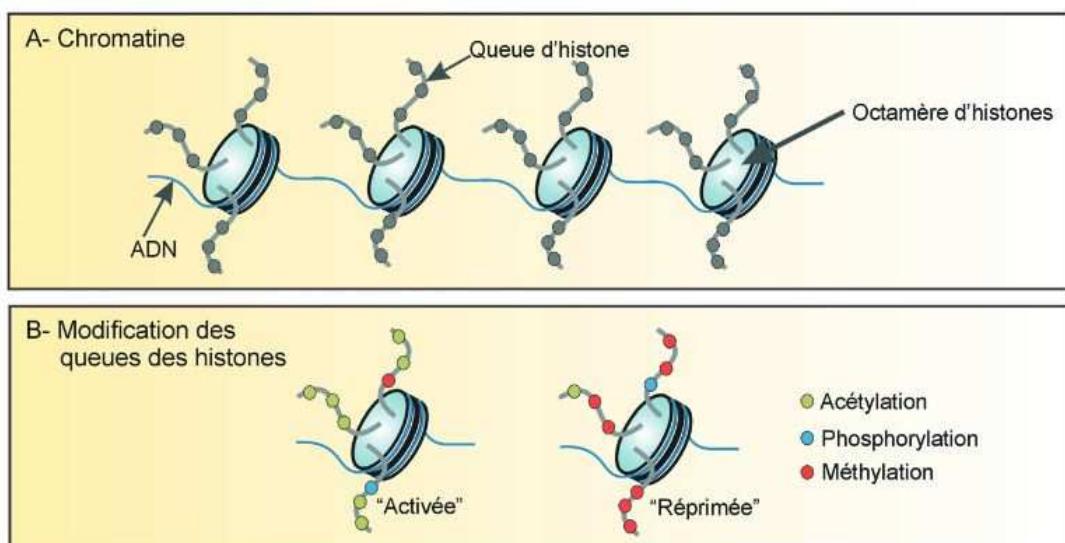


Figure 6 : A, complexe ADN-histones formant la chromatine. B, des marques épigénétiques (acétylation, méthylation, phosphorylation) se trouvent sur certains sites de la queue N-terminale des histones. Par exemple, l'acétylation de H3 entraîne un une décondensation de la chromatine, favorisant la transcription du gène, tandis que la méthylation peut soit activer, soit réprimer la transcription (modifiée d'après Jiang et al. 2008).

1.5.3. ARNs non codants

Le terme « ARN non codants » (ARNnecs) réfère à des ARNs qui ne codent pas pour des protéines. Il apparaît que, contrairement à ce qui a longtemps été pensé, la majorité du génome humain (98%) et d'autres organismes complexes n'est pas transcrit en protéines mais en ARNnecs pouvant agir dans la régulation épigénétique (Mattick et Makunin, 2006). Par exemple, les miARNs (microARNs) agissent par complémentarité au niveau des ARN messagers soit en les dégradant, soit en inhibant leur traduction en protéine (Bret & Schved, 2009). Ensuite, les lncARNs (long non coding ARNs) impactent également l'expression des gènes en se liant à des protéines impliquées dans la modification de la chromatine (Mercer et Mattick, 2013).

2. OBJECTIFS

Comme expliqué précédemment, le tilapia du Nil est une espèce de poisson d'un grand intérêt économique, dont le génome a été séquencé et annoté. Présentant un déterminisme sexuel de type GSD + TE, il représente un modèle particulièrement intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène. Les principaux objectifs poursuivis dans le cadre de ce mémoire sont les suivants :

- Générer de nouvelles données permettant d'évaluer le potentiel du traitement thermique précoce (appliqué durant le stade embryonnaire) à provoquer une inversion du sexe chez le tilapia du Nil.
- Déterminer pour la première fois quel est l'impact du traitement thermique précoce sur le transcriptome au niveau des gonades et du cerveau du tilapia du Nil et comparer cet impact à celui du traitement thermique tardif (appliqué entre 10 et 30 jpf).
- Au fil des reproductions d'un même couple de géniteurs de tilapias du Nil, tester la répétabilité des résultats de sexe ratio et de transcriptomique chez leurs descendances exposées au traitement thermique précoce et tardif.

Enfin, un objectif secondaire de ce mémoire est de mettre au point la méthodologie de l'étude du méthylome basée sur une nouvelle technologie de séquençage haut débit (3^{ème} génération) : la technologie du Nanopore.

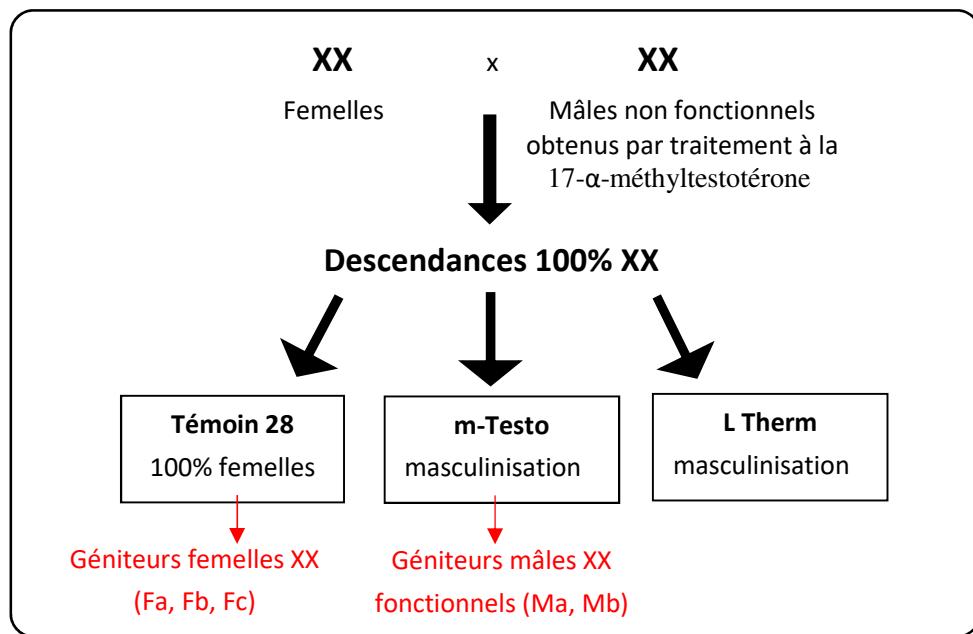


Figure 7 : Origine des femelles génitrices XX et des génératrices XX fonctionnelles ayant servi à générer une descendance 100% XX pour l'étude.

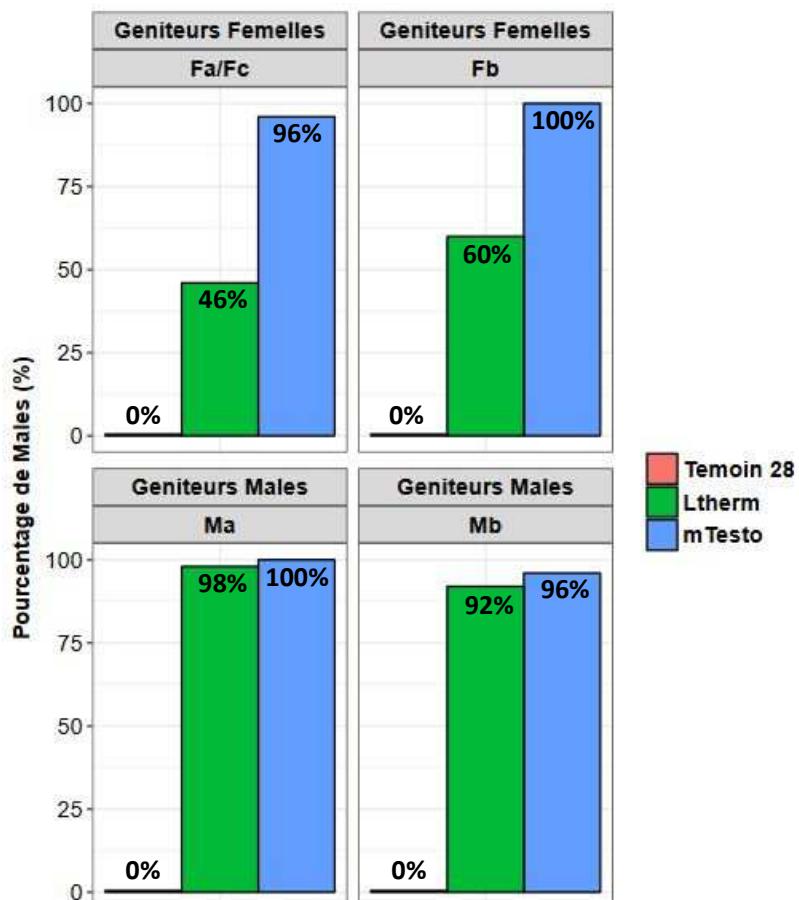


Figure 8 : Taux de masculinisation chez les différentes familles des génératrices suite aux traitements thermique (HTs) et hormonal (17- α -méthyltestostérone). Les 4 graphiques correspondent aux 4 familles de génératrices. Fa = femelle a, Fb = femelle b, Fc = femelle c, Ma = mâle a, Mb = mâle b.

3. MATERIEL ET METHODES

Tous les protocoles d'élevage et de prélèvements de ce travail ont été approuvés par la commission d'éthique locale de l'U Liège (n°1747).

3.1. Géniteurs

Les tilapias du Nil ayant servis de modèle à cette étude sont issus de la souche domestiquée du Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (CEFRA) de l'université de Liège originaire de la souche égyptienne (lac Manzala).

Pour les besoins du projet, une descendance 100% XX devait être produite. Pour ce faire, deux mâles XX fonctionnels (Ma, Mb) ainsi que trois femelles XX (Fa, Fb, Fc) ont été sélectionnés.

La **figure 7** présente comment les géniteurs ont été obtenus lors d'une expérience préalable. Des croisements sont d'abord effectués entre des femelles XX et des néomâles XX obtenus par traitement à la 17- α -méthyltestostérone (50mg/kg d'aliment entre 10 et 40 jpf). Notons que ces néomâles étaient non-fonctionnels (le sperme ne pouvait être récupéré via le canal déférent) et ont donc dû être sacrifiés afin de prélever leurs gonades. La descendance a ensuite été divisée en 3 lots. L'un des lots a été élevé à 28°C (température optimale d'élevage) et était 100% femelles (« témoin 28 ») tandis que les deux autres lots ont subi un traitement thermique tardif aux HTs durant la période de différenciation des gonades pour l'un (« Ltherm ») et un traitement hormonal à la 17- α -méthyltestostérone (50mg/kg de nourriture entre 10 et 40 jpf) pour l'autre (« m-Testo ») afin d'obtenir un certain taux de masculinisation.

Les 4 graphiques de la **figure 8** montrent la sensibilité aux traitements masculinisants des 4 familles dont sont issus les géniteurs. Après sexage, on observait que la masculinisation était totale ou presque pour les lots « m-Testo » (entre 96 et 100% de mâles) mais qu'elle était plus variable en fonction des familles pour les lots « L Therm » (entre 46 et 98% de mâles). Enfin, en ce qui concerne les lots « témoin 28 » n'ayant pas subi de traitement, leur sexage n'avait pas révélé la présence de mâles.

Les femelles Fa, Fb et Fc sélectionnées comme génitrices pour la présente étude sont originaires de lots « Témoin 28 » (les femelles Fa et Fc font partie de la même descendance), tandis que les mâles Ma et Mb proviennent de lots « m-Testo », ces derniers étant fonctionnels et pouvant donc servir de géniteurs sans être sacrifiés.

Représentation générale du dispositif d'élevage

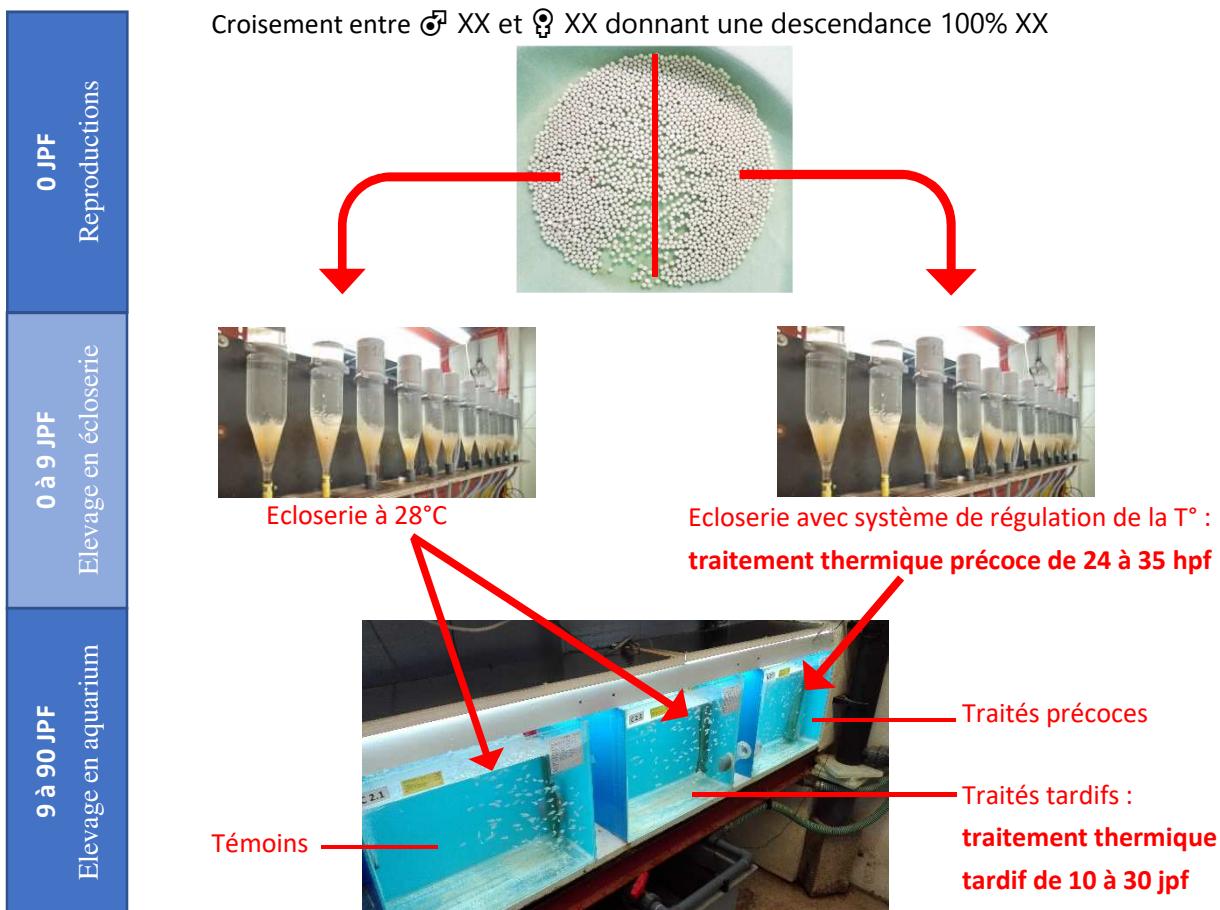


Figure 9 : Représentation générale du dispositif d'élevage au CEFRA de l'université de Liège.

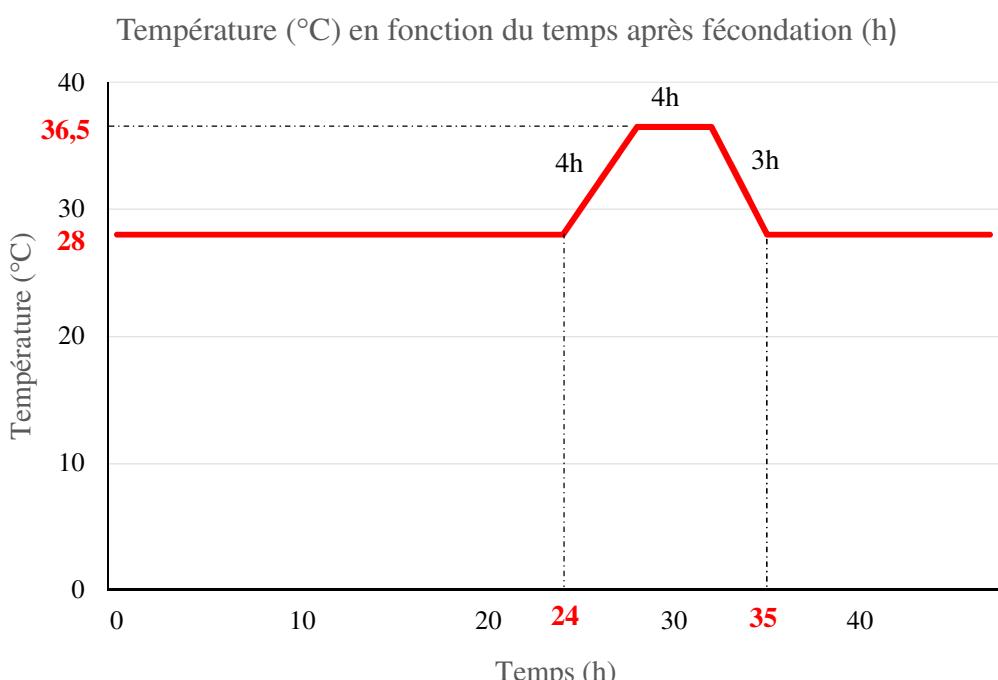


Figure 10 : Evolution de la température de l'eau de l'écloserie (°C) en fonction du temps (h) pour les individus soumis au traitement thermique précoce

3.2. Pontes et reproductions

Les femelles sur le point de pondre sont reconnaissables à leur papille génitale protubérante. Leurs aquariums sont surveillés à l'aide d'une caméra afin de détecter les signes précurseurs de la ponte (peu active, ne mangeant pas et grattant le fond de l'aquarium). Lorsque ces signes se présentent, la qualité et la maturité des ovocytes est vérifiée par striping (massage délicat au niveau du ventre pour expulser les œufs). Ceux-ci doivent être assez gros, nombreux et sans présence de sang.

La fécondation est ensuite réalisée manuellement, après avoir anesthésié le mâle et la femelle dans un bain de benzocaïne (0,4 ml/L). Les œufs et le sperme sont récoltés dans un contenant sec (toujours par striping). La fécondation débute dès l'ajout d'eau provenant de l'écloserie et est favorisée par une très légère agitation (durant 2 min 30). Les œufs sont ensuite rincés, traités contre les parasites (30 min dans de l'eau oxygénée à 400 ppm), puis à nouveau rincés et comptés.

3.3. Elevage en écloserie et traitement thermique précoce

La **figure 9** représente de façon schématique les différentes étapes du dispositif d'élevage abordées ci-après.

Les œufs de chaque croisement sont d'abord répartis en 2 lots et placés dans des écloseries distinctes équipées de bouteilles de Zoug avec un flux d'eau entrant par le bas (**figure 9**). Notons que les conditions de confinement et d'oxygénation étaient proches de celles rencontrées lors de l'incubation naturelle dans la bouche de la mère.

L'un des deux lots (le lot « Etherm ») se compose des individus allant être soumis à un traitement thermique précoce 24 heures après fécondation et est donc été transféré dans une écloserie reliée à un système de régulation de la température de l'eau. L'autre lot (le lot « contrôle ») n'a pas subi de traitement à ce stade (écloserie à 28°C).

Déroulement du traitement thermique précoce du lot « Etherm »

Le graphique de la **figure 10** présente l'évolution de la température (°C) en fonction du temps après fécondation (en heures) pour le lot d'individus soumis au traitement thermique précoce (« Etherm »). Une température de 28°C est d'abord maintenue jusqu'à 24 heures post-fécondation (hp). La température de l'eau de l'écloserie augmente ensuite graduellement pour atteindre 36,5°C à 28 hp (en 4 heures). Cette température de 36,5°C est maintenue 4 heures, jusqu'à 32 hp, puis redescendait graduellement en 3h pour à nouveau atteindre 28°C à 35 hp.

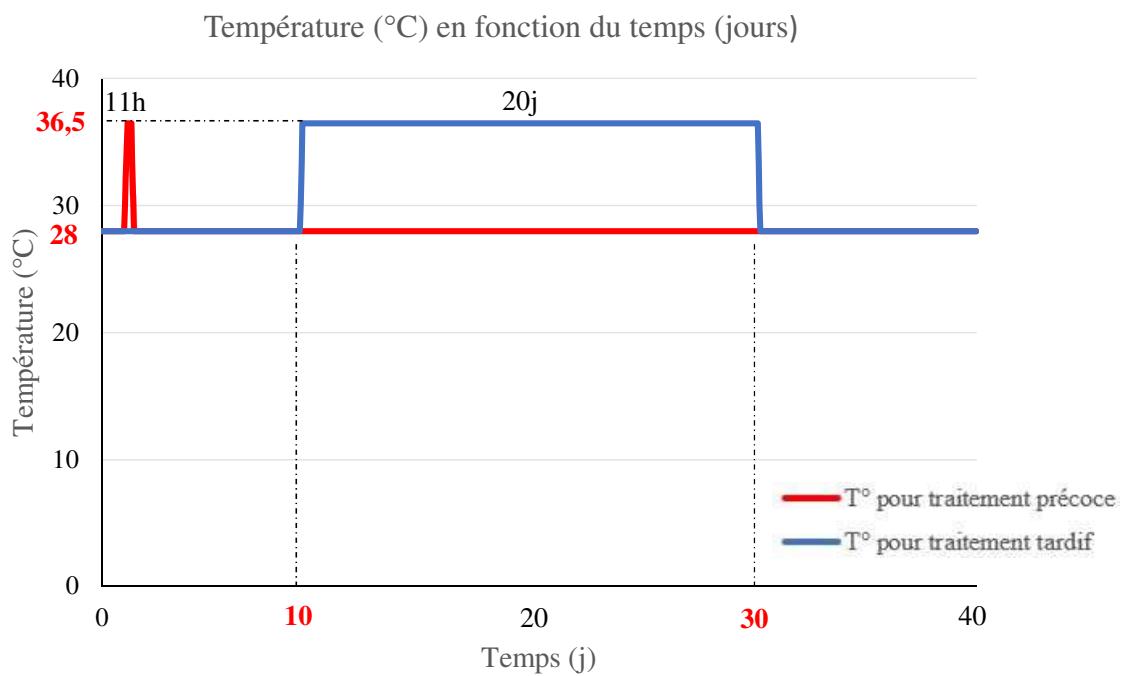


Figure 11 : Evolution de la température de l'eau de l'écloserie puis des aquariums de 50 L (à partir de 9 jpf) en fonction du temps pour le lot soumis au traitement précoce (en rouge) et le lot soumis au traitement tardif (en bleu).

3.4. Elevage des juvéniles et traitement thermique tardif

À 9 jpf, les juvéniles du lot « contrôle » qui jusque-là étaient élevés ensemble en bouteille de Zoug sont séparés en deux groupes correspondant aux témoins (lot « Témoin28 ») et au traitement tardif (lot « LTherm »). Ainsi, l'ensemble des juvéniles est réparti dans 3 aquariums distincts de 50 litres chacun : un premier pour les individus témoins (« Témoin28 »), un deuxième pour les individus ayant subi le traitement précoce (« ETherm ») et un troisième pour les individus allant être soumis au traitement tardif à partir de 10 jpf (« LTherm ») (**figure 9**). Notons cependant que nous n'avons pas constitué de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2 car une mortalité importante est survenue dans son lot « Contrôle » durant l'élevage larvaire. De plus, nous disposions des lots « Témoin 28 » des descendances MaFa_1 et MaFa_2 qui étaient issues des mêmes géniteurs.

Déroulement du traitement thermique tardif du lot « LTherm »

Sur le graphique de la **figure 11**, l'évolution de la température de l'eau en fonction du temps pour le lot soumis au traitement thermique tardif (« LTherm ») est représentée par la courbe bleue. A titre de comparaison, l'évolution de la température pour le lot soumis au traitement thermique précoce (d'une durée totale de 11h) est également représenté par la courbe rouge (« ETherm »).

Le traitement thermique tardif s'est déroulé comme suit : à partir de 10 jpf, la température est progressivement passée de 28°C à 36,5°C (en environ 3h à raison de 1°C supplémentaire toutes les 20 min). La température de 36,5°C est maintenue durant 20 jours, soit jusqu'à 30 jpf, avant de revenir à nouveau à 28°C.

L'âge auquel appliquer le traitement thermique tardif ainsi que la température et la durée de ce dernier ont été déterminés sur base d'une précédente étude. Il avait été observé que la proportion de mâles obtenue après traitement augmentait significativement si le traitement commençait au plus tard à 13 jpf, si la température avoisinait 36°C et si le traitement avait une durée minimale de 10 jours (Baroiller et al., 1995).

3.5. Echantillonnages à 15 jpf et à 40 jpf

Les prélèvements ont lieu à 2 moments différents du développement des juvéniles. Le premier prélèvement est effectué à 15 jpf, moment à partir duquel les gonades peuvent être isolées sous binoculaire. A ce stade, les lots « Ltherm » sont également en début de traitement thermique tardif, les analyses ultérieures doivent donc mettre en évidence les premiers gènes différentiellement exprimés (GDEs) lors de ce traitement (par rapport aux lots « Témoin 28 »). Le deuxième prélèvement est

effectué à 40 jpf, juste après le traitement thermique tardif. Les GDEs dans les lots « Ltherm » ne devraient donc plus comprendre les gènes liés au stress thermique mais seulement ceux liés à une inversion du sexe. Les lots « Etherm » sont prélevés aux mêmes stades afin que les analyses des GDEs soient comparables à celles des lots « Ltherm ». Si possible, au moins 50 poissons sont prélevés.

Après prélèvement, les poissons sont sacrifiés en les plongeant dans un bain de benzocaïne en surdose (2ml/l), puis pesés. Les têtes sont ensuite séparées des troncs et les tissus sont fixés par lots de 20 individus dans des tubes Falcon remplis de RNA later (à raison de 10 fois le volume de poissons au minimum). Le RNA later est une solution aqueuse très concentrée en sulfate d'ammonium, à un pH contrôlé, qui permet la préservation de l'ARN des tissus frais en pénétrant dans les cellules et en entraînant la précipitation des RNases et des autres protéines solubles (Mutter et al., 2004). Enfin, les échantillons sont stockés une nuit à 4°C puis à -20°C jusqu'aux dissections.

3.6. Calcul des taux de survie de 0 à 9 jpf et de 10 à 100 jpf

Le taux de survie de 0 à 9 jpf (TS9) a été déterminé pour les lots « contrôle » et « ETherm » à l'aide de la formule suivante :

$$TS9 = \frac{\text{nombre individus à 9 jpf}}{\text{nombre d'oeufs au départ}} \times 100$$

TS9 dépend donc à la fois du taux de fécondation des œufs, du taux d'éclosion ainsi que du taux de survie après l'éclosion (de 24 hpf à 9 jpf).

Le taux de survie entre 10 et 100 jpf (TS100) a également été déterminé pour les lots « Témoin 28 », « ETherm » et « LTherm » à l'aide de la formule suivante :

$$TS100 = \frac{\text{nombre individus à 100 jpf}}{\text{nombre individus à 9jpf} - \text{nombre individus prélevés pour analyses}} \times 100$$

Les poissons ayant été sacrifiés pour les analyses ont été soustraits au nombre initial de poissons à 9 jpf pour ne pas être pris en compte dans le TS100.

3.7. Sexages et calcul du facteur d'inversion sexuelle

Les sexages des différents lots (témoins, traitement précoce et traitement tardif de chaque famille) ont eu lieu entre 4 et 5 mois après fécondation. Pour chaque lot et lorsque cela était possible, au moins 50 poissons ont été prélevés pour être sexés (**tableau 3**). Après sacrifice, une incision était pratiquée le long du ventre à partir de l'anus puis prolongée sur le flanc jusqu'à la nageoire pectorale.

Les viscères étaient ensuite écartées pour prélever un morceau de gonade. Celui-ci était ensuite placé entre lame et lamelle et imbibé de carmin acétique selon la méthode « squash » afin de colorer les tissus (Guerrero et Shelton, 1974). Le sexe du poisson était alors déterminé au microscope selon l'aspect du tissu gonadique (**figure 12**).

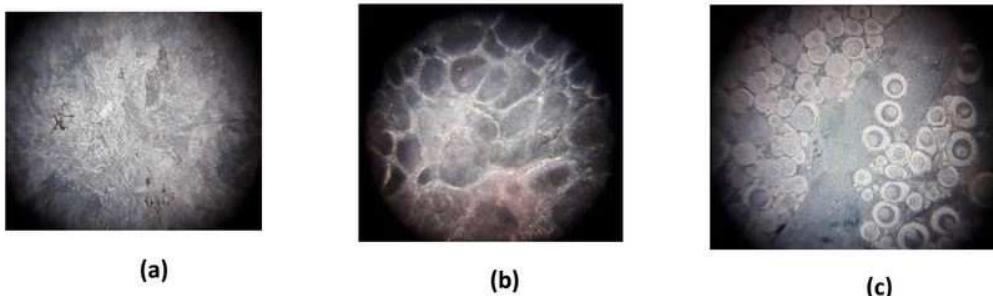


Figure 12 : Observation des gonades de tilapia du Nil au microscope (objectif X10) : (a) le tissu gonadique mâle se présente sous forme d'un enchevêtrement lobulaire, (b) et (c) le tissu gonadique femelle se compose d'ovocytes bien visibles (Tidjou, 2018).

Afin d'évaluer et de comparer l'importance de la masculinisation au sein des différentes familles suite aux traitements, nous avons calculé un facteur d'inversion du sexe (FI) en nous basant sur les pourcentages de femelles dans les lots traités et dans les lots témoins :

$$FI = \frac{\% \text{ de femelles dans lot traité} - \% \text{ de femelles dans lot témoin}}{\% \text{ de femelles dans le lot témoin}}$$

FI rend donc compte de l'importance de la masculinisation par rapport au pourcentage de femelles présentes dans le lot témoin (et donc susceptibles d'être masculinisées). Ainsi, plus FI est négatif, plus la masculinisation suite au traitement est importante. S'il est égal à 0 ou supérieur à 0, il n'y pas de masculinisation et s'il est égal à -1, la masculinisation est totale. Notons que si nous avons choisi de nous baser sur le pourcentage de femelles, c'est parce que les gonades de ces dernières étaient plus facilement identifiables au microscope par rapport à celles des mâles.

3.8. Prélèvement des gonades pour les analyses transcriptomiques

Les échantillons préalablement fixés par lots de 20 poissons dans du RNAlater ont été décongelés au fur et à mesure de l'avancement des dissections. Les têtes sont transférées dans un nouveau tube Falcon et refroidies dans l'azote liquide (-195,79°C). Les troncs sont disséqués sous binoculaire dans du RNAlater. Ils sont ouverts ventralement sur la longueur puis les flancs et les viscères étaient écartés afin de dégager les gonades se trouvant du côté dorsal. Les gonades sont prélevées à l'aide d'une micropince en évitant d'emporter tout autre tissu. Elles sont ensuite déposées dans un tube Eppendorf de 2 ml également refroidi dans l'azote liquide. Enfin, les échantillons sont transférés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN et de l'ADN.

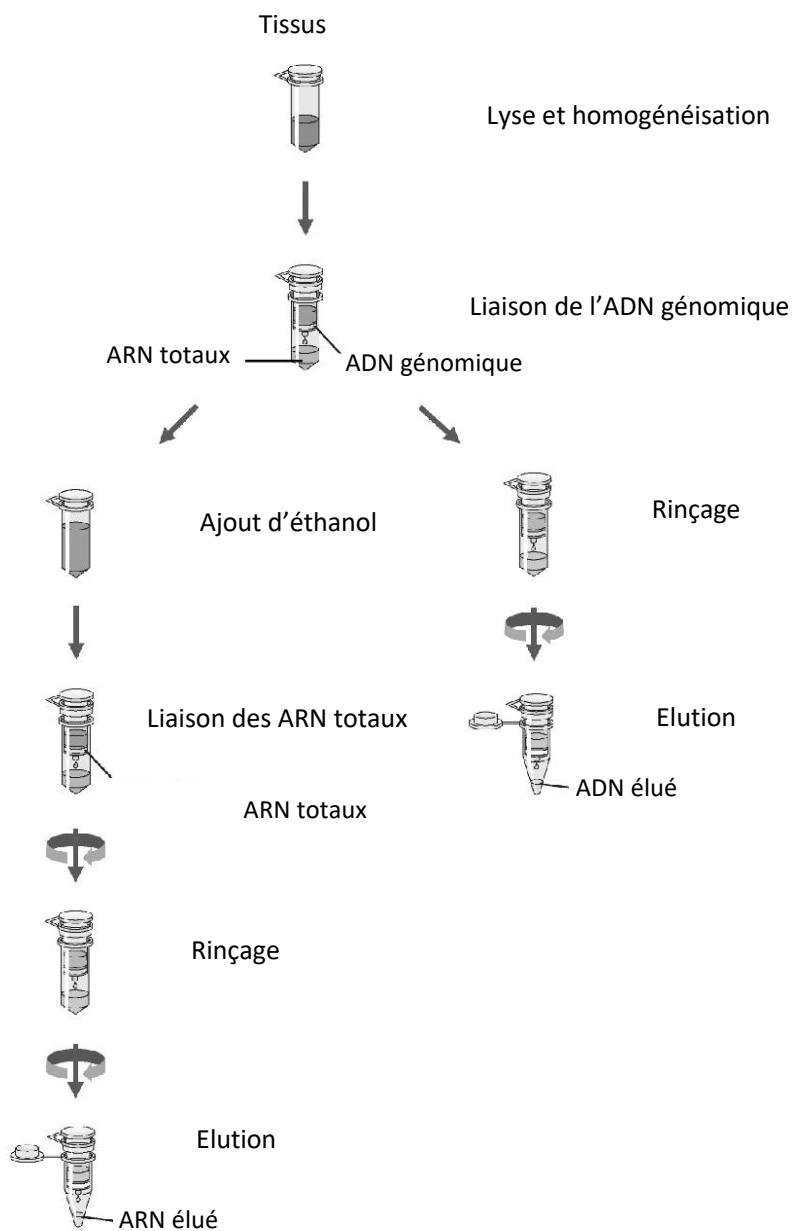


Figure 13 : Procédure d'extraction de l'ARN et de l'ADN sur des colonnes en silice à l'aide des kits « All prep DNA/RNA » de QIAGEN®.

3.9. Extractions de l'ARN et de l'ADN

Les extractions de l'ARN et de l'ADN des échantillons sont effectuées sur des colonnes en silice à l'aide des kits « All prep DNA/RNA » de QIAGEN® dans la version « Mini » pour les têtes et dans la version « Micro » pour les gonades. Notons qu'avant de pouvoir être extraits, les échantillons de têtes sont préalablement réduits en poudre dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon.

Les versions « Mini » et « Micro » suivent des protocoles similaires (voir sur le site web QIAGEN®), les grandes étapes communes aux deux versions sont décrites ci-dessous et représentées schématiquement à la **figure 13**.

Déroulement des extractions

a) Lyse des échantillons

Entre 20 et 30 mg de tissu pour les têtes et une quantité inférieure à 5 mg de tissu pour les gonades sont lysés dans un tampon de lyse composé entre autres de thiocyanate de guanidine et de β -mercaptoéthanol (pour l'inactivation des nucléases DNAses et RNAses). Les échantillons sont ensuite homogénéisés par passage à travers l'aiguille d'une seringue (répété 7 fois).

b) Isolation de l'ADN génomique

Après centrifugation du lysat, le surnageant est transféré sur une colonne de purification de l'ADN. Après passage à travers la membrane par centrifugation, cette dernière contenant l'ADN est conservée sur glace tandis que l'éluat est récupéré pour en extraire l'ARN.

c) Purification des ARNs totaux

Après ajout d'un volume d'éthanol 70 % à l'éluat de l'étape b), l'échantillon est transféré sur une colonne de purification de l'ARN puis centrifugé. Afin de s'assurer de n'avoir aucune contamination par de l'ADN, une digestion par DNase I (QIAGEN®) est ensuite opérée sur la membrane. Après rinçages et séchage, l'ARN est élut par centrifugation dans de l'eau RNAses free (30 μ l pour les têtes et environ 22 μ l pour les gonades). Notons que l'étape de séchage est effectuée à tubes fermés pour éviter toute contamination par des RNAses (7 min pour les gonades et 2 min pour les têtes).

d) Purification de l'ADN génomique

Après rinçage, l'ADN est élut par centrifugation dans un tampon d'élution (50 μ l pour les têtes et 2x30 μ l pour les gonades).

e) Contrôle de la qualité des échantillons d'ARN et d'ADN

Un premier contrôle de la qualité des échantillons d'ADN et d'ARN est effectué au NanoDrop (spectrophotomètre) sur base des absorbances des acides nucléiques et d'éventuels contaminants :

Eléments	Absorbance
Acides nucléiques	260 nm
Protéines	280 nm
EDTA, phénols, carbohydrates	230 nm

Ainsi, le rapport 260/280 permet de déterminer si des protéines contaminent les échantillons d'ARN ou d'ADN. Le ratio doit être proche de 2.04 pour les échantillons d'ARN et de 1.8 pour les échantillons d'ADN, un ratio plus bas que ces valeurs de référence indiquant une contamination par des protéines.

D'autre part, le rapport 260/230 met en évidence la contamination par des composés organiques qui pourraient interférer avec les applications en aval. Un échantillon est considéré comme pur lorsque le ratio se situe entre 2 et 2.2. Par contre, un échantillon dont le ratio est inférieur à 2.0 est considéré comme comportant une quantité significative de contaminants.

Le NanoDrop fournit également une première estimation de la concentration en ARN et en ADN (ng/ μ l).

Nous procédons à une étape de purification supplémentaire pour les échantillons ayant un rapport 260/230 trop faible. Pour les échantillons d'ARN totaux, il s'agit d'une précipitation au chlorure de lithium (LiCl) (protocole à l'**annexe 10 A**). Après rinçage à l'éthanol 70%, l'ARN précipité est resuspendu dans 25 μ l d'eau RNAses free. Quant à l'ADN (protocole à l'**annexe 10 B**), il est d'abord précipité par l'ajout d'acétate d'ammonium. Après rinçage à l'éthanol glacial 70%, il est remis en suspension dans 30 μ l de tampon contenant du Trishydroxyméthylaminométhane (Tris) HCl à pH 8,0.

f) Conservation des échantillons

Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C et les échantillons d'ARN à -80°C.

3.10. Contrôle de la qualité des ARNs totaux

La qualité des échantillons d'ARNs du point de vue de leur intégrité est contrôlée au bioanalyzer. Ce dernier permet l'analyse quantitative et qualitative des acides nucléiques par électrophorèse capillaire en quantifiant ceux-ci selon leur taille (temps de migration), comme illustré sur l'électrophérogramme présenté à la **figure 14**. Le bioanalyzer fournit une valeur de RIN (RNA integrity number) pouvant aller de 0 à 10 et devant théoriquement être supérieure à 8 pour assurer une qualité suffisante des ARNs totaux. Cette valeur se base notamment sur le rapport quantitatif des sous-unités ribosomiales 28S/18S qui est théoriquement proche de 2 en l'absence de dégradation (le poids moléculaire de la grande sous-unité étant deux fois supérieur à celui de la petite sous-unité ribosomiale). Notons que sur l'électrophérogramme (**figure 14**), les ARNm qui nous intéressent pour la constitution des bibliothèques se situent entre les deux pics correspondant aux sous-unités ribosomiales (Inter region).

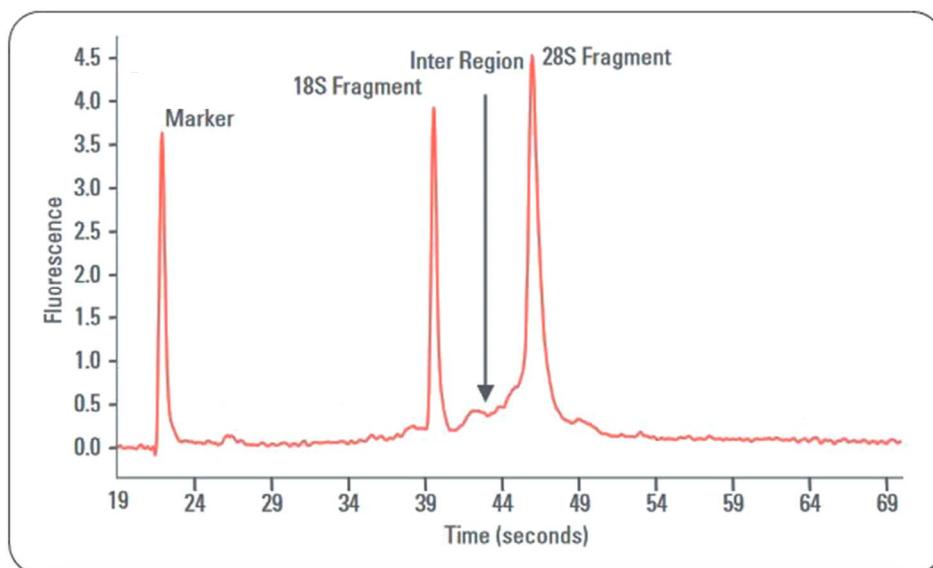


Figure 14 : Electrophérogramme indicatif de la qualité de l'ARN (modifiée d'après Mueller et al. 2016).

3.11. Séquençage des ARNm

Afin de pouvoir procéder à une analyse qualitative et quantitative de l'expression des gènes dans le cerveau et les gonades des tilapias, les ARNm provenant des échantillons d'ARN totaux sont d'abord isolés. Une transcription réverse est alors opérée à partir de ces ARNm afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc), plus stable que l'ARN et représentant la partie codante du génome au moment de la mort des individus. L'ADNc est ensuite amplifié avant d'être séquencé.

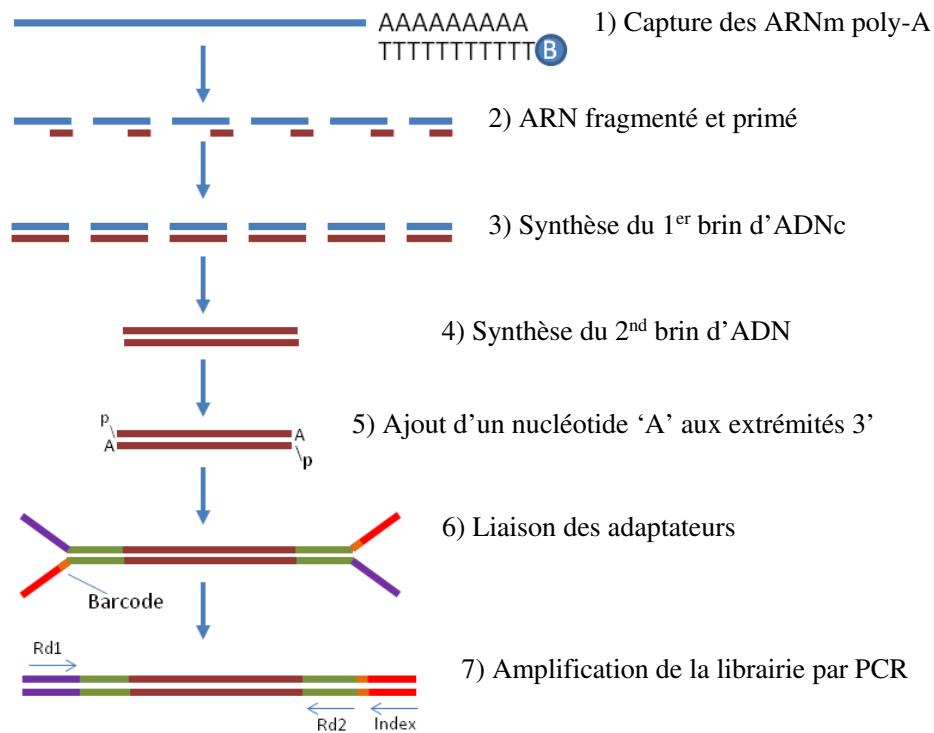


Figure 15 : Etapes de la préparation de librairies d'ARN par la méthode Illumina (modifiée d'après Corney et al. 2013).

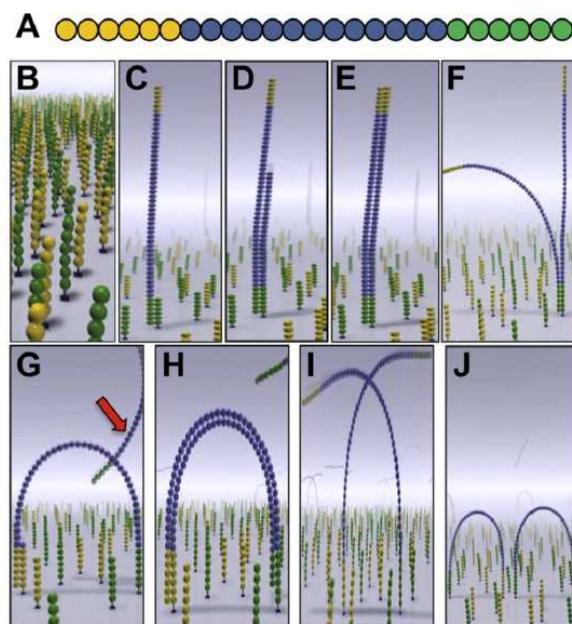


Figure 16 : Représentation schématique de l'enrichissement des brins d'ADN par « bridge PCR » utilisée par la plateforme de séquençage Illumina. (A) La séquence d'ADN d'intérêt est représentée en bleu et se trouve entre des adaptateurs en jaune et en vert. (B) La surface de la « flowcell » est recouverte d'un champ très dense d'oligonucléotides servant d'amorces et dont les séquences sont complémentaires aux adaptateurs. (C) Les fragments d'ADN s'hybrident de manière aléatoire à ces amorces. (D et E) La synthèse d'une séquence d'ADN complémentaire au brin hybride est initiée par l'amorce (en vert). (F et G) La séquence synthétisée *de novo* se dissocie du brin ayant servi de matrice et s'hybride à une amorce adjacente (en jaune), formant un pont, tandis que le brin matrice se retire (flèche rouge). (H) Une nouvelle séquence se prolonge à partir de la nouvelle amorce (« bridge amplification »). (I) Les deux brins se dissocient. (J) Les extrémités non-attachées se lient à de nouvelles amorces et un nouveau cycle commence (Anasagasti et al. 2012).

Toutes les étapes de préparation des librairies d'ARN (de l'isolation des ARNm à l'amplification des fragments d'ADNc) sont effectuées au laboratoire du GIGA à l'aide du kit Illumina® TruSeq Stranded mRNA. Quant au séquençage, il est effectué par la plateforme génomique du GIGA.

a) *Préparation des librairies d'ARN*

La **figure 15** est une représentation schématique des étapes de la préparation des librairies d'ARN décrites ci-dessous :

- (1) Les ARNm sont tout d'abord isolés à l'aide de billes magnétiques porteuses d'oligo-dT capable de s'hybrider à la queue poly-A des ARNm eucaryotiques (en 2 séries de capture/élution).
- (2) Durant la seconde élution des ARNm poly-A, ces derniers sont également fragmentés et des hexamères aléatoires (oligonucléotides) s'y hybrident pour servir d'amorce à la synthèse d'ADNc.
- (3) La synthèse du premier brin d'ADNc consiste en la transcription inverse des fragments d'ARN grâce à une reverse transcriptase.
- (4) Les ARN ayant servi de modèles au premier brin sont retirés et un second brin d'ADN incorporant des nucléotides 'U' à la place des nucléotides 'T' est synthétisé. L'incorporation de 'U' « éteint » le second brin pendant l'amplification (voir étape 7).
- (5) Un nucléotide 'A' est ajouté aux extrémités 3' des fragments. Cette manière de procéder les empêche de s'unir entre eux au moment de la ligation des adaptateurs.
- (6) Des adaptateurs sont liés aux extrémités des doubles brins d'ADN, les préparant ainsi pour leur hybridation sur la « flowcell » du séquenceur Illumina. Un index spécifique à chaque échantillon (« barcode » en orange) est également incorporé afin de pouvoir identifier l'origine des fragments.
- (7) Une fois générée, la librairie est amplifiée par PCR (15 cycles) de façon à augmenter la quantité de matériel d'une part et, d'autre part, de diminuer de façon exponentielle la présence du second brin marqué par des U à la place des T au niveau de l'étape 4, la polymérase n'incorporant pas ce nucléotide. Cette dernière permet d'avoir *in fine* une librairie brin spécifique facilitant les analyses bio-informatiques en aval.
- (8) Les fragments ayant des molécules d'adaptateurs aux deux extrémités sont enrichis par PCR sur la « flowcell » et forment des clusters (des groupes de fragments identiques). La **figure 16** présente le déroulement détaillé de la PCR.

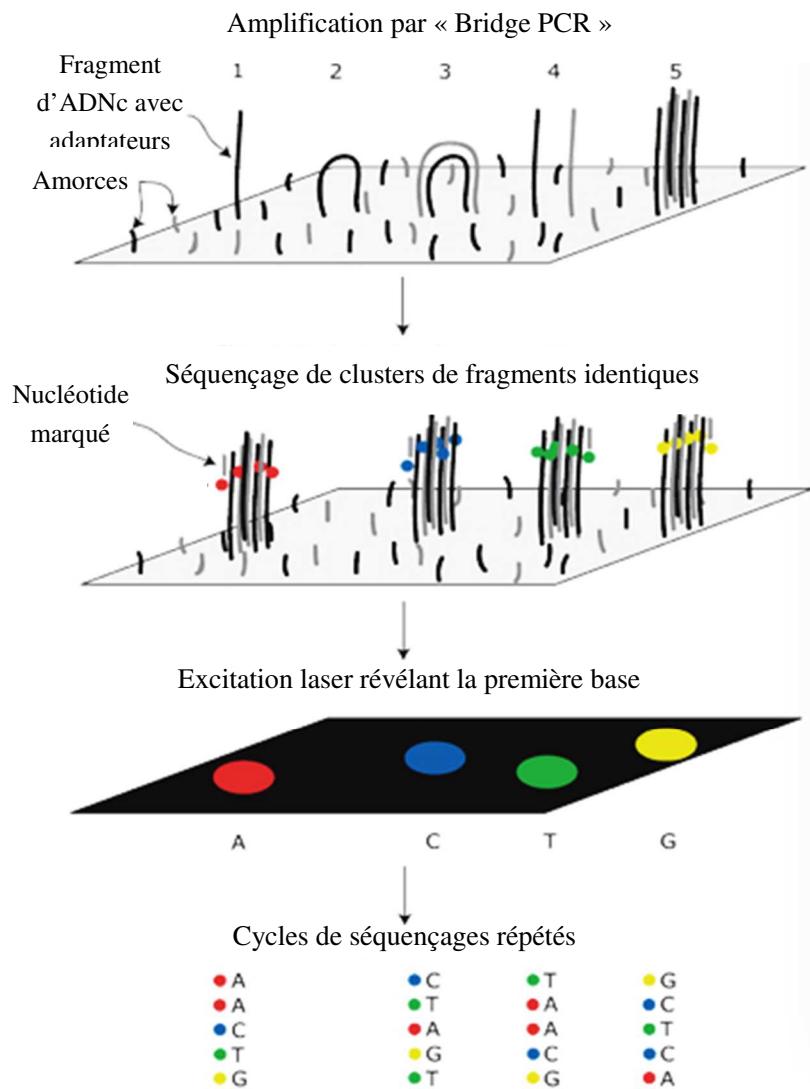


Figure 17 : Séquençage à haut débit par excitation laser (Lopopolo et Lonie, 2017).

b) Séquençage

Après que la PCR ait formé des clusters de milliers de séquences identiques, chaque cluster est séquencé base par base en utilisant des nucléotides marqués (**figure 17**). A chaque fois qu'un nucléotide marqué est ajouté par une polymérase à l'extrémité 3' du nouveau brin, il est excité par un rayon laser et émet un spectre de fluorescence spécifique l'identifiant comme 'A', 'T', 'C' ou 'G'. Cette méthode permet de séquencer l'ADNc issu des ARNm d'intérêt ainsi que les indexes servant à identifier l'origine des fragments.

3.12. Contrôle de la qualité de l'ADN génomique

La taille des fragments d'ADN, et donc son état de dégradation, est contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose (protocole à l'**annexe 10 C**) : l'ADN chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates migre sur une certaine distance dans un champ électrique en fonction de son poids moléculaire puis est révélé grâce à la présence d'un agent intercalant fluorescent (SYBR safe).

Enfin, une analyse au PicoGreen® (protocole à l'**annexe 10 D**) a permis de quantifier l'ADN de façon très précise. La concentration (ng/ μ l) est alors déterminée en mesurant l'intensité de la fluorescence d'un réactif ultra-sensible spécifique à l'ADN double brin, puis en la reportant sur une courbe étalon.

3.13. Mise au point de la méthodologie de l'étude du méthylome

Les essais de séquençage de l'ADN ont été réalisés grâce au MinION, un séquenceur portable basé sur une nouvelle technologie de séquençage haut débit (3^{ème} génération) : la technologie du Nanopore (**figure 18**).

a) Principe

Le principe général est de faire passer base par base les molécules d'ADN (et à terme d'ARN) à travers un pore protéique enchâssé dans une membrane. De part et d'autre de la membrane, une tension est appliquée de sorte que les ions présents en solution passent à travers le pore et génèrent un courant ionique. En passant au travers du Nanopore, les bases de l'ADN vont interagir avec ce courant ionique, le modifiant en fonction de leur nature (A, T, G ou C). La mesure de la différence de courant (exprimée en pico-ampère) est analysée en temps réel et permet *in fine* de connaître la séquence d'ADN qui a traversé le canal.

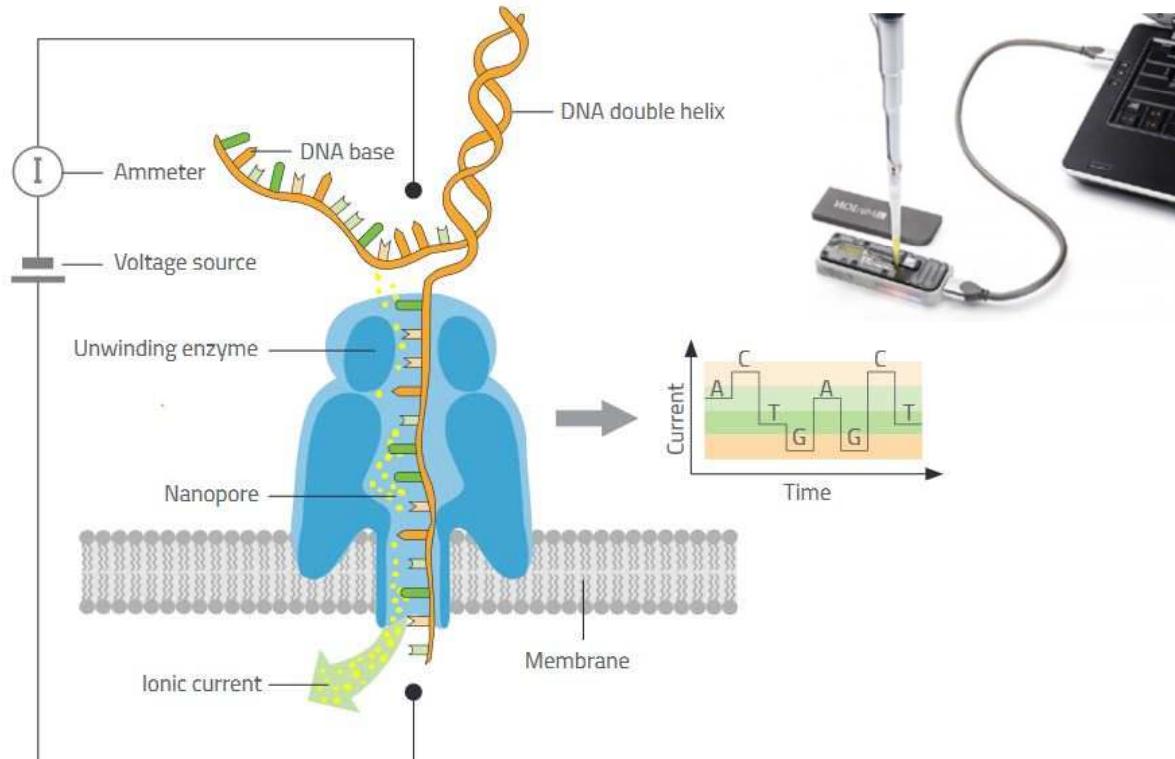


Figure 18 : Technologie du Nanopore pour le séquençage de l'ADN (modifiée d'après Göpftrich et Judge, 2018).

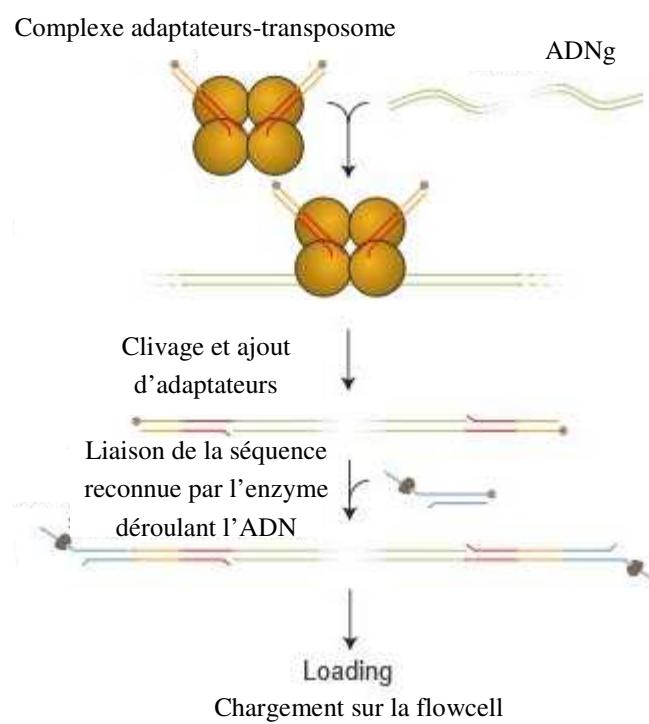


Figure 19 : Génération d'une librairie à partir d'ADN génomique extrait pour séquençage par la technologie du Nanopore (modifiée d'après le site web de Oxford Nanopore technologies).

Chaque flowcell utilisée (R9.4) est (1) à usage unique (2) composée d'au moins 1400 pores actifs lors de la livraison et (3) utilisable durant 48 heures de séquençage consécutives, ce qui correspond à au moins 5 Gb séquencées. Cette technologie permet de séquencer des molécules d'ADN très longues d'un seul coup, réduisant la complexité de l'assemblage. De plus, les signaux du courant ionique sont également sensibles aux modifications des bases, ce qui permet notamment de détecter les cytosines méthylées (5-mC) directement, sans procéder aux modifications chimiques de l'ADN nécessaires dans les autres technologies de séquençage (Simpson et al., 2017). Enfin, cette méthode est applicable facilement, ne nécessitant pas de constructions de librairies complexes et couteuses. Néanmoins, quelques limitations existent encore : d'une part, au niveau de la précision de séquençage qui est supérieure à 90% mais inférieure à la précision de séquençage par synthèse d'Illumina et d'autre part, au niveau de la quantité séquencée par flowcell qui dépend fortement de la qualité de l'ADN de départ (5Gb minimum jusque 20-30 Gb maximum).

b) Mise en oeuvre

Les échantillons doivent correspondre aux conditions suivantes :

- le rapport 260/280 au NanoDrop doit être supérieur à 1,86 ;
- le rapport 260/230 au NanoDrop doit être compris entre 2 et 2,2 ;
- la concentration quantifiée au PicoGreen® ne doit pas être plus de 3 fois inférieure ou supérieure à la concentration indiquée par le NanoDrop ;
- la taille des fragments doit idéalement être supérieure à 30 kb.

La concentration molaire d'ADN à introduire dans le MinION doit se situer entre 5 et 50 fM. Le volume d'échantillon d'ADN à prélever pour atteindre cette quantité a été déterminé sur base de la concentration mesurée au PicoGreen® (ng/ml) et de la longueur des fragments estimée par électrophorèse sur gel (kb). De l'eau RNAses free a ensuite été ajoutée, sachant que pour 400 ng d'ADN le volume final doit être de 7,5 µl.

L'étape suivante consistait en la préparation des librairies (**figure 19**) : les brins d'ADN sont refragmentés à l'aide d'un complexe adaptateurs-transposome qui s'insère aléatoirement au niveau de l'ADN et ajoute les adaptateurs aux extrémités des fragments. Une séquence reconnue par l'enzyme permettant de dérouler l'ADN simple brin à travers le pore vient ensuite se lier à ces adaptateurs. 75 µl des librairies ainsi obtenues ont été insérés en goutte à goutte sur la flowcell du séquenceur portatif (MinION).

3.14. Analyses statistiques

3.14.1. Sexe ratios et survies

Toutes les données sont traitées dans R (v3.4.4). Un modèle linéaire généralisé est généré pour chaque donnée avec pour variable indépendante le traitement. Un test *post hoc* de Tukey est appliqué pour les différents paramètres (pourcentages de femelles, facteur d'inversion, taux de survie) en fonction du traitement. Les différences sont jugées significatives au seuil de $p < 0,05$. Les graphiques présentés sont générés dans R (v3.4.4) à l'aide du package ggplot2.

3.14.2. RNA seq

Les données de séquençage obtenues sont préalablement trimmées (retrait des index et séparation des échantillons) par la plateforme génomique du GIGA.

Nous réalisons ensuite un test de qualité des données à l'aide du software « multiQC ». Les séquences obtenues pour chaque échantillon sont assemblées sur le génome du tilapia préalablement indexé à l'aide du software STAR (assembleur et indexation du génome préalable). Cette étape, de par sa complexité de traitement, est réalisée sur le cluster de calcul CECI.

Les données de comptage obtenues sont traitées dans R (v3.4.4) à l'aide du package DSeq permettant d'illustrer les différences d'expression des gènes selon les traitements. Seules les différences pour un seuil de p-value ajustée inférieure ou égale à 0.05 sont retenues. Enfin, les graphiques présentés sont générés dans R (v3.4.4) à l'aide du package ggplot2.

3.14.3. Méthylome

Les données recueillies par le Nanopore correspondent aux perturbations du champ électrique pour chaque pore. Ces fichiers de données doivent être traités par le logiciel albacore pour pouvoir en extraire les séquences d'acides nucléiques (A, T, G et C). Sur base de ces deux types de données, à savoir les données brutes et les données de séquences nous pouvons, à l'aide du logiciel tombo, réaliser une analyse visant à identifier les cytosines méthylées au sein des séquences. De par la taille importante des données collectées (environ 100 Go de données brutes par puce Nanopore) et la complexité des analyses, ces dernières ne peuvent être réalisées que sur le cluster de calcul CECI.

Tableau 1 : Croisements effectués entre les mâles XX fonctionnels (Ma, Mb) et les femelles XX (Fa, Fb, Fc), avec le nombre d'oeufs pour chaque croisement.

Croisement	Descendance	Nombre d'œufs
Ma x Fa	MaFa_1	1326
Ma x Fa	MaFa_2	1384
Ma x Fa	MaFa_3	1135
Ma x Fc	MaFc	1879
Mb x Fb	MbFb	1801

Tableau 2 : Nombre de poissons prélevés par descendance et par lot. **A.** à 15 jpf et **B.** à 40 jpf en vue des séquençages Illumina.

A	Nombre de poissons prélevés à 15 jpf		
	Témoin 28	E Therm	L Therm
MaFa_1	72	72	60
MaFa_2	/	51	49
MaFa_3	74	70	68
MbFb	70	70	74

B	Nombre de poissons prélevés à 40 jpf		
	Témoin 28	E Therm	L Therm
MaFa_1	41	41	40
MaFa_2	/	/	/
MaFa_3	/	/	/
MbFb	50	50	50

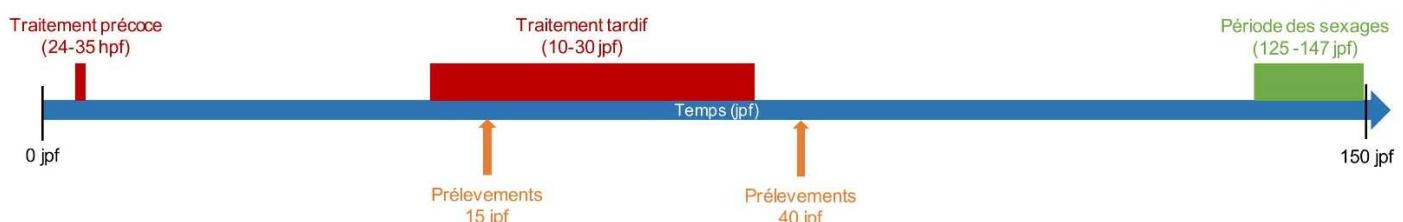


Figure 20 : Ligne du temps résumant les timings des traitements, des prélèvements et des sexages.

4. RESULTATS

4.1. Croisements et nombre de poissons échantillonnés

Pour réaliser notre expérience, nous avons croisé les mâles Ma et Mb avec les femelles Fa, Fb et Fc. Le **tableau 1** présente les croisements ayant été effectués et le nombre d'œufs obtenus pour chacun de ces croisements. Un triplicat a été réalisé avec le couple Ma x Fa. Le mâle Ma a donc servi à trois reprises à la fécondation des œufs de la femelle Fa. Deux autres croisements ont été effectués, d'une part avec le couple Ma x Fc et d'autre part avec le couple Mb x Fb.

Chacune des descendances a été divisée en trois lots, un contrôle qui a été maintenu à 28°C pendant toute la durée de l'expérience (« Témoin28 »), un lot qui a subi un traitement thermique précoce à 36,5°C entre 24hpf et 35jpf (« Etherm ») (**figure 10** du matériel et méthodes) et finalement un lot qui a été soumis à une température de 36,5°C tardivement, entre 10jpf et 30jpf (« Ltherm ») (**figure 11** du matériel et méthodes).

Pour évaluer l'effet de la haute température (HT) sur la survie des larves, le taux de survie a été déterminé après le traitement précoce, à 9jpf, et à 100jpf (voir 4.2.).

Une partie des poissons de chaque lot a été prélevée pour en extraire l'ARN, en vue de réaliser une étude transcriptomique sur les têtes et les gonades (séquençage Illumina). Nous avons choisi deux stades pour ces prélèvements : d'une part à 15jpf, bien après le traitement précoce et au début du traitement tardif ; d'autre part à 40jpf, bien après la fin du traitement tardif. Le nombre de poissons prélevés à 15 et 40 jpf dans les différents lots est repris dans le **tableau 2 A et B**. Les prélèvements des descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pu être effectués à 40 jpf à cause du nombre insuffisant de poissons. En effet, au moins 50 poissons devaient encore être en vie à 4 mois post-fécondation dans chaque lot pour pouvoir procéder au sexage. De plus, aucun prélèvement n'a été effectué pour la descendance MaFc dont la mortalité était bien trop importante. Notons également que les échantillons de têtes à 40 jpf ont été perdus suite à un problème technique.

Une ligne du temps résumant les timings des traitements, des prélèvements et des sexages est présentée à la **figure 20**.

La suite des résultats présentée ci-après découle des analyses de mortalité, de sexe ratio et de transcriptomique ayant été effectuées suite à l'application des traitements thermiques sur les différentes descendances (triplicat MaFa, MbFb et MaFc).

Tableau 3 : Résultats des TS9 par descendance et par lot ainsi qu'en moyenne pour chaque lot.

Descendances	TS Etherm (%)	TS Contrôle (%)	TS Etherm – TS Contrôle (%)
MaFa_1	42	55	13
MaFa_2	36	28	-8
MaFa_3	74	57	-17
MaFc	14	18	4
MbFb	31	67	36

Moyenne ± sd*	39 ± 22	45 ± 21
----------------------	-------------	-------------

* Ecart type standard

4.2. Taux de survie

4.2.1. Taux de survie entre 0 et 9 jpf

L'ensemble des données brutes relatives aux taux de survie entre 0 et 9 jpf (TS9) sont présentées dans le **tableau 3**. Les TS9 moyens des lots « Contrôle » et « Etherm » étaient respectivement de 45% et 39% (**figure 21 A**) avec une disparité importante entre les différentes descendances (MaFa, MaFc et MbFb). En effet, TS9 variait entre 18% (MaFc) et 67% (MbFb) pour les lots « Contrôle » et entre 14% (MaFc) et 74% (MaFa) pour les lots « Etherm » (**figure 21 B**).

La différence entre les TS9 du lot « Contrôle » et du lot « Etherm » n'était pas significative (p value > 0.05).

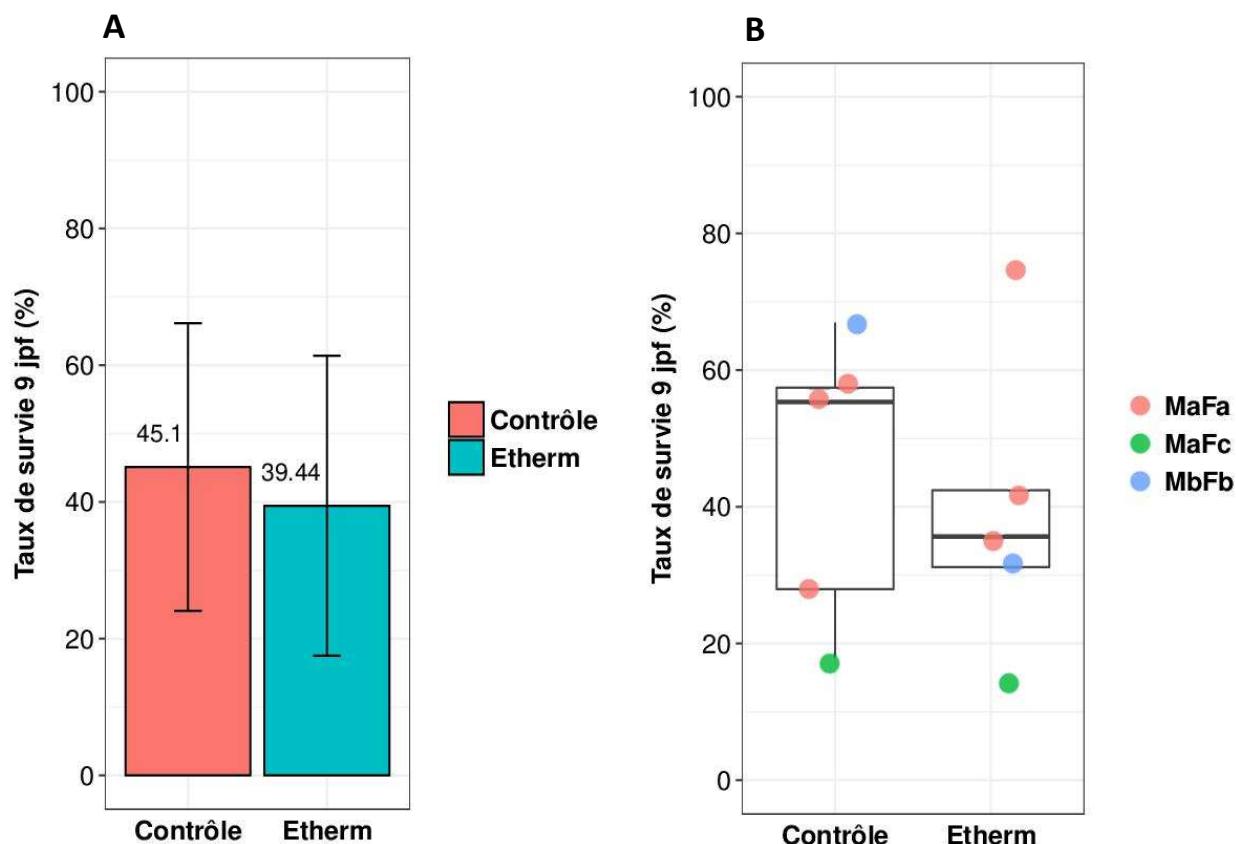


Figure 21 : Comparaison du TS9 entre le lot « Contrôle » et le lot traité précoce (« Etherm ») **A** en moyenne pour toutes les descendances confondues, **B** pour chaque descendance (dont un triplicat pour le croisement Ma x Fa).

Tableau 4 : Résultats des TS100 par descendance et par lot ainsi qu'en moyenne pour chaque lot sans tenir compte de la descendance MaFc.

Descendances	TS « Témoin 28 » (%)	TS « ETherm » (%)	TS « LTherm » (%)
MaFa_1	97	84	60
MaFa_2	90	81	89
MaFa_3	90	84	77
MaFc	9	4	21
MbFb	93	78	87

Moyenne \pm sd* sans MaFc	92 ± 3	82 ± 3	78 ± 13
---	------------	------------	-------------

* Ecart type standard

4.2.2. Taux de survie entre 10 et 100 jpf

L'ensemble des données brutes relatives aux taux de survie entre 10 et 100 jpf (TS100) sont présentées dans le **tableau 4**. Les TS100 pour les lots « Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm » des différentes descendance sont présentés graphiquement à la **figure 22 A**. Le lot MaFc qui avait des TS100 très faibles pour les trois lots (4 à 21%) n'a pas pu être conservé pour la suite des expériences à cause du manque d'effectifs. La **figure 22 B** présente donc les pourcentages moyens de TS100 pour les différents lots sans tenir compte de la descendance MaFc. Ces pourcentages ne différaient pas significativement les uns des autres (p value > 0.05) et étaient respectivement de 92, 82 et 78% pour les lots « Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm ».

Les lots « Ltherm » présentaient les TS100 les plus variables en fonction des descendances : de 60% (MaFa_1) à 89% (MaFa_2) sans tenir compte de la descendance MaFc. Quant aux TS100 en fonction des descendances pour les lots « Témoin 28 » et « Etherm », ils présentaient une variabilité très faible, respectivement de 90% (MaFa_2 et MaFa_3) à 97% (MaFa_1) et de 78% (MbFb) à 84% (MaFa_1), toujours sans tenir compte de la descendance MaFc.

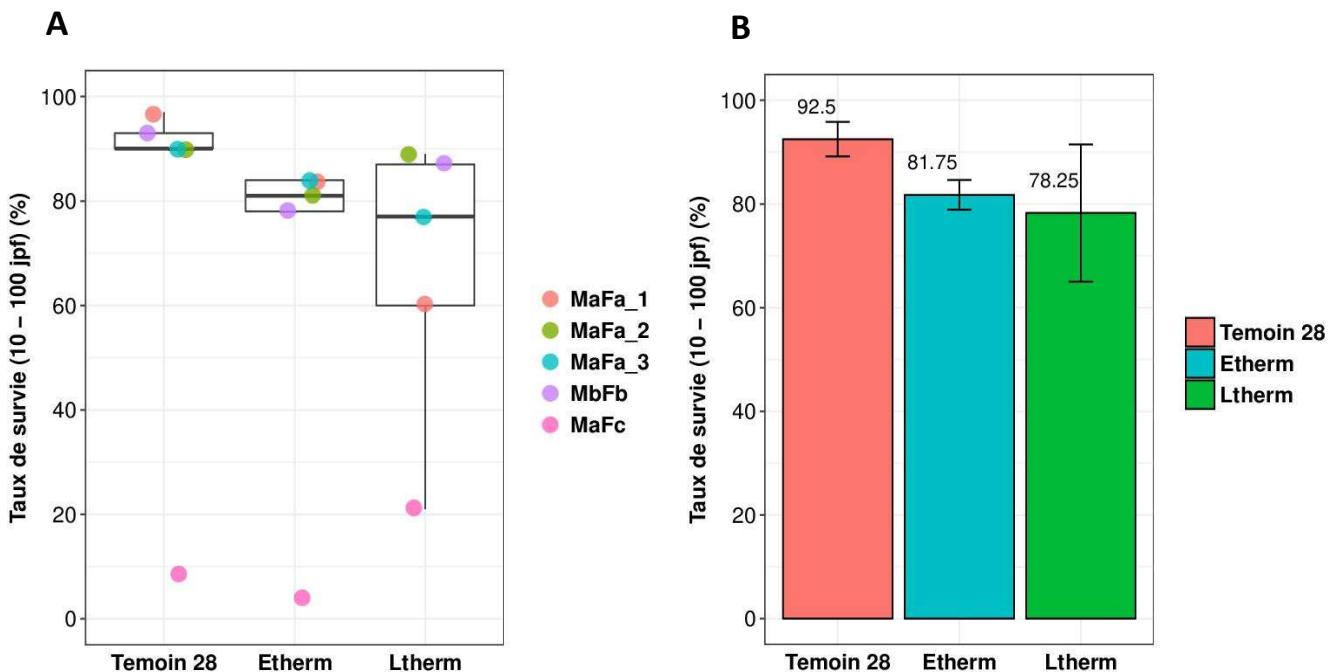


Figure 22 : Comparaison des TS100 entre les lots « Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm » **A** pour chaque descendance et **B** en moyenne pour toutes les descendances confondues excepté MaFc,

Tableau 5 : Stades auxquels les différentes descendance ont été sexées et nombre de poissons sexés pour chaque lot.

		Nombre de poissons sexés		
Descendance	Stade (jpf)	Témoin 28	E Therm	L Therm
MaFa_1	125	48	50	46
MaFa_2	147	27	100	100
MaFa_3	126	105	194	77
MbFb	125	50	50	50

Tableau 6 : Sexe ratio en termes de pourcentage de femelles déterminés pour chaque descendance et chaque lot (sexages entre 4 et 5 mois post-fécondation).

Descendance	% de femelles		
	Lot « Temoin 28 »	Lot « ETherm »	Lot « LTherm »
MaFa_1	75	24	8.9
MaFa_2	83.8	86.1	3.9
MaFa_3	77.8	72	4
MbFb	76	74	0

4.3. Sexe ratios et facteurs d'inversion du sexe

a) Sexe ratios

Le **tableau 5** présente les stades auxquels les différentes descendances ont été sexées et le nombre de poissons sexés pour chaque lot.

Les **figures 23 A et 23 B** présentent les sexe ratios en termes de pourcentages de femelles pour chacun des lots des différentes descendances (les données brutes sont reprises dans le **tableau 6**). Pour les lots « Témoin28 » (n’ayant pas été soumis à un traitement thermique), les pourcentages de femelles étaient compris entre 75% (MaFa_1) et 83.8% (MaFa_2). Parmi les lots « Etherm » (soumis au traitement thermique précoce), les résultats de sexe ratio divergeaient particulièrement, variant de 24% (MaFa_1) à 86.1% (MaFa_2) de femelles, même si ces lots étaient issus de la même famille (voir triplicat MaFa en rouge sur la **figure 23 A**). En moyenne, il n’y avait pas de différence significative entre le pourcentage de femelles dans les lots « Témoin 28 » et dans les lots « Etherm » (p value > 0.05). Notons cependant que le lot « Etherm » MaFa_1 se distinguait des autres descendances, avec un pourcentage de femelles bien plus faible (24%).

Concernant les lots ayant été soumis au traitement thermique tardif (« Ltherm »), les pourcentages de femelles se situaient entre 0% (MbFb) et 8,89% (MaFa_1) et étaient en moyenne significativement plus faibles par rapport aux pourcentages de femelles dans les lots « Témoin28 » et « Etherm » (p value < 0.001).

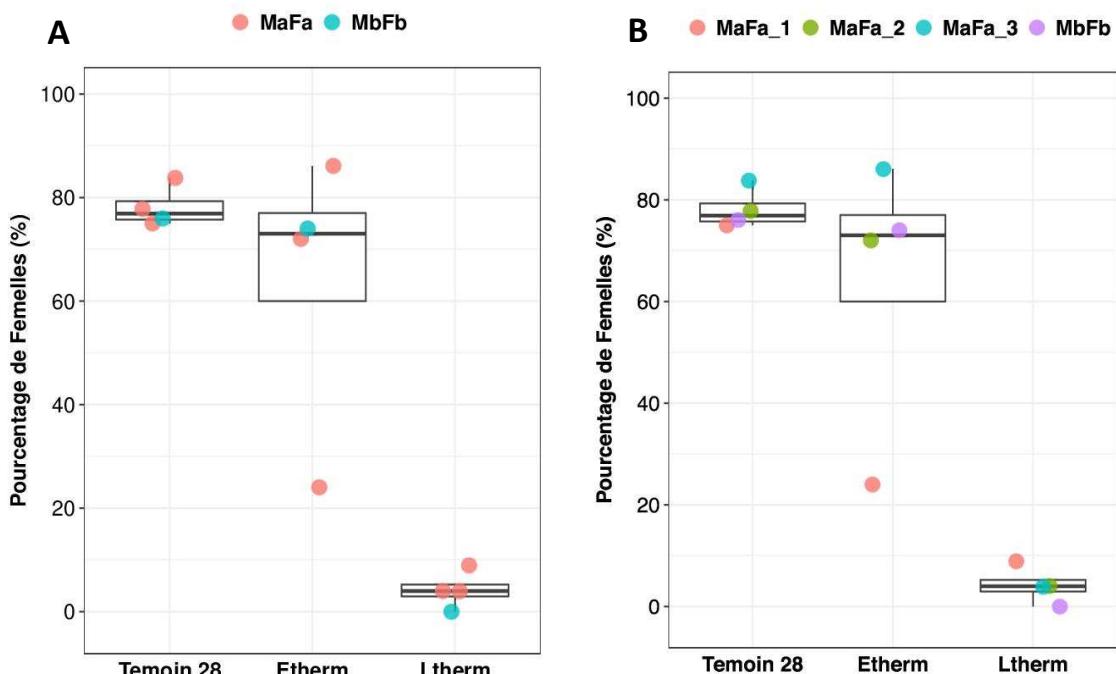


Figure 23 : Pourcentage de femelles dans les lots "Témoin 28", "Etherm" et "Ltherm" pour chaque famille. La figure A met en évidence le triplicat de descendances de la famille MaFa en rouge. La figure B est identique à la figure A mais chaque descendance est représentée dans une couleur distincte.

Tableau 7 : Facteurs d'inversion du sexe (FI) en fonction des descendances et du traitement thermique (« Etherm » ou Ltherm »).

Descendance	FI lot « Etherm »	FI lot « LTherm »
MaFa_1	-0.68	-0.88
MaFa_2	-0.03	-0.95
MaFa_3	0.07	-0.95
MbFb	-0.03	-1

b) Facteurs d'inversion du sexe

Le facteur d'inversion du sexe (FI) (données brutes présentée dans le **tableau 7**) permet d'évaluer avec davantage de précision l'effet masculinisant des traitements « Ethernm » et « Ltherm » car il tient compte du sexe ratio dans le lot témoin (**figure 24**). Plus FI est inférieur à 0, plus la masculinisation est importante, si FI est égal à -1 la masculinisation est totale. Ainsi, le traitement « Ethernm » a provoqué une masculinisation claire de la descendance MaFa_1 (FI = -0.68) et une masculinisation très faible, voire nulle, des descendances MaFa_2, MaFa_3 et MbFb (FI = -0.03, 0.07 et -0.03 respectivement). Quant au traitement « Ltherm », il avait eu un effet masculinisant important pour toutes les descendances, en particulier MaFa_3 pour laquelle la masculinisation était totale (FI = -1). Notons également que la descendance MaFa_1 qui répondait le mieux au traitement « Ethernm » est celle qui répondait le moins bien au traitement « Ltherm » (FI = -0.88).

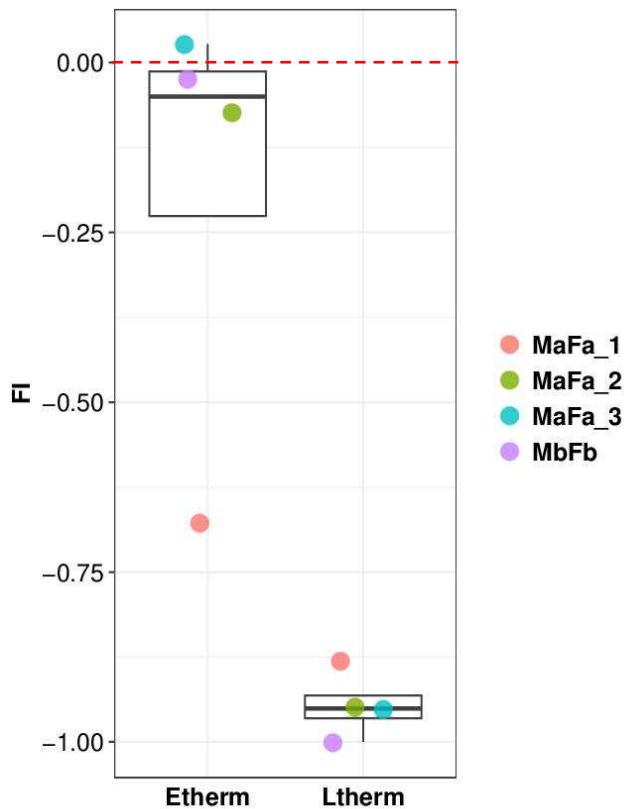


Figure 24 : Facteurs d'inversion du sexe (FI) des différentes descendances pour les lots « Ethernm » et « Ltherm ». Le facteur d'inversion est calculé sur base du pourcentage de femelles dans le lot "Témoin 28" et dans le lot traité. Plus il est inférieur à 0, plus la masculinisation est importante.

4.4. Qualité des échantillons d'ARNm et de leur séquençage

Les résultats des rapports 260/280 sont présentés à l'**annexe 1 tableau S1** et à l'**annexe 3 tableau S3 et figure S3**.

Les résultats des rapports 260/230 avant purification supplémentaire sont présentés à l'**annexe 1 tableau S1 et annexe 4 tableau S4 et figure S4**.

Les résultats de RIN et des exemples d'électrophérogrammes pour des échantillons au RIN< 8 sont présentés à l'**annexe 1 tableau S1** ainsi qu'à l'**annexe 2 tableau S2 et figures S1 et S2**.

Les résultats relatifs au contrôle de la qualité des librairies (multiQC) se trouvent à l'**annexe 1 tableau S1, à l'annexe 6 tableau S5 et figure S6** ainsi qu'à l'**annexe 5 figure S5**. Il s'est avéré que les quantités de librairies n'étaient pas suffisantes pour 3 échantillons qui n'ont donc pas pu servir pour la suite des analyses : les gonades à 15 jpf du lot « Ltherm » des descendances FbMb et FaMa_2 ainsi que les gonades à 15 jpf du lot « Témoin 28 » de la descendance FbMb.

4.5. Profils d'expression des gènes dans les têtes et les gonades

Dans cette partie, les résultats de séquençages des ARNm sont présentés sous formes de heatmaps et de volcano plots pour chaque stade et chaque tissu (gonades à 15 et 40 jpf, têtes à 15 jpf).

Les heatmaps (**figures 25, 27 et 29**) permettent de regrouper les différents lots (« Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm ») des différentes descendances (triplicat MaFa et MbFb) en fonction de la similitude de leurs profils globaux d'expression des gènes.

Les volcano plots (**figures 26, 28 et 30 A, B, D et E**) permettent de comparer l'expression des gènes chez les lots traités (« Etherm » et « Ltherm ») par rapport aux lots « Témoin 28 ». Les plots **A** et **B** traitent de la totalité des gènes du tilapia du Nil (27 000 gènes). Les plots **D** et **E** traitent uniquement des principaux gènes impliqués ou suspectés d'être impliqués dans la différenciation du sexe repris dans cette étude (voir descriptions en introduction). Les comparaisons effectuées sont : lots « Etherm » VS lots « Témoin 28 » (**A** et **D**) ainsi que lots « Ltherm » VS lots « Témoin 28 » (**B** et **E**). Les gènes ont été considérés comme différentiellement exprimés (GDEs) dans les lots traités lorsque leur expression était plus de 4 fois supérieure ou inférieure par rapport aux lots témoins et que cette différence était significative (p-value ajustée* < 0.05).

Les diagrammes de Venn (**figures 26, 28 et 30 C et F**) mettent en évidence le nombre de gènes communément sur- ou sous-exprimés pour lots « Ltherm » et « Etherm » d'une part, et pour le lot Etherm* de la descendance MaFa_1 semblant répondre au traitement thermique précoce (FI = -0,68) et les lots « Ltherm » d'autre part.

* p-value corrigée à la hausse en fonction du nombre total de comparaisons

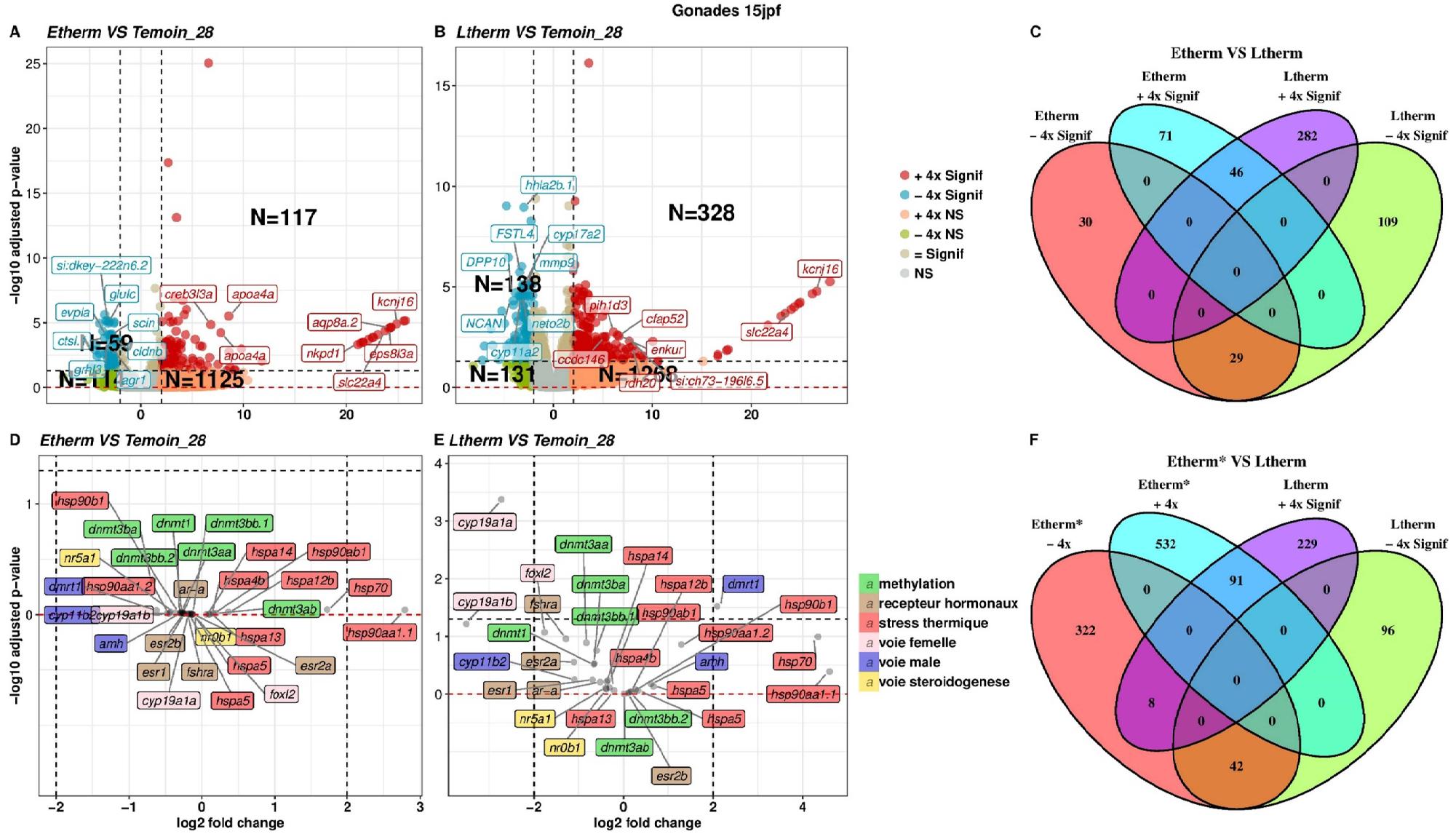


Figure 26 : Volcano plots permettant de comparer l'expression de la totalité des gènes (**A** et **B**) et des principaux gènes impliqués dans la différenciation du sexe (**D** et **E**) dans les gonades à 15 jpf des lots traités par rapport aux témoins : **A** et **D** = lots « Etherm » VS « Témoin 28 », **B** et **E** = lots « Ltherm » VS lots « Témoin 28 ». L'axe des abscisses correspond au log₂ du « fold change » (nombre de fois que le gène est plus ou moins exprimé) et l'axe des ordonnées correspond au -log₁₀ de la p value ajustée*. Les gènes annotés sont les 8 gènes répertoriés les plus significativement sur- et sous-exprimés.

Les gènes ont été considérés comme différentiellement exprimés (GDEs) dans les lots traités lorsque leur expression était plus de 4 fois supérieure ou inférieure (log₂ du « fold change » inférieur à -2 ou supérieur à 2) par rapport aux lots témoins et que cette différence était significative (p value ajustée* < 0.05 ou -log₁₀ de la p value ajustée* > 1,3). N correspond au nombre de gènes dans les différents cadres délimités par les seuils de p value et de « fold change ».

Les diagrammes de Venn permettent de comparer les profils d'expression des gènes **C**, de l'ensemble des lots « Ltherm » et « Etherm », **F**, du lot Etherm* de la descendance MaFa_1 (semblant répondre au traitement thermique précoce) avec l'ensemble des lots « Ltherm » en mettant en évidence le nombre de gènes communément sur- ou sous-exprimés (non significatif dans le cas du lot « Etherm* » car correspond à un seul échantillon).

* p-value corrigée à la hausse en fonction du nombre total de comparaisons

4.5.1. Expression des gènes dans les gonades à 15 jpf

La **figure 25** présente la heatmap obtenue sur base des séquençages des ARNm des gonades à 15 jpf. En fonction de la similitude de leurs profils d'expression des gènes, les échantillons forment les groupes **I**, **II** et **III**. Dans le groupe **I**, le lot « Ltherm » de la descendance MaFa_1 se regroupe avec les lots « Etherm » des descendances MaFa_1 et MbFb. Dans le groupe **II**, le lot « Etherm » de la descendance MaFa_3 se regroupe avec les lots « Témoin 28 » des descendances MaFa_1 et MaFa_3. Enfin, le groupe **III** se distingue des groupes **I** et **II** et se compose respectivement des lots « Etherm » et « Ltherm » des descendances MaFa_2 et MaFa_3.

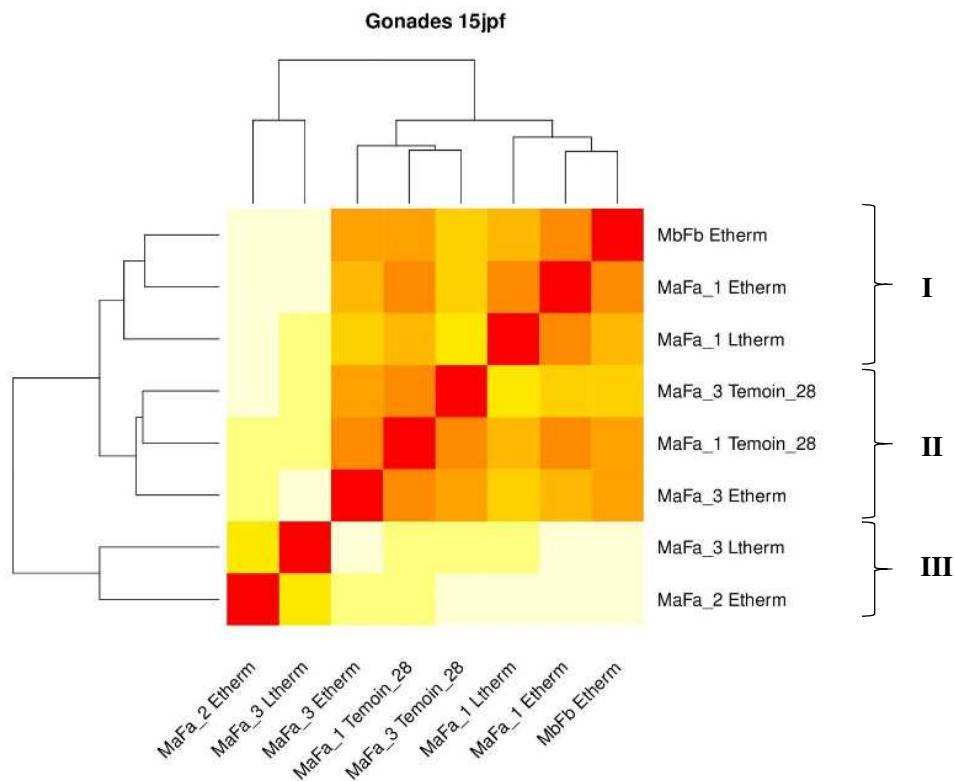


Figure 25 : Profil global de l'expression des gènes dans les gonades à 15 jpf, des différents lots (« Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm ») des différentes descendances (triplicat MaFa et MbFb). Les échantillons regroupés selon leur proximité en termes de niveaux d'expression des gènes forment les ensembles **I**, **II** et **III**. Notons que l'expression des gènes dans les gonades à 15 jpf des lots « Ltherm » et « Témoin 28 » de la descendance FbMb, ainsi que celles du lot « Ltherm » de la descendance FaMa_2, n'a pas pu être analysée en raison de la quantité de librairies trop faible de ces échantillons (**annexe 1 Tableau S1**). De plus, il n'existe pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2.

Au regard des volcano plots **A** et **B** de la **figure 26**, il apparaît que le nombre de GDEs par rapport aux lots « Témoin 28 » dans les gonades à 15 jpf est plus élevé pour les lots « Ltherm » (328 gènes sur-exprimés et 138 gènes sous-exprimés) que pour les lots « Etherm » (117 gènes sur-exprimés et 59 gènes sous-exprimés). Enfin, certains gènes répertoriés (*kcnj16* et *slc22a4*) sont très fortement sur-exprimés à la fois dans les lots « Etherm » et « Ltherm ». Une liste plus exhaustive des principaux gènes différentiellement exprimés se trouve à l'**annexe 12 B**.

Au vu des volcano plots **D** et **E** de la **figure 26**, aucun des principaux gènes impliqués ou suspectés d'être impliqués dans la différenciation sexuelle repris dans cette étude ne font partie des GDEs dans le cas des lots « Etherm ». Par contre, pour les lots « Ltherm », le gène *cyp19a1a* impliqué dans la voie de différenciation sexuelle femelle et le gène *Dmrt1* lié à la voie de différenciation sexuelle mâle étaient respectivement sous-exprimé et sur-exprimés. Notons également la tendance non significative des gènes liés au stress thermique (*hsp70* et *hsp90aa1.1*) à être sur-exprimés et la tendance du gène codant pour le type de l'aromatase habituellement exprimée dans le cerveau (*cyp19a1b*) à être sous-exprimé dans les lots « Ltherm » par rapport aux lots « Témoin 28 ».

Au regard des diagrammes de Venn (**figure 26 C et F**), 46 et 29 gènes étaient respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois dans les lots « Etherm » et « Ltherm ». Ensuite, 91 et 42 gènes montraient une tendance (non significative) à être respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois dans le lot « Etherm* » semblant répondre au traitement thermique précoce et dans les lots « Ltherm ». Les fonctions les plus redondantes de ces gènes communs sur- et sous-exprimés sont reprises dans l'**annexe 11 A**.

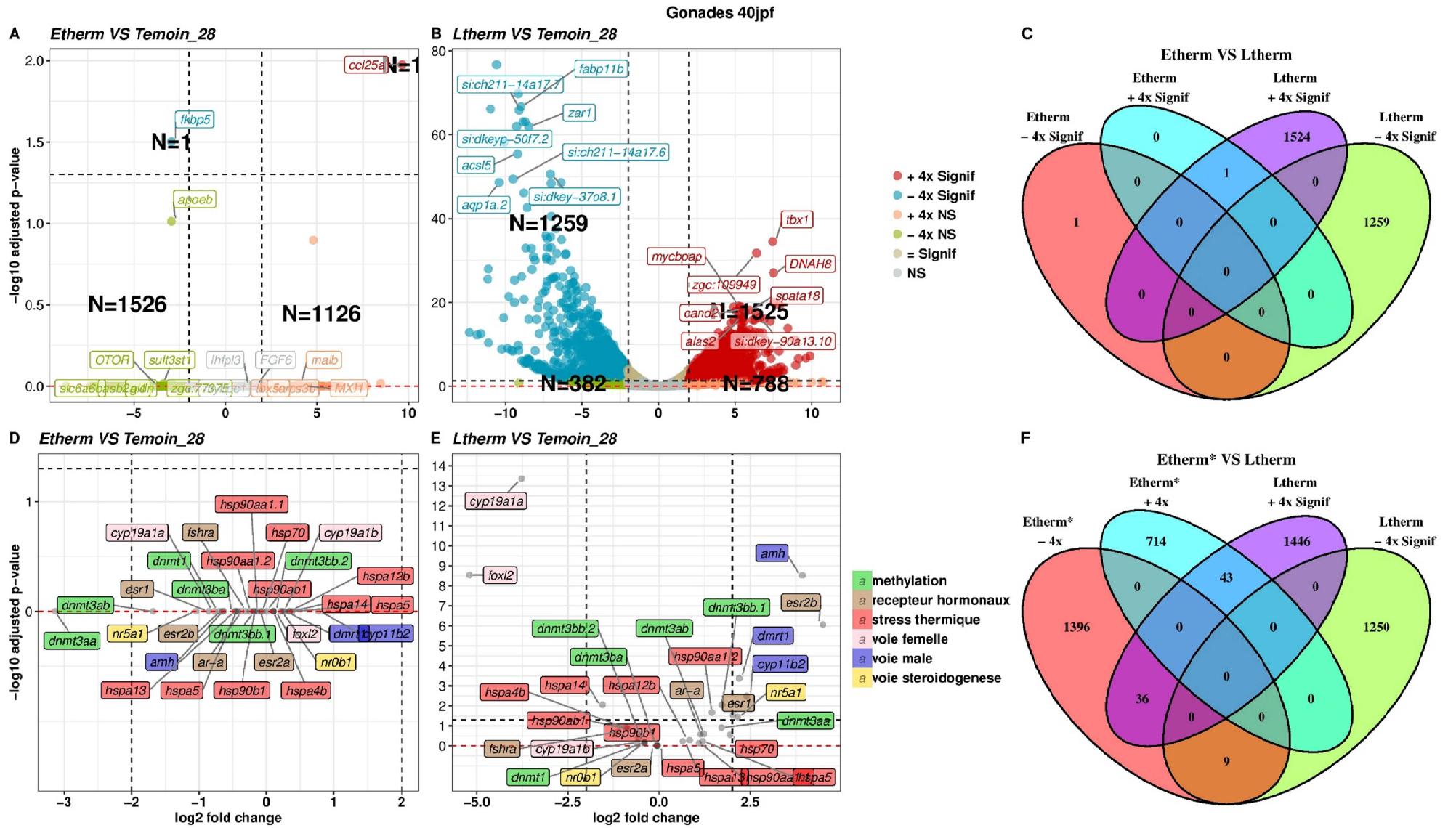


Figure 28 : Volcano plots permettant de comparer l'expression de la totalité des gènes (A et B) et des principaux gènes impliqués dans la différenciation du sexe (D et E) dans les gonades à 40 jpf des lots traités par rapport aux témoins : A et D = lots « ETherm » VS « Témoin 28 », B et E = lots « LTherm » VS lots « Témoin 28 ». L'axe des abscisses correspond au log₂ du « fold change » (nombre de fois que le gène est plus ou moins exprimé) et l'axe des ordonnées correspond au -log₁₀ de la p value ajustée*. Les gènes annotés sont les 8 gènes répertoriés les plus significativement sur- et sous-exprimés. Les gènes ont été considérés comme différemment exprimés (GDEs) dans les lots traités lorsque leur expression était plus de 4 fois supérieure ou inférieure (log₂ du « fold change » inférieur à -2 ou supérieur à 2) par rapport aux lots témoins et que cette différence était significative (p value ajustée* < 0.05 ou -log₁₀ de la p value ajustée* > 1,3). N correspond au nombre de gènes dans les différents cadres délimités par les seuils de p value et de « fold change ».

Les diagrammes de Venn permettent de comparer les profils d'expression des gènes C. de l'ensemble des lots « Ltherm » et « Etherm », F. du lot Etherm* de la descendance MaFa_1 (semblant répondre au traitement thermique précoce) avec l'ensemble des lots « Ltherm » en mettant en évidence le nombre de gènes communément sur- ou sous-exprimés (non significatif dans le cas du lot « Etherm* » car correspond à un seul échantillon).

* p-value corrigée à la hausse en fonction du nombre total de comparaisons

4.5.2. Expression des gènes dans les gonades à 40 jpf

La **figure 27** présente la heatmap obtenue sur base des séquençages des ARNm des gonades à 40 jpf. En fonction de la similitude de leurs profils d'expression des gènes, les échantillons forment les groupes **I**, **II** et **III**. Les lots « Etherm » et « Témoin 28 » se regroupent dans le cas des descendances MbFb (groupe **I**) et MaFa_1 (groupe **II**). Le groupe **III** se distingue des groupes **I** et **II** et se compose des lots « Ltherm » de ces mêmes descendances. Notons que les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être utilisées pour le séquençage à cause du manque d'effectifs.

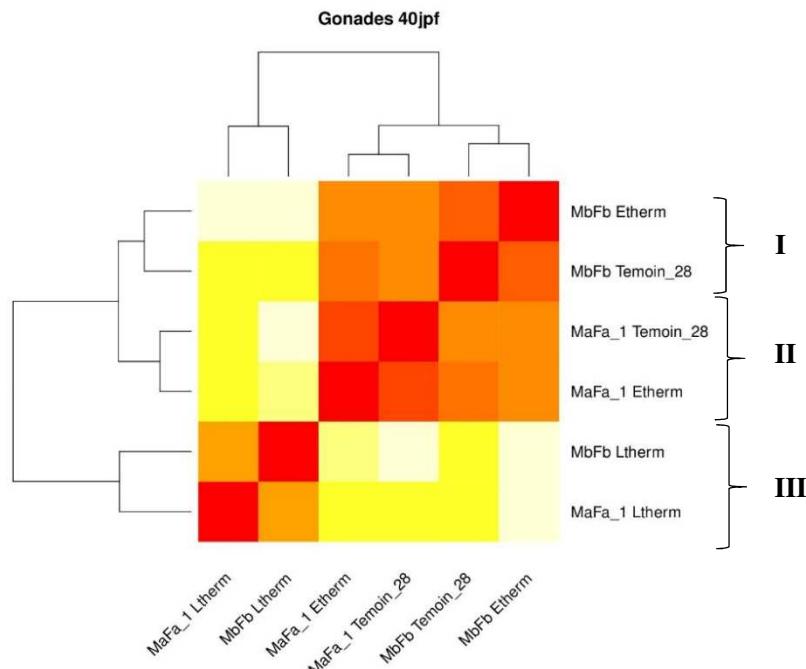


Figure 27 : Profil global de l'expression des gènes dans les gonades à 40 jpf des différents lots (« Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm ») des descendances MaFa_1 et MbFb. Les autres descendances ne sont pas représentées à cause du manque d'effectifs à 40 jpf. Les échantillons regroupés selon leur proximité en termes de niveaux d'expression des gènes forment les ensembles **I**, **II** et **III**.

Au regard du volcano plot de la **figure 28 A**, seuls 2 GDEs ont été détectés dans les gonades à 40 jpf des lots « Etherm » (*fkbp5* et *ccl25a*). Par contre, les lots « Ltherm » montraient un nombre important de GDEs (1525 gènes sur-exprimés et 1259 gènes sous-exprimés) (**figure 28 B**). Une liste plus exhaustive des principaux gènes différentiellement exprimés se trouve à l'**annexe 12 A**.

Parmi ces GDEs, les gènes *cyp19a1a* et *foxl2* impliqués dans la voie de différenciation sexuelle femelle étaient sous-exprimés tandis que les gènes *amh*, *dmrt1* et *cyp11b2* liés à la voie de différenciation sexuelle mâle étaient sur-exprimés (**figure 28 E**). Deux autres gènes potentiellement impliqués dans la différenciation du sexe sont sur-exprimés (les gènes paralogues *esr1* et *esr2b* ainsi que *nr5a1*). Notons également qu'à ce stade de 40 jpf, les gènes liés au stress thermique (*hsp70* et *hsp90*) et le gène *cyp19a1b* ne tendaient plus à être respectivement sur-exprimés et sous-exprimés dans les lots « Ltherm », comme c'était le cas à 15 jpf.

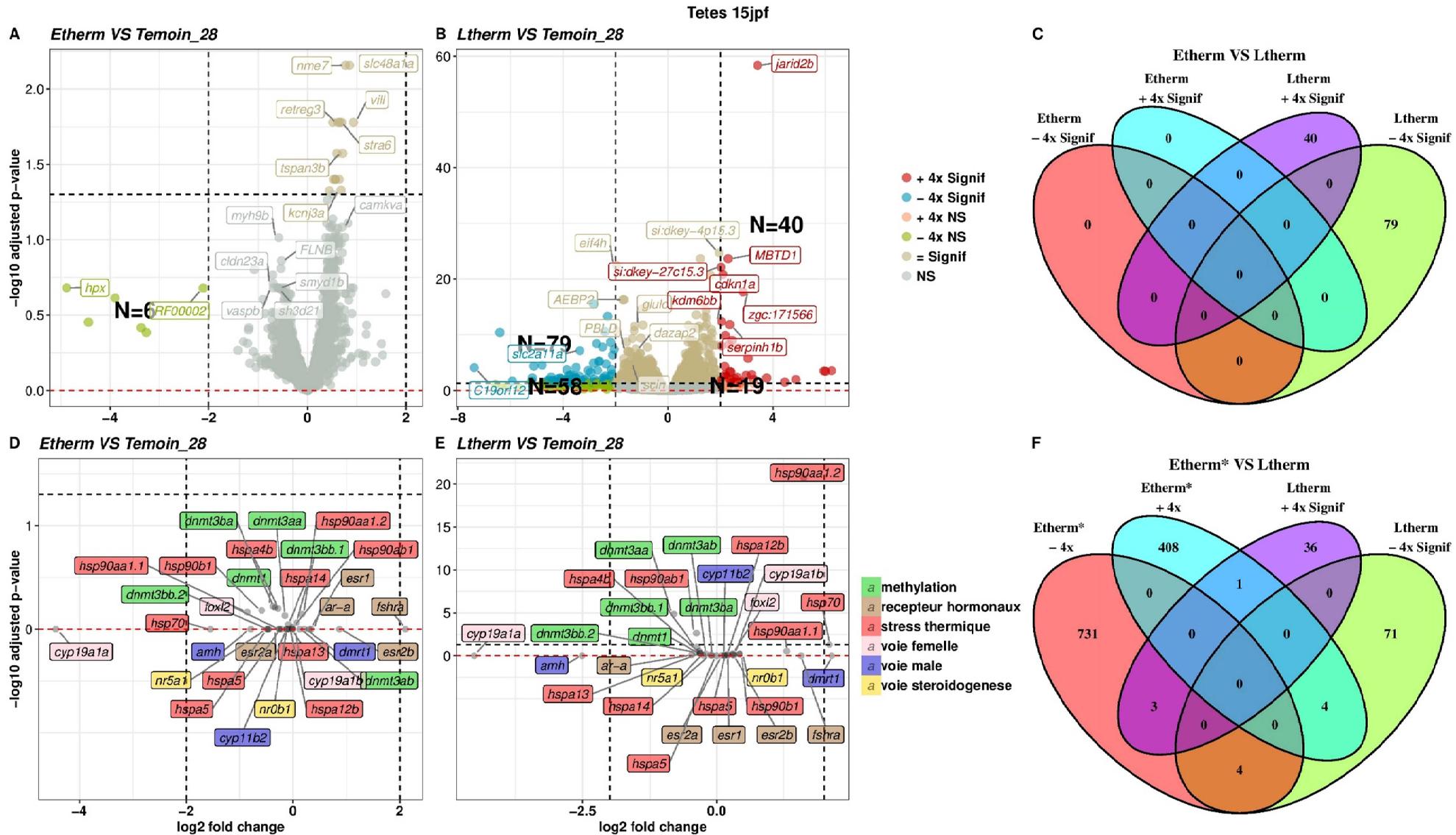


Figure 30 : Volcano plots permettant de comparer l'expression de la totalité des gènes (**A** et **B**) et des principaux gènes impliqués dans la différenciation du sexe (**D** et **E**) dans les têtes à 15 jpf des lots traités par rapport aux témoins : **A** et **D** = lots « Etherm » VS « Témoin 28 », **B** et **E** = lots « Ltherm » VS lots « Témoin 28 ». L'axe des abscisses correspond au log₂ du « fold change » (nombre de fois que le gène est plus ou moins exprimé) et l'axe des ordonnées correspond au -log₁₀ de la p value ajustée*. Les gènes annotés sont les 8 gènes répertoriés les plus significativement sur- et sous-exprimés.

Les gènes ont été considérés comme différemment exprimés (GDEs) dans les lots traités lorsque leur expression était plus de 4 fois supérieure ou inférieure (log₂ du « fold change » inférieur à -2 ou supérieur à 2) par rapport aux lots témoins et que cette différence était significative (p value ajustée* < 0.05 ou -log₁₀ de la p value ajustée* > 1,3). N correspond au nombre de gènes dans les différents cadres délimités par les seuils de p value et de « fold change ».

Les diagrammes de Venn permettent de comparer les profils d'expression des gènes **C** de l'ensemble des lots « Ltherm » et « Etherm », **F**, du lot Etherm* de la descendance MaFa_1 (semblant répondre au traitement thermique précoce) avec l'ensemble des lots « Ltherm » en mettant en évidence le nombre de gènes communément sur- ou sous-exprimés (non significatif dans le cas du lot « Etherm* » car correspond à un seul échantillon).

* p-value corrigée à la hausse en fonction du nombre total de comparaisons

Au regard des diagrammes de Venn (**figure 28 C et F**), 64 et 3 gènes avaient tendance à être respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois dans les lots « Etherm » et « Ltherm ». Ensuite, 43 et 9 gènes montraient une tendance (non significative) à être respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois dans le lot « Etherm* » semblant répondre au traitement thermique précoce et dans les lots « Ltherm ». Les fonctions les plus redondantes de ces gènes communs sur- et sous-exprimés sont reprises dans l'**annexe 11 B**.

4.5.3. Expression des gènes dans les têtes à 15 jpf

La **figure 29** présente la heatmap obtenue sur base des séquençages des ARNm des têtes à 15 jpf. En fonction de la similitude de leurs profils d'expression des gènes, les échantillons forment les groupes **I**, **II** et **III**. Le groupe **I** se compose des lots « Témoin 28 » et « Etherm » des descendances « MaFa_2 », « MaFa_3 » et « MbFb ». Ensuite, le groupe **II** réunit l'ensemble des lots « Ltherm » des différentes descendances. Enfin, le groupe **III** se distingue des groupes **I** et **II** et se compose des lots « Témoin 28 » et « Etherm » de la descendance MaFa_1.

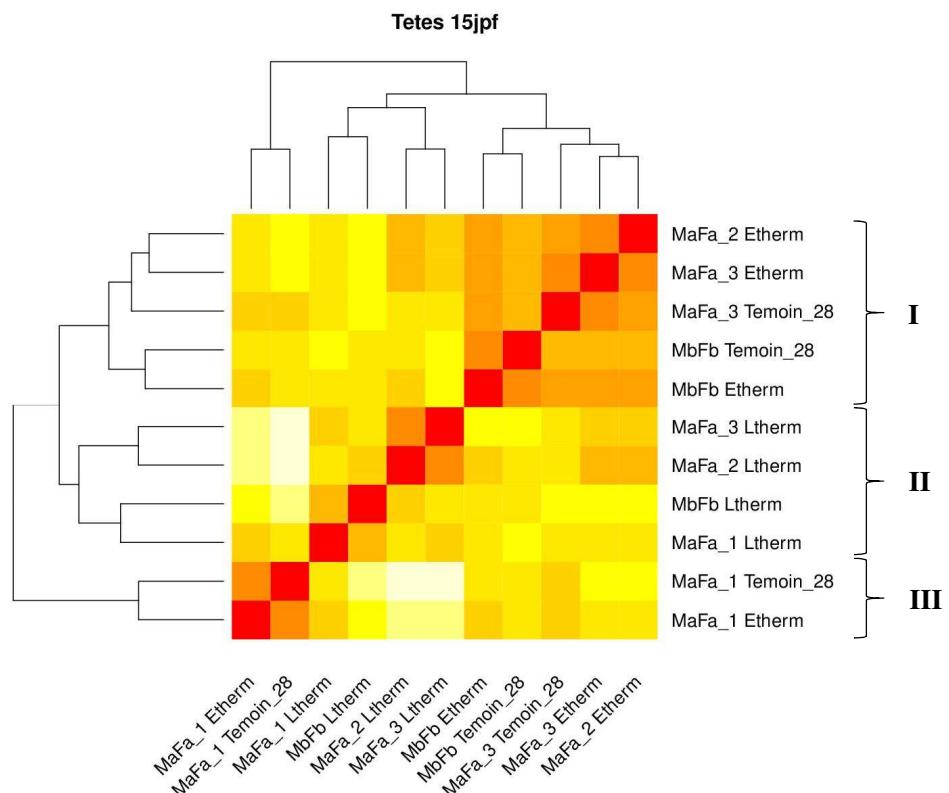


Figure 29 : Profil global de l'expression des gènes dans les têtes à 15 jpf des différents lots (« Témoin 28 », « Etherm » et « LTherm ») des différentes descendances (triplicat MaFa et MbFb). Les échantillons regroupés selon leur proximité en termes de niveaux d'expression des gènes forment les ensembles **I**, **II** et **III**. Notons qu'il n'existe pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2.

Au regard des volcano plots de la **figure 30**, aucun GDE n'a été détecté dans les têtes à 15 jpf des lots « Ethern ». Les lots « Ltherm » présentaient quant à eux des GDEs par rapport aux lots « Témoin 28 » (40 gènes sur-exprimés et 79 gènes sous-exprimés) (**figure 30 B**). Une liste plus exhaustive des principaux gènes différentiellement exprimés se trouve à l'**annexe 12 C**. Parmi ces GDEs, seul *hsp70* faisait partie des gènes possiblement impliqués dans la différenciation sexuelle repris dans cette étude (**figure 30 E**). D'autres gènes sur-exprimés sont liés aux modifications épigénétiques des histones (*jarid2b*, *MBTD1* et *kdm6bb*).

Au regard des diagrammes de Venn (**figure 30 C et F**), aucun gène n'avait tendance à être communément sur-exprimé ou sous-exprimé dans les lots « Ethern » et « Ltherm » car le lot Ethern ne présentait aucun GDE. Ensuite, 1 et 4 gènes montraient une tendance (non significative) à être respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois dans le lot « Ethern* » semblant répondre au traitement thermique précoce et dans les lots « Ltherm ». Les fonctions les plus redondantes de ces gènes communs sur- et sous-exprimés sont reprises dans l'**annexe 11 C**.

4.6. Qualité du séquençage par le Nanopore

Les échantillons sélectionnés pour être séquencés au Nanopore n'étaient pas issus des lots utilisés lors de cette étude pour l'analyse transcriptomique mais de juvéniles prélevés lors d'une précédente étude dans le même laboratoire. Ceux-ci avaient bien répondu au traitement thermique tardif (masculinisation supérieure à 80%) et leur sexe ratio avant traitement était de 100% femelles. Les informations relatives à ces échantillons sont reprises dans l'**annexe 9 (tableau S8)**.

Des exemples d'informations relatives au rapport de qualité du séquençage par le Nanopore se trouvent à l'**annexe 9 figures S11 et S12**. De manière générale, les fragments tendaient à avoir une taille autour de 8kb, ce qui est inférieure à la limite théorique requise de 30kb. Le pourcentage de pores en cours de séquençage en fonction du temps était également assez faible (moins de 40%). Les analyses des séquences et des méthylations sont actuellement en cours au laboratoire.

5. DISCUSSION

5.1. Effet des traitements thermiques sur le taux de survie

5.1.1. Taux de survie entre 0 et 9 jpf

Les taux de survie moyens de 0 à 9 jpf (TS9) des lots « Contrôle » et « Etherm » (respectivement 45% et 39%) obtenus lors de notre étude ne sont pas significativement différents, indiquant que le traitement thermique n'a pas eu d'effet sur la survie des larves dans notre expérience. Ces taux sont supérieurs d'environ 20% par rapport aux TS de 0 à 10 jours post-éclosion obtenus par Rougeot et al. (2008), lorsqu'ils avaient appliqué un traitement thermique précoce à 36°C sur des embryons de tilapia du Nil. Par ailleurs, Rougeot et al. (2008) avaient rapporté des TS significativement plus faibles chez les lots traités à 36°C par rapport aux lots maintenus à 27°C (P value < 0.05). Notons enfin que l'expérience de Rougeot et al. (2008) a été répétée par Wessels et al. (2011) et que ces derniers avaient observé une mortalité totale pour l'ensemble des lots traités à des températures supérieures à 34°C.

Les différences de TS entre les études pourraient d'abord s'expliquer par des différences de timing et/ou de durée du traitement thermique précoce (Wessels et al., 2011). En effet, le traitement thermique appliqué dans le cadre de notre étude débutait à 24 hpf et durait 11 heures au total pour se terminer bien avant l'éclosion. Dans les études précédentes, les traitements débutaient vers 12 hpf et duraient environ 40 heures (jusqu'à éclosion vers 52 hpf) avant de ramener la température à la normale beaucoup plus progressivement (de 36°C à 30°C en 24 heures). De plus, l'augmentation de la température jusqu'à 36°C était plus progressive dans l'expérience de Wessels et al. (2011) que dans celle de Rougeot et al. (2008) (respectivement en 5 et 3 heures). On peut donc supposer que la mortalité augmente avec la durée du traitement et/ou que débuter le traitement plus tard (24 hpf au lieu de 12 hpf) augmente les chances de survie. Les différences de TS peuvent également être liées aux différences de génotypes des embryons (100% XX dans le cadre de notre étude et de celle de Rougeot et al. et XX/XY dans le cadre de l'étude de Wessels et al.), à la qualité de la ponte ou encore à des dérives génétiques chez les géniteurs, car bien que tous étaient issus de la même souche domestique du lac Manzala, les tilapias utilisés dans notre étude étaient élevés sans renouvellement depuis 30 ans au sein du CEFRA (Wessels et al., 2011). Les conditions d'élevage sont également à prendre en compte. Rougeot et al. (2008) ont par exemple justifié une mortalité excessive dans l'un de leurs lots par une diminution du renouvellement de l'eau dans la bouteille de Zoug.

Notons également que lors de l'étude de Rougeot et al. (2008), les TS moyens des lots témoins et traités ont été déterminés pour deux périodes distinctes : la première période allant de 0 jpf à l'éclosion (TS respectivement de 49 et 30%) et la deuxième période allant de l'éclosion à 10 jours post-éclosion (TS respectivement de 62 et 46%). Les résultats tendent à indiquer que la mortalité survient davantage durant la première période. Ainsi, bien que dans le cadre de notre étude TS9 englobe à la fois le TS à l'éclosion et le TS post-éclosion, nous pourrions émettre l'hypothèse que le taux de fécondation et le taux d'éclosion sont parmi les principaux facteurs impactant le taux de survie.

Enfin, en ce qui concerne la variabilité des TS en fonction des descendances, elle est environ 10% supérieure à la variabilité des TS observée lors de l'étude de Rougeot et al. (2008). De plus, elle est importante au sein du triplicat de descendances MaFa (de 28 à 57% pour les lots «Contrôle » et de 36 à 74% pour les lots « Etherm »), ce qui indique que l'effet parental n'est pas un facteur déterminant du TS dans le cadre de notre étude. Ensuite, en ce qui concerne les TS très faibles des lots « Contrôle » et « Ltherm » de la descendance MaFc, il est probable qu'ils soient dus à une mauvaise qualité de ovocytes lors de la ponte.

5.1.2. Taux de survie entre 10 et 100 jpf

En moyenne, les TS100 des lots « Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm » (respectivement 92, 82 et 78%) ne différaient pas significativement (p value > 0.05). Sur base de nos résultats, les traitements thermiques n'affectent donc pas la survie des tilapias. Ensuite, les TS100 étaient élevés comparé aux résultats de TS9, ce qui peut être attribué à la vulnérabilité plus importante des embryons en début de vie. En ce qui concerne les lots « Ltherm » et « Témoin 28 », leurs TS100 moyens se rapprochent des résultats de précédentes études ayant également appliqué des traitement thermiques tardifs (36°C) sur des populations sauvages et sur une souche domestique de tilapias du Nil (TS moyens de 92 à 96% et de 90 à 95% respectivement pour les témoins et les traités) (Baroiller et al. 2009; Bezault et al., 2007; Tessema et al., 2006). Quant au TS100 moyen du lot « Etherm » (82%), il peut seulement être comparé au TS100 moyen rapporté par Wessels et al. (2011) suite au traitement thermique précoce à 34°C qu'ils avaient appliqué de 12 hpf jusqu'à l'éclosion. Ils avaient ainsi obtenu un TS100 de 84%, ce qui correspond à un résultat semblable au nôtre.

Concernant la descendance MaFc, de façon similaire à ce qui était observé pour les résultats de TS9, elle présentait des TS100 très faibles pour tous les lots (« Témoin 28 », « Etherm » et « Ltherm »), appuyant ainsi l'hypothèse d'une mauvaise qualité des ovocytes lors de la ponte. Ensuite, la variabilité plus importante des résultats en fonction des descendances parmi les lots « Ltherm », par rapport aux autres lots, est probablement due à une différence de sensibilité des descendances au traitement

thermique tardif qui a lieu durant cette période, certaines résistant mieux que d'autres à la HT (36,5°C) maintenue durant 20 jours. Notons cependant que les études précédentes ne rapportent pas de variabilité plus importante au sein des lots traités thermiquement à 36°C par rapport aux lots témoins (Baroiller et al. 2009; Bezault et al., 2007; Tessema et al., 2006).

5.2. Effet des traitements thermiques sur le sexe ratio

5.2.1 Sexe ratios des lots « Témoin28 »

Malgré la sélection de géniteurs mâles et femelles au génotype XX, les lots « Témoins28 » des différentes descendance n'étaient pas 100% femelles (75 à 83,8% de femelles), contrairement à ce qui avait été obtenu lors de précédentes études (Baroiller et al., 1995; Rougeot et al., 2008). Une première possibilité pour l'expliquer serait l'action de perturbateurs endocriniens mais les tests effectués n'en ont pas révélé la présence dans l'eau d'élevage. Il est également possible que cela soit lié à la senescence des femelles utilisées. Avec l'âge, il y a une perte générale d'histones couplée avec des remodelages globaux et locaux de la chromatine et un changement transcriptionnel global chez tous les modèles d'animaux. Des changements s'opèrent également de manière locale et globale dans la méthylation de l'ADN, particulièrement chez les mammifères par rapport aux autres modèles d'animaux (Sen et al., 2016). De plus, il a également été mis en évidence que les miARNs jouaient un rôle dans la régulation du vieillissement (Smith-vikos et Slack, 2012). Ces différentes modifications épigénétiques liées à la sénescence s'opèrent dans différents organes et pourraient également avoir lieu dans les ovocytes (Ge et al., 2015). Finalement, si de tels changements ont lieu au niveau des gènes de la différenciation du sexe et sont transmis à la descendance via les cellules germinales, il pourrait y avoir un effet sur le sexe phénotypique et cela expliquerait la présence de mâles dans les lots « Témoin28 ». De plus, le fait que la souche du CEFRA soit élevée sans renouvellement depuis 30 ans peut avoir conduit à une dérive génétique augmentant l'homozygotie de la souche. Dès lors, des gènes récessifs impliqués dans la détermination sexuelle peuvent se retrouver à l'état homozygote, s'exprimer et donc modifier le sexe-ratio.

5.2.2. Sexe ratios des lots « Etherm »

Pour les lots « Etherm », les résultats de sexe ratios n'étaient en moyenne pas significativement différents de ceux des lots « Témoin 28 ». Seul le lot « Etherm » de la descendance MaFa_1 se démarquait en ne comptant plus que 24% de femelles dans le lot « Etherm » contre 74% dans le lot « Témoin 28 », ce qui indique une réelle masculinisation pour cette descendance.

Tableau 8 : Synthèse bibliographique des résultats de sexe ratios (pourcentages de femelles) et FIs des lots témoins et traités de précédentes études ayant également soumis des embryons de tilapias du Nil à un traitement thermique précoce. Wessels et al (2011) ont utilisé deux groupes distincts : le premiers étant composé de lignées répondant fortement au traitement tardif aux HTs (entre 10 et 20 jpf) et le deuxième composé de lignées répondant faiblement à ce même traitement.

Auteurs et souche utilisée	Déroulement du traitement	% de femelles lot témoin	% de femelles lot traité	FI	Réponse des lignées pour la période 10-20 jpf
Rougeot et al. 2008 souche domestique du lac Manzala (Egypte)	36°C appliqué de 12 à 52 hpf	100 100 100 100	73,3 77,7 75,0 94,0	-0,27 -0,22 -0,25 -0,06	/
Wessels et al. 2011 Souche domestique du lac Manzala (Egypte)	34°C appliqué de 12 à 52 hpf	43,5 53,9 40,4 38,3 46,6 46,7	47,4 41,8 43,8 41,1 48,3 46,3	0,09 -0,22* 0,08 0,07 0,04 0,01	Forte (donnant >90% de mâles dans lot traité) Faible (donnant <60% de mâles dans lot traité)

* Résultat considéré comme statistiquement non significatif par les auteurs dû au manque d'effectifs dans les lots concernés.

A titre de comparaison, les résultats de sexe ratios des deux autres études ayant également soumis des embryons de tilapias du Nil à un traitement thermique précoce sont repris dans le **tableau 8**. Rougeot et al. (2008) avaient noté un effet du traitement thermique précoce à 36°C appliqué de 12 à 52 hpf. A partir d'une descendance 100% XX, ils avaient obtenu 8 à 27% de mâles dans les lots traités contre 0% de mâles dans les lots témoins. Wessels et al. (2011) ont quant à eux répété la même expérience sur deux groupes distincts : le premier se composait de lignées ayant préalablement bien répondu à un traitement tardif aux HTs (>90% de mâles dans le lot traité) et le deuxième ayant eu une faible réponse à ce même traitement (<60% de mâles dans le lot traité). Ils ont ainsi constaté que suite à un traitement précoce à 34°C (absence de résultats à 36°C due à la mortalité totale des lots traités à cette température), il n'y avait pas d'effet sur le sexe ratio pour aucune des descendances testées. Notons que Rougeot et al. (2008) avait également procédé au traitement à 34°C et avaient déjà obtenu des différences significatives entre les lots traités et les lots témoins. Enfin, une troisième étude avait procédé à un traitement hormonal féminisant (17α -ethynodiol) de manière précoce (de 24 à 28 hpf) sur des progénitures 100% XY. Ce traitement avait eu un effet significatif sur le sexe ratio (20,5% de femelles après traitement) (Gennotte et al., 2014).

Dans le cadre de notre étude, les 3 descendances sur les 4 qui n'avaient pas, ou très faiblement, répondu au traitement présentaient des FIs entre -0.03 et 0.07. Ces résultats sont similaires à ceux de Wessels et al. (2011) (FIs entre 0.01 et 0.09) et au résultat de l'une des descendances dans l'étude de Rougeot et al. (2008) (FI = -0.06). Cependant, la descendance MaFa_1 qui semblait bien répondre au traitement présente un FI (-0.68) inférieur à ceux de Rougeot et al. (2008) (FI min = -0.27), indiquant donc une masculinisation plus importante.

En ce qui concerne la variabilité des résultats en fonction des descendances, selon Wessels et al. (2011), la réponse au traitement précoce ne semblait pas liée à la capacité des lignées à répondre au traitement thermique tardif. Cela s'observe également à travers nos résultats étant donné que toutes les descendances répondaient bien au traitement thermique tardif mais seule l'une d'entre elle (MaFa_1) répondait au traitement thermique précoce. De plus, parmi les lots « LTherm », cette même descendance MaFa_1 avait la réponse la plus faible (FI = -0,88). Il est possible que les familles sélectionnées soient ou ne soient pas sensibles au traitement thermique précoce indépendamment de leur sensibilité au traitement thermique tardif, tout comme il a été montré que la sensibilité au traitement thermique tardif variait entre les différentes familles et populations de tilapias (Wessels et al., 2011). Ensuite, Rougeot et al. (2008) ont également émis l'hypothèse que le pourcentage de mâles variait d'une descendance à l'autre dû à un effet parental. Cependant, l'hypothèse familiale ne se vérifie pas dans le cadre de notre étude car les résultats de FIs après traitement thermique précoce divergeaient au sein du triplicat de la famille MaFa (FIs = 0,07, -0,03 et -0,68).

Tableau 9 : Synthèse des résultats de sexe ratios (pourcentages de femelles) et FIs des lots témoins et traités de précédentes études ayant également soumis des juvéniles de tilapias du Nil à un traitement tardif aux HTs.

Auteurs et populations utilisées	Déroulement du traitement	% moyen de femelles lots témoins	% moyen de femelles lots traités	FI moyen
Bezault et al. 2007 Lac Koka (lac d'altitude d'Ethiopie)	36°C appliqué de 10 à 40 jpf	44,2	23,0	-0,48
		47,1	19,4	-0,59
		49,8	21,3	-0,57
Tessema et al. 2006 Lac Manzala (Egypte)	36°C appliqué de 10 à 20 jpf	50,1	21,6	-0,57
		46,9	38,6	-0,18

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences globales de résultats entre les études ayant procédé à des traitements thermiques précoces. D'abord, il a été constaté que les différences de timing, de durée et de températures des traitements thermiques précoces avaient une influence sur les sexes ratios chez le zebrafish (Abozaid et al., 2011; Sfakianakis et al., 2012). Ces facteurs doivent également être d'une grande importance dans le cas du traitement thermique précoce sur le tilapia du Nil, comme cela avait déjà été prouvé pour le traitement thermique tardif (Baroiller et al., 1995). Ensuite, le fait de ne pas démarrer avec une descendance 100% XX rend la masculinisation plus difficile à détecter (Wessels et al., 2011). Une autre hypothèse serait que les conditions de nourrissage, éventuellement différentes dans les trois études, impacteraient indirectement le sexe ratio à travers le taux de croissance. En effet, chez le zebrafish, le taux de croissance est un facteur qui influe sur la différenciation du sexe (Sfakianakis et al., 2012). Cela pourrait également être le cas chez le tilapia du Nil qui, comme le zebrafish, possède un dimorphisme sexuel de croissance. Enfin, la domestication isolée de chaque souche pendant une longue période a pu conduire à l'expression de gènes récessifs liés au déterminisme du sexe, ce qui pourrait aussi influer sur le sexe ratio.

5.2.3. Sexe ratios des lots « Ltherm »

Concernant les lots « Ltherm », les pourcentages de femelles (compris entre 0 et 8,89%) étaient en moyenne significativement plus faibles que ceux des lots « Témoin28 » (p value < 0,001). Cela rejoint les observations des précédentes études qui ont également mis en évidence une masculinisation des lots traités aux HTs pendant la période thermosensible (Baroiller et al., 1995; Bezault et al., 2007; Tessema et al., 2006). Certains auteurs rapportent des preuves irréfutables qu'il y a bien une inversion sexuelle et non pas une mortalité différentielle entre les sexes après traitement thermique tardif. Premièrement, des mâles phénotypiques ont été obtenus à partir de descendances 100% XX traitées aux HTs. Deuxièmement, des mâles phénotypiques obtenus par traitement thermique tardif croisés avec des femelles normales ont également donné des descendances 100% XX, ce qui prouve que le génotype de ces mâles était bien XX (Bezault et al., 2007). Dans le cadre de notre étude, un autre argument en faveur de l'inversion du sexe par le traitement thermique tardif est l'absence de différence significative entre la mortalité des lots traités et celle des lots témoins.

Ensuite, les FIs de nos lots « Ltherm » (compris entre -0,88 et -1) sont inférieurs aux FIs de précédentes études effectuées sur des populations sauvages et dont les résultats sont repris dans le **tableau 9** (Bezault et al., 2007; Tessema et al., 2006), ce qui indique une meilleure réponse au traitement thermique tardif dans le cadre de notre étude. Notons cependant que nous avons utilisé des souches domestiques. Or, les stocks domestiques sont maintenus dans des conditions artificielles

contrôlées, sont sélectionnés et affectés par des phénomènes de consanguinité. *In fine*, cela conduit à une diminution de la diversité génétique qui pourrait influer sur l'expression de la composante environnementale du système de détermination du sexe (ESD). Ainsi, la réponse au traitement thermique tardif des descendances de notre étude pourrait être exacerbée (Bezault et al., 2007). Cette hypothèse peut être appuyée par le cas du zebrafish dont la domestication a conduit à une disparition du système de détermination du sexe à homogamétie mâle ZW/ZZ présent chez les individus sauvages (Wilson et al., 2014). Enfin, le fait que les populations sauvages tendent à ne pas répondre à 100% au traitement thermique serait un moyen conservatif de ces dernières pour ne pas compromettre leurs chances de se réadapter ultérieurement aux anciennes conditions si celles-ci varient de manière cyclique. Le fait que les mécanismes de détermination du sexe ne donnent pas de réponse unilatérale serait donc une conséquence de l'imprévisibilité de l'environnement (Bezault et al., 2007).

Nos taux d'inversions plus élevés peuvent aussi s'expliquer par la souche originelle de nos tilapias. Ils sont issus de la souche Manzala, qui présente l'une des plus forte thermosensibilité comparée aux autres souches étudiées (notamment par rapport à la population du lac d'altitude Koka). Or, les populations naturellement plus adaptées aux HTs ont tendance à montrer une réponse au traitement thermique tardif plus homogène du point de vue du sexe ratio (Bezault et al., 2007).

Enfin, de manière générale, il a été démontré que l'effet parental était important (la mère et le père y contribuant tous les deux) et que la sensibilité pour le traitement thermique tardif n'était pas observée chez toutes les descendances de tilapias du Nil (Baroiller et al., 2009). Dans l'étude de Tessema et al. (2006), deux pontes ont été répétées pour plusieurs couples de tilapias également originaires du lac Manzala et les sexe ratios dans les lots traités et les lots témoins ne variaient pas de plus de 1,7% à 6,2% entre les deux pontes. Concernant le triplicat MaFa de notre étude, la variation observée entre les 3 descendances était de 4,89% et les pourcentages de femelles de ces dernières (4, 3,9 et 8,89%) étaient supérieurs au résultat obtenu pour la descendance issue de la famille MbFb (0% de femelles). Nos résultats n'excluent donc pas un effet parental mais ne permettent pas non plus de le confirmer, les familles MaFa et MbFb ayant toutes deux bien répondu au traitement « Ltherm ».

5.3. Effet des traitements thermiques sur les profils d'expression génétique

5.3.1. Expression des gènes dans les gonades à 15 jpf

Profil global d'expression des gènes parmi les lots

Dans le profil global d'expression des gènes (heatmap) pour les gonades à 15 jpf (**figure 25**), le lot « Etherm » de la descendance MaFa_3 se regroupait avec les lots témoins. Cela paraît cohérent

car la descendance MaFa_3 n'avait pas du tout répondu au traitement thermique précoce (FI = 0,07). Cependant, le lot « Etherm » de la descendance MaFa_1 qui avait répondu au traitement thermique précoce (FI = 0,68) était associé au lot « ETerm » de la descendance FbMb qui avait très peu répondu à ce même traitement (FI = -0,03). De plus, les lots « Ltherm » des descendances MaFa_1 et MaFa_3 qui répondaient au traitement thermique tardif (FI = -0,88 et -0,95 respectivement) étaient dissociés l'un de l'autre et étaient proches de lots « Etherm » ayant très peu répondu au traitement thermique précoce (FI = -0,03). Ces résultats qui paraissent incohérents lorsqu'ils sont comparés aux FIs pourraient s'expliquer par le stade de prélèvement des gonades qui était de seulement 15 jpf. En effet, les gonades sont alors en pleine formation et l'expression globale des gènes des gonades mâles et femelles ne commence à se différencier que 30 jours après éclosion (à environ 32 jpf), période à laquelle apparaissent également les premières distinctions histo-morphologiques (Tao et al., 2018). Il serait donc normal que les FIs calculés sur base des sexe ratios à plus de 4 mois ne concordent pas encore avec le profil global d'expression des gènes à 15 jpf. De plus, après seulement 5 jours de traitement thermique tardif (sur une durée totale de 20 jours prévue), celui-ci ne pouvait donc pas avoir pleinement opéré sur les gonades des lots « Ltherm ».

Comparaison de l'expression des gènes dans les lots traités par rapport aux lots témoins

Dans les gonades à 15 jpf, le nombre de gènes différentiellement exprimés (GDEs) par rapport aux lots « Témoin 28 » était plus important dans les lots « Ltherm » (466) par rapport aux lots « Etherm » (176). Parmi ces GDEs, seuls les lots « Ltherm » présentaient des gènes de la différenciation du sexe (*cyp19a1a* et *dmrt1*). Cela concorde avec les résultats de FIs de notre étude et de la littérature qui indiquent une bien meilleure réponse du tilapia du Nil au traitement thermique tardif par rapport au traitement thermique précoce (Bezault et al., 2007; Rougeot et al., 2008; Tessema et al., 2006; Wessels et al., 2017). Ainsi, dans les lots « Ltherm », le gène *Cyp19a1a* lié à la voie de différenciation sexuelle femelle était sous-exprimé tandis que le gène *Dmrt1* lié à la voie de différenciation sexuelle mâle était sur-exprimé. Ces différences d'expression par rapport aux lots témoins observées à 15 jpf sont cohérentes avec les résultats de Tao et al. (2018) qui rapportent que l'expression des gènes *cyp19a1a* et *Dmrt1* commence à augmenter 5 jours après éclosion (à environ 7 jpf), respectivement dans les ovaires et les testicules.

Ensuite, la tendance (non significative) des gènes liés au stress thermique (*hsp70* et *hsp90aa1.1*) à être sur-exprimés dans les lots « LTherm » est cohérente avec le traitement thermique qui est appliqué sur ces lots au moment du prélèvement des gonades à 15 jpf. Les HSPs (protéines du choc thermique) ont la propriété de se lier à des récepteurs stéroïdiens. Selon Li et al. (2014), il est possible qu'elles puissent indirectement impacter l'expression des gènes de différenciation du sexe.

De plus, *hsp70* a été associé avec le développement des gonades et la qualité des œufs chez différentes espèces et interagirait avec *sox9*, un acteur du développement testiculaire chez les vertébrés (Tao et al., 2018). Enfin, le gène *cyp19a1b* (codant pour l'aromatase comme *cyp19a1a*) tend à être sous-exprimé (de façon non significative) dans les lots « Ltherm », ce qui pose question car ce gène est normalement exprimé dans le cerveau. Notons également que la non significativité de certains résultats peut être due à la faible quantité d'échantillons.

Les gènes *slc22a4* et *kcnj16* répertoriés comme codant pour des transporteurs membranaires hautement exprimés dans les reins chez le zebrafish ne sont pas connus pour être impliqués dans la différenciation sexuelle, mais étaient très fortement sur-exprimés à la fois dans les lots « Ethern » et les lots « Ltherm » par rapport aux lots « Témoins 28 ». L'explication la plus probable est qu'il s'agirait d'un artefact dû au prélèvement involontaire de reins durant la dissection. Etudier ces gènes plus en profondeur permettrait de s'assurer qu'ils ne puissent pas avoir un rôle quelconque dans la différenciation du sexe.

Enfin, au regard des diagrammes de Venn, un certain nombre de gènes (75) étaient communément sur- ou sous-exprimés dans les lots « Ltherm » qui répondaient au traitement thermique tardif et dans les lots « Ethern » qui, en moyenne, ne répondaient pourtant pas significativement au traitement thermique précoce (**figure 26 C**). Ensuite, 133 gènes montraient une tendance (non significative) à être communément sur- ou sous-exprimés dans les lots « Ltherm » et dans le lot « Ethern* » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique précoce (FI = -0,68) (**figure 26 F**). Il pourrait être supposé que parmi ces gènes communs, certains soient liés à des fonctions biologiques dans les gonades. Lorsque l'on se penche sur les fonctions les plus redondantes de ces gènes (**annexe 11 A**), il semble que ceux étant liés aux voies métaboliques en général soient davantage représentés dans le cas du lot « Ethern* » de la descendance MaFa_1 que dans le cas de l'ensemble des lot « Ethern ». Cependant, rappelons qu'il s'agit d'une tendance non significative en ce qui concerne les gènes sur- ou sous-exprimés pour le lot « Ethern* » et que les voies métaboliques en question ne font pas directement référence aux fonctions biologiques dans les gonades.

5.3.2. Expression des gènes dans les gonades à 40 jpf

Profil global d'expression des gènes parmi les lots

Dans le profil global d'expression des gènes (heatmap) dans les gonades à 40 jpf (**figure 27**), le lot « Ethern » d'une descendance donnée tendait à se regrouper avec le lot « Témoins 28 » de la même descendance. Cela est interpellant dans le cas du lot « Ethern » de la descendance MaFa_1 qui avait *in fine* bien répondu au traitement thermique précoce (FI = -0,68). En effet, à ce stade de 40 jpf,

nous nous serions plutôt attendus à ce que le profil global d'expression génétique de ce lot se rapproche de celui du lot « Ltherm » de la même descendance ($FI = -0,88$). Quant aux lots « Ltherm », ils formaient un groupe se distinguant des lots « Témoin 28 » et « Etherm », ce qui est en accord avec l'efficacité du traitement thermique tardif pour provoquer l'inversion sexuelle rapportée dans notre étude et dans la littérature (Bezault et al., 2007; Rougeot et al., 2008; Tessema et al., 2006; Wessels et al., 2017).

Comparaison de l'expression des gènes dans les lots traités par rapport aux lots témoins

Dans les gonades à 40 jpf, seuls deux GDEs n'ayant à priori aucun lien avec la différenciation sexuelle avaient été détectés dans les lots « Etherm » (*ccl25* et *fkbp5*). Cette observation est cohérente avec les résultats présentés à la **figure 27** où le lot « Etherm » d'une descendance donnée ne se distinguait pas du lot « Témoin 28 » de la même descendance, sur base du profil global d'expression génétique. Il est possible que cela soit en partie causé par le stade encore jeune des gonades. Des analyses ultérieures sur des gonades plus matures (par exemple à 100 jpf) pourraient accroître les chances d'observer des différences d'expression significatives par rapport aux lots témoins. En effet, des gonades matures totalement différenciées expriment davantage de gènes spécifiques au phénotype mâle ou femelle.

Concernant les lots « Ltherm », ils montraient 2784 GDEs dans leurs gonades à 40 jpf, soit 2318 de plus que dans les gonades à 15 jpf. Dans une précédente étude ayant analysé les profils d'expression génétique sur des gonades à 115 jpf après traitement thermique tardif, les échantillons montraient encore beaucoup plus de GDEs par rapport aux témoins (environ 11000) (Sun et al., 2018). Cela confirmerait donc l'hypothèse selon laquelle plus le stade de maturité des gonades est avancé, plus les chances d'observer des GDEs dans les lots traités par rapport aux lots témoins augmentent. Notons cependant que nos prélèvements ont été effectués tôt dans le développement car notre étude visait notamment à déterminer l'impact immédiat des HTs sur l'expression des gènes durant le traitement thermique tardif (15 jpf) et juste après ce dernier (40 jpf), lorsque les gènes liés au stress thermique ne font plus partie des GDEs.

Parmi les GDEs supplémentaires des lots « Ltherm » à 40 jpf se trouvent des gènes liés à la différenciation sexuelle qui n'étaient pas encore différentiellement exprimés dans les gonades à 15 jpf : *foxl2*, un gène impliqué dans la voie de différenciation sexuelle femelle était ainsi sous-exprimé en plus de *cyp19a1a*, tandis que *amh*, *dmrt1* et *cyp11b2*, des gènes liés à la voie mâle, étaient sur-exprimés. Ces résultats rejoignent les observations déjà rapportées dans la littérature et sont cohérents avec la masculinisation importante observée dans les lots « Ltherm » (Li et al., 2014; Poonlaphdecha et al., 2013; Sun et al., 2018). Notons également que parmi les GDEs sous-exprimés dans les lots

« Ltherm », les gènes *si* : *ch211-14a17.7*, *tmem144b* et *si:dkey-19b23.11* sont répertoriés comme codant pour des protéines principalement exprimées dans les gonades femelles chez le zebrafish, ce qui renforcerait l’hypothèse d’une masculinisation durant le traitement thermique tardif.

D’autres résultats intéressants à relever sont que le gène *dnmt1* et les gènes paralogues *dnmt3*, impliqués dans la méthylation de l’ADN, ne font pas partie des GDEs dans les lots « Ltherm » à 40 jpf. L’analyse des résultats obtenus après séquençage de l’ADN par le Nanopore, permettra de repérer les méthylations au niveau des promoteurs des gènes, notamment de *cyp19a1a*. Ces analyses apporteront de nouvelles informations quant à l’implication possible des DNMTs dans les différences de profils d’expression génétiques chez les individus exposés aux HTs par rapport aux témoins. En effet, chez le tilapia du Nil et le bar européen, deux espèces à GSD + TE, l’effet masculinizant observé aux HTs avait été suspecté être induit par des méthylations au niveau du promoteur du gène *cyp19a1a* (Navarro-Martín et al., 2011; Wang et al., 2017).

Ensuite, les gènes liés au stress thermique (*hsp90* et *hsp70*) ne tendaient plus à être sur-exprimés dans les lots « Ltherm », ce qui est cohérent avec le fait qu’à 40 jpf le traitement thermique tardif était terminé.

Notons également la sur-expression de *nr5a1* et des gènes paralogues *esr1*, *esr2b* et *nr5a1* dans les lots « Ltherm ». *Esrl*, *esr2b* et *nr5a1* codent pour des récepteurs aux estrogènes capables de stimuler l’effet de ces derniers sur l’expression de *cyp19a1a*. Chez les mammifères, *nr5a1* code pour un activateur de transcription d’enzymes stéroïdogènes dont l’aromatase. En ce qui concerne la sur-expression du gène *Nr5a1*, elle est cohérente avec les observations de Crews et al. (2001) sur la tortue de Floride. En effet, après traitement à température masculinisante (26°C), le gène *nr5a1* était sur-exprimé alors que le gène *cyp19a1a* était sous-exprimé. Les auteurs suggèrent que *nr5a1* régule l’expression de *cyp19a1a* chez cette espèce (Crews et al., 2001). Quant à l’expression de *era* et des *ers* en général, elle pourrait être influencée par la température mais serait particulièrement complexe chez les téléostéens. Son implication dans l’inversion du sexe liée à la température n’a pas encore été établie (Van Nes & Andersen, 2006).

Enfin, au regard des diagrammes de Venn, un seul gène était communément sur- ou sous-exprimé dans les lots « Ltherm » et dans les lots « Etherm » qui ne présentaient que deux GDEs à priori non impliqués dans la différenciation du sexe (**figure 26 C**). Ensuite, 52 gènes montraient une tendance (non significative) à être communément sur- ou sous-exprimés dans les lots « Ltherm » et dans le lot « Etherm* » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique précoce (FI = -0,68) (**figure 26 F**). Lorsque l’on se penche sur les fonctions de ces gènes (**annexe 11 B**), le seul gène en commun avec les lots « Ltherm », dans le cas des lots « Etherm », serait lié aux processus du système immunitaire. Dans le cas du lot « Etherm* » de la descendance MaFa_1 qui

semblait répondre au traitement thermique précoce, certaines fonctions sont liées au développement mais ne concernent pas directement les fonctions biologiques des gonades.

5.3.3. Expression des gènes dans les têtes à 15 jpf

Profil global d'expression des gènes parmi les lots

Dans le profil global d'expression des gènes (heatmap) pour les têtes à 15 jpf (**figure 29**), les lots « Ltherm » sont regroupés, ce qui indique que le traitement thermique tardif en cours à 15 jpf sur ces lots a un effet sur l'expression des gènes dans le cerveau, ce qui n'avait encore jamais été observé. Ensuite, pour une descendance donnée, les lots « Témoin 28 » étaient proches des lots « Etherm ». Cela va, à priori, à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle le traitement thermique précoce agirait sur l'expression des gènes dans le cerveau (Rougeot et al., 2008). Cependant, les lots « Témoin 28 » et « Etherm » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique (FI : -0,68), se distinguent des lots « Témoin 28 » et « Etherm » des autres descendances. Il se pourrait que les cerveaux des tilapias de la descendance MaFa_1 étaient plus, ou moins développés par rapport à ceux des autres descendances et ne présentaient donc pas le même profil global d'expression génétique. Si c'était le cas, cette différence de développement pourrait être propice à une réponse au traitement thermique précoce qui a eu lieu sur une durée très courte. En effet, le timing par rapport aux stades de développement du cerveau a été montré comme étant un élément très important influençant la réponse au traitement thermique précoce chez le zebrafish (Abozaid et al., 2011; Sfakianakis et al., 2012). Néanmoins, étant donné que nous n'avons pas procédé à un suivi de la taille et du poids des juvéniles qui auraient pu accuser un retard, ou une avance de développement, cette hypothèse ne peut être vérifiée.

Comparaison de l'expression des gènes dans les lots traités

Les 119 GDEs dans les cerveaux à 15 jpf des lots « Ltherm » permettent de confirmer que les HTs peuvent avoir un effet sur l'expression des gènes dans le cerveau. De plus, certains de ces gènes (*jarid2b*, *MBTD1* et *kdm6bb*) qui sont sur-exprimés sont impliqués dans les voies épigénétiques (modifications des histones). Cela indiquerait donc un lien entre les HTs et des modifications épigénétiques dans le cerveau qui pourraient à leur tour influer sur l'expression des gènes. Il n'est cependant pas possible à ce stade de déterminer si des modifications épigénétiques ont lieu sur des gènes impliqués dans la différenciation du sexe tels que *cyp19a1b* (codant pour le type de l'aromatase du cerveau) qui n'est d'ailleurs pas différentiellement exprimé. Notons également la sur-expression d'un gène codant pour une protéine du choc thermique (*hsp70*) chez les lots « Ltherm » qui doit être liée au stress induit par le traitement thermique tardif en cours.

Concernant les lots ayant été soumis au traitement thermique précoce, l'absence de GDE pour les lots « Etherm » est cohérente avec le fait qu'ils ne répondaient en moyenne pas significativement au traitement thermique précoce (le diagramme de Venn de la **figure 30 C** est donc sans objet). Ensuite, au regard du diagramme de Venn de la **figure 30 F**, seuls 5 gènes montraient une tendance (non significative) à être communément sur- ou sous-exprimés dans les lots « Ltherm » et dans le lot « Etherm* » de la descendance MaFa_1 semblant répondre au traitement thermique précoce. Parmi, ces gènes, aucune fonction connue ne ressortait (**annexe 11 C**).

Deux hypothèses pourraient expliquer l'inversion sexuelle du lot « Etherm* » mais ne peuvent être vérifiées en raison du manque d'échantillon. D'abord, le gène *cyp19a1b* a été mis en évidence comme potentiellement impliqué dans l'inversion du sexe du tilapia du Nil suite à un traitement thermique précoce par Rougeot et al. (2008). En effet, ces derniers indiquent que le cerveau du tilapia du Nil est déjà présent sous forme de rudiment à 31 hpf et que la différenciation sexuelle pourrait s'opérer dans le cerveau avant les gonades via le gène *cyp19a1b*. Ils s'appuient sur les observations de précédentes études, par exemple sur le flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*), chez qui l'aromatase est d'abord exprimée à de plus hauts niveaux dans le cerveau puis dans les gonades, ce qui indiquerait que la différenciation sexuelle commence dans le cerveau. Enfin, l'agressivité de pseudofemelles tilapias (*Oreochromis aureus*) obtenues par traitement hormonal pourrait indiquer qu'elles aient développé un cerveau mâle durant le stade embryonnaire (Rougeot et al., 2008). Notons cependant qu'une seule descendance semblait avoir répondu au traitement et que le manque d'échantillon ne permettrait pas de tirer de conclusion significative sur l'expression de *cyp19a1b* chez cette descendance. Une autre hypothèse est que l'inversion du sexe après traitement thermique précoce ne soit pas du tout lié au cerveau. En effet, il est possible que les HTs agissent sur les cellules germinales primordiales présentes à 32 hpf, ayant alors pour effet de favoriser la voie de différenciation sexuelle mâle. De tels cas ont déjà été supposés ou observés chez d'autres espèces. Par exemple, chez le médaka, les HTs inhiberaient la prolifération et le développement des cellules germinales, ce qui empêcherait le développement des ovaires et permettrait celui des testicules. De façon similaire, l'apoptose des cellules germinales après traitement thermique précoce chez le zebrafish permet uniquement le développement des gonades mâles. Enfin, chez le tétraodon, le gène *dmrt1* spécifique aux mâles s'exprime dans les ovaires dont les cellules germinales ont dégénéré après traitement thermique précoce (Wessels et al., 2011).

6. CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis d'apporter de nouvelles preuves que le sexe ratio du tilapia du Nil, une espèce GSD + TE, pouvait être influencé par les traitements aux HTs appliqués de manière tardive (durant la période de différenciation des gonades). Par contre, elle n'a pas permis de prouver de façon significative que le sexe ratio était influencé par le traitement thermique précoce (durant le stade embryonnaire).

Traitements tarif

En ce qui concerne le traitement thermique tardif, la réponse était très élevée avec jusqu'à 100% de masculinisation dans les lots traités. L'ampleur de cette réponse, par rapport à celles obtenues sur des populations sauvages, peut être due à l'effet parental (les géniteurs utilisés ont été sélectionnés sur base de leurs lignées qui elles-mêmes répondaient aux traitements thermiques tardifs) et à la souche utilisée. En effet, la souche originelle des tilapias de cette étude provenant du lac Manzala est adaptée à des températures relativement élevées, ce qui favoriserait l'homogénéité des réponses au traitement. De plus, les individus d'élevage sont sujet à une diminution de la diversité génétique liée aux croisements, aux sélections et à leur maintien dans des conditions d'élevage contrôlées. Cela pourrait également résulter en une réponse plus homogène et exacerbée au traitement thermique tardif. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces inversions sexuelles est que des modifications épigénétiques engendrées par les HTs impacteraient l'expression des gènes de la différenciation du sexe. Dans notre étude, l'analyse de l'expression des gènes dans les gonades des lots traités tardivement montraient des résultats similaires aux études précédentes, avec des gènes impliqués (ou soupçonnés d'être impliqués) dans la voie de différenciation sexuelle mâle sur-exprimés par rapport aux lots témoins (*amh*, *dmrt1* et *cyp11b2*) tandis que des gènes impliqués dans la voie de différenciation sexuelle femelle étaient sous-exprimés (*foxl2* et *cyp19a1a*).

Traitements précoce VS traitement tardif

Quant à la réponse au traitement thermique précoce, elle était moins évidente, avec une seule descendance dont le sexe ratio avait clairement été dévié en faveur des mâles. Si l'on part du principe que le traitement thermique précoce peut réellement provoquer une inversion du sexe, comme cela semble avoir été le cas pour l'une de nos descendances et pour d'autres dans le cadre de l'étude de Rougeot et al. en 2008, ce résultat en demi-teinte pourrait être attribué à un mauvais timing du traitement ou encore à des différences de vitesse de développement parmi les descendances. En effet, une première hypothèse pour expliquer l'effet des HTs sur le sexe ratio lors du traitement thermique

précoce est que ces dernières influeraient sur l'expression du gène *cyp19a1b* codant pour le type de l'aromatase dans le cerveau. Or, les têtes des tilapias de la descendance MaFa_1 semblaient montrer des profils globaux d'expression génétique différents des autres descendances. Nous pourrions donc supposer que cela soit dû à un cerveau plus, ou moins développés par rapport à ceux des autres descendances et que cette différence de développement soit propice à une réponse au traitement thermique précoce qui a eu lieu sur une durée très courte. Cependant, cela n'a pu être vérifié.

L'analyse de l'expression des gènes dans les têtes à 15 jpf n'a pas identifié le gène *cyp19a1b* ni aucun autre gène comme étant différentiellement exprimés par rapport aux témoins dans le cerveau des tilapias ayant été soumis au traitement thermique précoce, peut-être car seule une descendance sur 4 répondait au traitement. Pourtant, les HTs semblent bel et bien avoir un effet sur l'expression des gènes dans le cerveau. En effet, à 15 jpf, des gènes étaient différentiellement exprimés par rapport aux témoins, dans les têtes des tilapias qui étaient en cours de traitement thermique tardif. Parmi ces gènes, certains étaient impliqués dans les modifications épigénétiques des histones (*jarid2b*, *MBTD1* et *kdm6bb*), ce qui indiquerait un lien entre les HTs et des changements épigénétiques dans le cerveau.

Quant au profil d'expression des gènes dans les gonades des lots ayant été soumis au traitement thermique précoce, il montrait moins de gènes différentiellement exprimés par rapport aux lots témoins que dans le cas des lots traités tardivement. De plus, aucun gène lié à la différenciation du sexe n'en faisait partie. Toutefois, cela est probablement dû au fait qu'une seule descendance semblait répondre au traitement thermique précoce. Notons finalement une autre hypothèse permettant d'expliquer l'inversion du sexe après traitement thermique précoce : ce dernier provoquerait l'apoptose des cellules germinales primordiales présentes à 31 hpf, ce qui favoriserait le développement de testicules à la place des ovaires. Cependant, cela n'a pas été vérifié dans le cadre de cette étude.

Répétabilité au fil des reproductions

Concernant la répétabilité des résultats au fil des reproductions d'un même couple de géniteurs, les trois descendances qui étaient issues des mêmes parents dans notre étude montraient toutes trois une forte réponse au traitement thermique tardif. *A contrario*, leurs sexe ratios divergeaient suite au traitement thermique précoce, l'une semblant avoir subi une masculinisation tandis que les autres pas. De manière générale, cette étude ne confirme donc pas l'existence d'un effet parental. Elle ne permet pas non plus de le réfuter, même dans le cas du traitement thermique précoce, étant donné l'influence probable d'autres facteurs tels que des différences de vitesse de développement.

Perspectives...

Nous avons lancé les premières mises au point de l'analyse de l'état de méthylation de l'ADN génomique par la méthode du Nanopore. L'objectif futur serait d'avoir un processus d'analyse complet de la méthylation. Nous pourrions ainsi comparer des données d'expression obtenues avec les données concernant l'état de méthylation des gènes et voir si des corrélations existent. Cela nous permettra de mieux comprendre le rôle de la méthylation dans le cas des changements de sexe à hautes températures chez le tilapia du Nil.

Des expériences supplémentaires seraient également nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-tendant l'inversion du sexe qui semble s'opérer dans certains cas lors de traitements thermiques précoces. Différents protocoles pourraient être testés afin d'optimiser l'impact sur le sexe ratio (mise au point du temps de traitement des œufs et identification d'une période de thermosensibilité critique). Une fois la méthodologie bien aboutie, il faudrait analyser à nouveau l'expression des gènes et la méthylation. Il ne faudrait surtout pas recommencer l'expérience telle que décrite dans ce travail car elle n'est pas fiable sur le point de la méthodologie (trop de variations inexpliquées, inefficacité du traitement en l'état).

Enfin, nous pourrions envisager une expérience où nous regarderions l'évolution du nombre cellules germinales (Primordi Germ Cell ou PGCs) au cours du traitement thermique. En effet, comme il fut mentionné pour le zebrafish, c'est le nombre total de PGCs qui détermine le destin sexuel mâle ou femelle. Lors des traitements à haute température, il fut mis en évidence une déplétion massive des PGCs conduisant l'animal vers une voie de développement mâle. Ce cas de figure n'a pas encore été étudié ou mis en évidence chez le tilapia du Nil à notre connaissance. De façon plus concrète, nous pourrions générer une lignée mutante rapporteuse pour un gène marqueur des PGCs (gène nanos3) et suivre ainsi l'évolution du pool de PGCs au cours de traitement précoce et/ou tardifs.

Bibliographie

- Abozaid, H., Wessels, S., & Hörstgen-Schwarz, G. (2011). Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*, 5, 259–265.
- Anasagasti, A., Irigoyen, C., Barandika, O., López de Munain, A., & Ruiz-Ederra, J. (2012). Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *VISION RESEARCH*.
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T. L., ... Vamosi, J. C. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology*, 12(7), 1–13.
- Baroiller, J.-F. (1998). Le déterminisme environnemental du sexe chez les poissons gonochoriques. *La Pisciculture Française*, 133(femelle XX), 51–59.
- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A., & Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*, 273(3), 216–223.
- Baroiller, J. F., Cotta, H. D., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-schwarz, G. (2009). Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Tilapia sex determination : Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 153(1), 30–38.
- Bezaury, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., & Baroiller, J.-F. (2007). Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, (272S1), S3–S16.
- Bret, C., & Schved, J. F. (2009). Le contrôle de l'expression des gènes par les microARN. Implications au cours de l'hématopoïèse et des hémopathies malignes Regulation of gene expression by miRNA. *Correspondances en Onco-hématologie*, IV(1), 15–20.
- Crews, D., Fleming, A., Willingham, E., Baldwin, R., & Skipper, J. K. (2001). Role of Steroidogenic Factor 1 and Aromatase in Temperature-Dependent Sex Determination in the Red-Eared Slider Turtle. *Journal of experimental zoology*, 290, 597–606.
- Corney, D. C., Basturea G. N., Jefferson, T. (2013). RNA-seq Using Next Generation Sequencing. *MATER METHODS*, 3, 203.
- FAO, Cultured Aquatic Species Information Programme - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) consulté en juillet 2018, repéré à http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en
- FishBase, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Nile tilapia. Consulté en juillet 2018. repéré à <https://www.fishbase.de/summary/Oreochromis-niloticus+niloticus.html>
- Ge, Z., Schatten, H., Zhang, C., & Sun, Q. (2015). Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction Review*, 149, R103–R114.
- Gennotte, V., Elard, C. M., Cotta, H. D., Baroiller, O. I. S., & Rougeot, C. (2014). The Sensitive Period for Male-to-Female Sex Reversal Begins at the Embryonic Stage in the Nile Tilapia and is Associated With the Sexual Genotype. *Wiley Periodicals*, 81, 1146–1158.

- Göpfrich, K., & Judge, K. (2018). Decoding DNA with a pocket-sized sequencer. *Biology, Health*, (43), 17–20.
- Guerrero, R. D., & Shelton, W. L. (1974). An aceto-Carmine squash method for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1), 56.
- Hake, L. & O'Connor, C. (2008) Genetic Mechanisms of Sex Determination. *Nature Education*, 1(1), 25.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.-S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., ... Nagahama, Y. (2008). Sexual Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2), 333–341.
- Jiang, Y., Langley, B., Lubin, F. D., Renthal, W., Wood, M. A., Yasui, D. H., ... Beckel-mitchener, A. C. (2008). Epigenetics in the Nervous System. *The Journal of Neuroscience*, 28(46), 11753–11759.
- Iyer, A. K., & McCabe, E. R. B. (2004). Molecular mechanisms of DAX1 action. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83, 60–73.
- Labbé, C., Robles, V., & Herraez, M. P. (2017). Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture*, 472, 93–106.
- Lennartsson, A., & Ekwall, K. (2009). Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(9), 863–868.
- Li, C. G., Wang, H., Chen, H. J., Zhao, Y., Fu, P. S., & Ji, X. S. (2014). Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 177–178, 36–45.
- Longrie, N., Poncin, P., Denoel, M., Gennotte, V., Delcourt, J., & Parmentier, E. (2013). Behaviours Associated with Acoustic Communication in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLOS ONE*, 8(4).
- Lopopolo, M. & Lonie, L. (2017). Sequencing Quality Control. Consulté en juillet 2018, repéré à <https://www.well.ox.ac.uk/ogc/sequencing-quality-monitoring-run/>
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15(1), 17–29.
- Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(3), 300–307.
- Messerschmidt, D. M., Knowles, B. B., & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos, 812–828.
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2016). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. *Agilent Technologies*, Publication n° 5989-1165EN
- Mutter, G. L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberg, D., Finkelstein, D., Baker, H. E., & Warrington, J. A. (2004). Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 5, 1–7.
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., & 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 Genetics*, 7(12).

Oxford nanopore technology, Rapid Sequencing Kit - Workflow. Consulté en octobre 2018. repéré à <https://store.nanoporetech.com/kits/rapid-sequencing-kit.html>

Piferrer, F., Ribas, L., & Díaz, N. (2012). Genomic Approaches to Study Genetic and Environmental Influences on Fish Sex Determination and Differentiation. *Marine Biotechnology*, 14(5), 591–604.

Poonlaphdecha, S., Pepey, E., Canonne, M., Verdal, H. De, Baroiller, J., & Cotta, H. D. (2013). General and Comparative Endocrinology Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both dmrt1 and amh expressions. *General and Comparative Endocrinology*, 193, 234–242.

Rougeot, C., Prignon, C., Ngouana Kengne, C. V., & Mélard, C. (2008). Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 276(1–4), 205–208.

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Review Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166(4), 822–839.

Sfakianakis, D. G., Leris, I., Mylonas, C. C., & Kentouri, M. (2012). Temperature during early life determines sex in zebrafish , *Danio rerio* (Hamilton , 1822). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 17, 68–73.

Simpson, J. T., Workman, R. E., David, M., Dursi, L. J., & Timp, W. (2017). Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nature Methods*, 14, 407–410.

Smith-vikos, T., & Slack, F. J. (2012). MicroRNAs and their roles in aging. *Journal of Cell Science*, 125, 7-17.

Sun, L. X., Teng, J., Zhao, Y., Li, N., Wang, H., & Ji, X. S. (2018). Gonad Transcriptome Analysis of High-Temperature- Treated Females and High-Temperature-Induced Sex-Reversed Neomales in Nile Tilapia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 689.

Tao, W., Chen, J., Tan, D., Yang, J., Sun, L., Wei, J., ... Wang, D. (2018). Transcriptome display during tilapia sex determination and differentiation as revealed by RNA-Seq analysis. *BMC Genomics*, 19, 363.

Tessema, M., Müller-Belecke, A., & Hörstgen-Schwark, G. (2006). Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, 258(1–4), 270–277.

Théry, F. (2014). L ' importance biologique des ARN non codants : perspectives historique et philosophique. Université Panthéon-Sorbonne - Paris I.

Tidjou, D. G. S. (2018). Etude de l'hérabilité de la thermosensibilité selon la méthode utilisée pour générer les géniteurs males à génotype XX chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Université de Liège et Université de Namur).

Van Nes, S., & Andersen, O. (2006). Temperature Effects on Sex Determination and Ontogenetic Gene Expression of the Aromatases cyp19a and cyp19b , and the Estrogen Receptors esr1 and esr2 in Atlantic Halibut (Hippoglossus Hippoglossus). *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1481–1490.

Wang, Y. Y., Sun, L. X., Zhu, J. J., Zhao, Y., Wang, H., & Liu, H. J. (2017). Epigenetic control of cyp19a1a expression is critical for high temperature induced Nile tilapia masculinization. *Journal of Thermal Biology*, 69(April), 76–84.

- Wessels, S., Krause, I., Floren, C., Schütz, E., Beck, J., & Knorr, C. (2017). ddRADseq reveals determinants for temperature-dependent sex reversal in Nile tilapia on LG23. *BMC Genomics*, 18, 531.
- Wessels, S., Samavati, S., & Hörstgen-Schwark, G. (2011). Effect of early temperature treatments on sex differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* lines selected for high and low thermosensitivity. *Aquaculture*, 316(1–4), 139–142.
- Wilson, C. A., High, S. K., Mccluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T. A., ... Postlethwait, J. H. (2014). Wild Sex in Zebrafish : Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics*, 198, 1291-1308.
- Wirth, D., Gustin, P., Drion, P.-V., Dessy-Doize, C., & Chrictians, E.-S. (2002). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). *Ann. Méd. Vét*, 146, 201–216.
- Yan, H., Ijiri, S., Wu, Q., Kobayashi, T., Li, S., Nakaseko, T., ... Nagahama, Y. (2012). Expression Patterns of Gonadotropin Hormones and Their Receptors During Early Sexual Differentiation in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*1. *Biology of Reproduction*, 87(5).
- Zakhari, S. (2013). Alcohol Metabolism and Epigenetics changes. *Alcohol research : Current Review*, 6-13

Annexes

Annexe 1

Tableau S1 : Données relatives aux échantillons d'ARN. Les ratios 260/230 après lavage au LiCl ne sont pas présentés car les valeurs mesurées au NanoDrop étaient biaisées dû à la faible concentration d'ARN. Les échantillons en rouge n'ont pas été séquencés à cause de la quantité trop faible de leurs librairies. Notons que nous n'avions pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2. Les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être échantillonnées à 40 jpf à cause du manque d'effectifs à ce stade (au moins 50 individus devaient être conservés pour les sexages à 4-5 mois). Les échantillons de têtes à 40 jpf ont quant à eux été perdus suite à un problème technique lors de leur transport.

Descendance	Stade (jpf)	Lot	Tissus	260/230 initial	260/230 après lavage au LiCl	Quantité librairies (ng/ul)	260/280	RIN
MaFa_1	15	Temoind 28	Gonades	1,68	/	31,5	2,01	7
MaFa_1	15	Temoind 28	Têtes	2,28	/	43,13	2,07	9,4
MaFa_1	15	Etherm	Gonades	1,51	/	34,14	2,06	6,5
MaFa_1	15	Etherm	Têtes	2	/	41,82	2,07	8,5
MaFa_1	15	Ltherm	Gonades	0,84	/	13,89	1,96	6,1
MaFa_1	15	Ltherm	Têtes	2,12	/	43,55	2,08	8,7
<hr/>								
MaFa_1	40	Temoind 28	Gonades	2,02	/	59,36	2,04	7,9
MaFa_1	40	Etherm	Gonades	1,05	/	51,08	1,99	7,8
MaFa_1	40	Ltherm	Gonades	1,65	/	11,28	2,03	6,4
<hr/>								
MaFa_2	15	Etherm	Gonades	1,52	/	29,14	2,12	6,1
MaFa_2	15	Etherm	Têtes	2,22	/	44,01	2,1	8,7
MaFa_2	15	Ltherm	Gonades	0,27	/	5,92	2,2	6,3
MaFa_2	15	Ltherm	Têtes	2,22	/	47,08	2,11	8,6
<hr/>								
MaFa_3	15	Temoind 28	Gonades	1,95	/	27,89	2,09	7,9
MaFa_3	15	Temoind 28	Têtes	2,3	/	41,97	2,07	8,9
MaFa_3	15	Etherm	Gonades	1,28	/	20,7	1,92	6,5
MaFa_3	15	Etherm	Têtes	2,16	/	47,56	2,06	9
MaFa_3	15	Ltherm	Gonades	1,15	/	39,4	1,96	6,2
MaFa_3	15	Ltherm	Têtes	1,92	/	50,03	2,08	8,8
<hr/>								
MbFb	15	Temoind 28	Gonades	1,29	/	5,78	2,02	6,6
MbFb	15	Temoind 28	Têtes	1,76	/	40,7	2,07	8,8
MbFb	15	Etherm	Gonades	0,32	/	10,59	2,06	6,9
MbFb	15	Etherm	Têtes	2,31	/	44,34	2,06	8,8
MbFb	15	Ltherm	Gonades	0,9	/	1,41	1,87	6,5
MbFb	15	Ltherm	Têtes	1,53	/	51	2,04	8,6
<hr/>								
MbFb	40	Temoind 28	Gonades	2,06	/	21,42	2,04	4,8
MbFb	40	Etherm	Gonades	1,88	/	26,21	2,05	6,3
MbFb	40	Ltherm	Gonades	0,91	/	7,37	1,72	6

Annexe 2

Tableau S2 : RIN moyens (RNA integrity numbers) et sd (écart types standards) obtenus après analyse au bioanalyzer et permettant d'évaluer la qualité des échantillons d'ARN.

Stade	Lot	Tissus	Mean RIN	sd
15	Témoin 28	Gonades	7,166667	0,665833
15	Témoin 28	Têtes	9,033333	0,321455
15	Etherm	Gonades	6,5	0,326599
15	Etherm	Têtes	8,75	0,208167
15	Ltherm	Gonades	6,275	0,170783
15	Ltherm	Têtes	8,675	0,095743
40	Témoin 28	Gonades	6,35	2,192031
40	Etherm	Gonades	7,05	1,06066
40	Ltherm	Gonades	6,2	0,282843

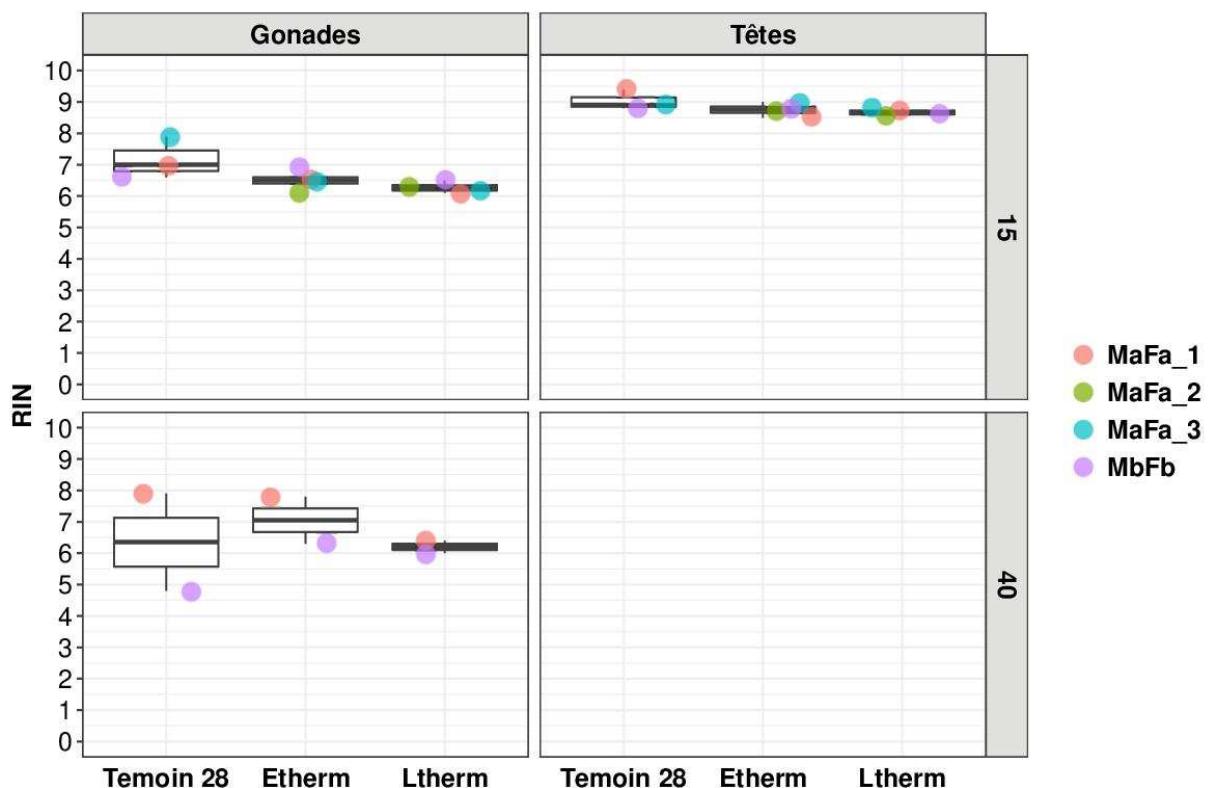


Figure S1 : RIN présentés en fonction des tissus (têtes ou gonades), des stades de développement (15 et 40 jpf) et des lots de tilapias du Nil (« Témoin28 », « ETherm » et LTherm) pour chaque descendance. Notons que nous n'avions pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2. Les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être échantillonnées à 40 jpf à cause du manque d'effectifs à ce stade (au moins 50 individus devaient être conservés pour les sexages à 4-5 mois). Les échantillons de têtes à 40 jpf ont été perdus suite à un problème technique lors de leur transport.

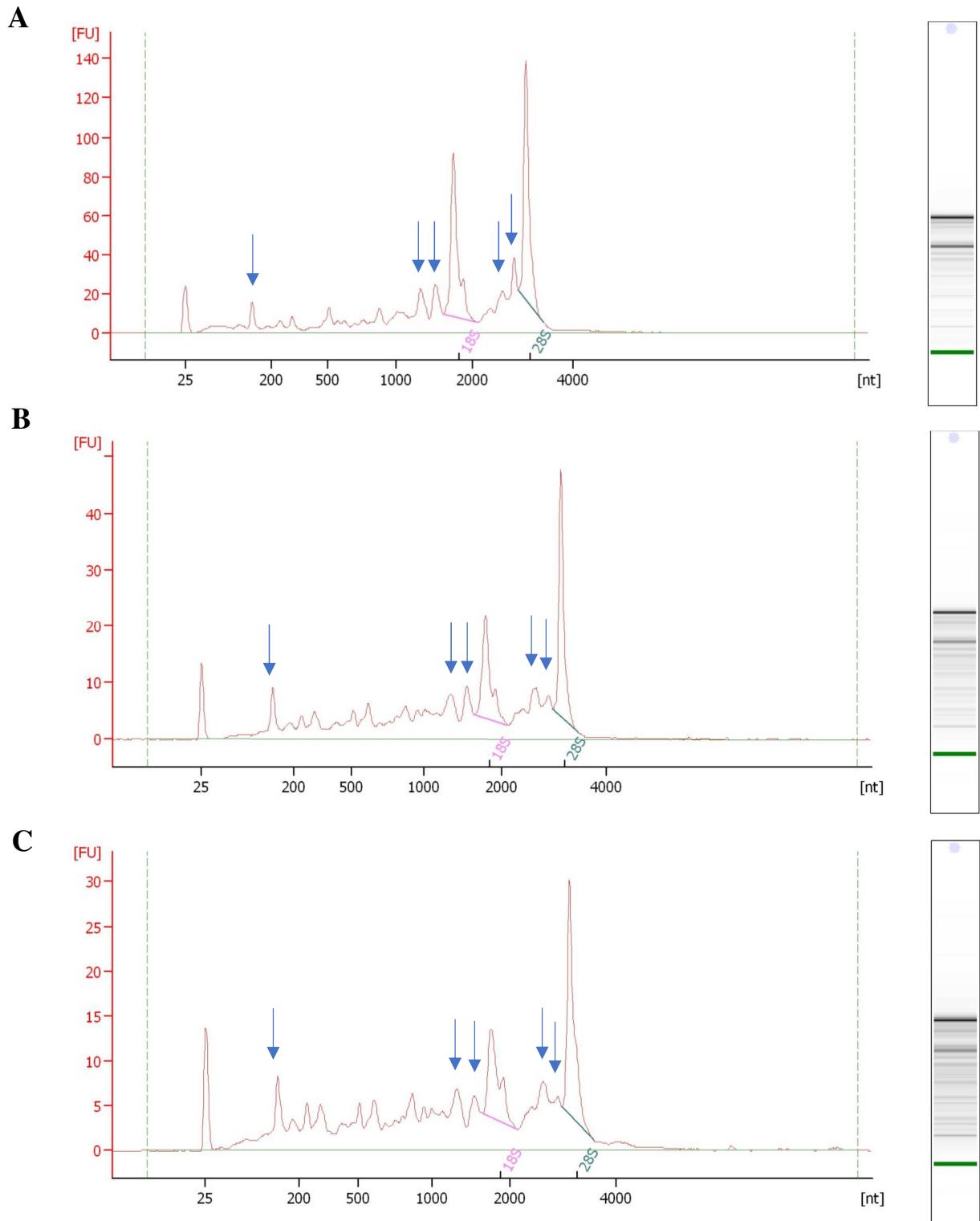


Figure S2 : Exemples d'électrophérogrammes obtenus après analyse au bioanalyzer. Le graphe A correspond à un échantillon de gonades à 15 jpf prélevées dans le cadre d'une étude sur une population sauvage de tilapias du Nil (RIN de 7.6). Les deux autres graphes (B et C) correspondent aux échantillons de gonades à 15 jpf des lots « ETherm » des descendances MbFb et MaFa_2 (RIN de 6.9 et 6.1 respectivement). En théorie, leurs valeurs de RIN inférieures à 8 indiquent une dégradation trop importante de l'ARN pour le séquençage. Cette dégradation de l'ARN s'identifie habituellement par la présence de pics « parasites » en plus des pics 18S et 28S habituels. Cependant, il apparaît que dans le cas des gonades de tilapia du Nil, les pics « parasites » les plus marqués sont redondants d'un échantillon à l'autre (flèches bleues). Il semblerait donc qu'ils ne soient pas dû à une dégradation aléatoire de l'ARN par des RNases. C'est pourquoi nous avons décidé de séquencer ces échantillons malgré un RIN faible.

Annexe 3

Tableau S3 : rapports 260/280 moyens devant théoriquement être proche de 2.04, une valeur plus faible pouvant indiquer une contamination par des protéines.

Stade	Lot	Tissus	Mean 260/280	sd
15	Témoin 28	Gonades	2,04	0,043589
15	Témoin 28	Têtes	2,07	0
15	Etherm	Gonades	2,04	0,084853
15	Etherm	Têtes	2,0725	0,01893
15	Ltherm	Gonades	1,9975	0,14151
15	Ltherm	Têtes	2,0775	0,028723
40	Témoin 28	Gonades	2,04	0
40	Etherm	Gonades	2,02	0,042426
40	Ltherm	Gonades	1,875	0,219203

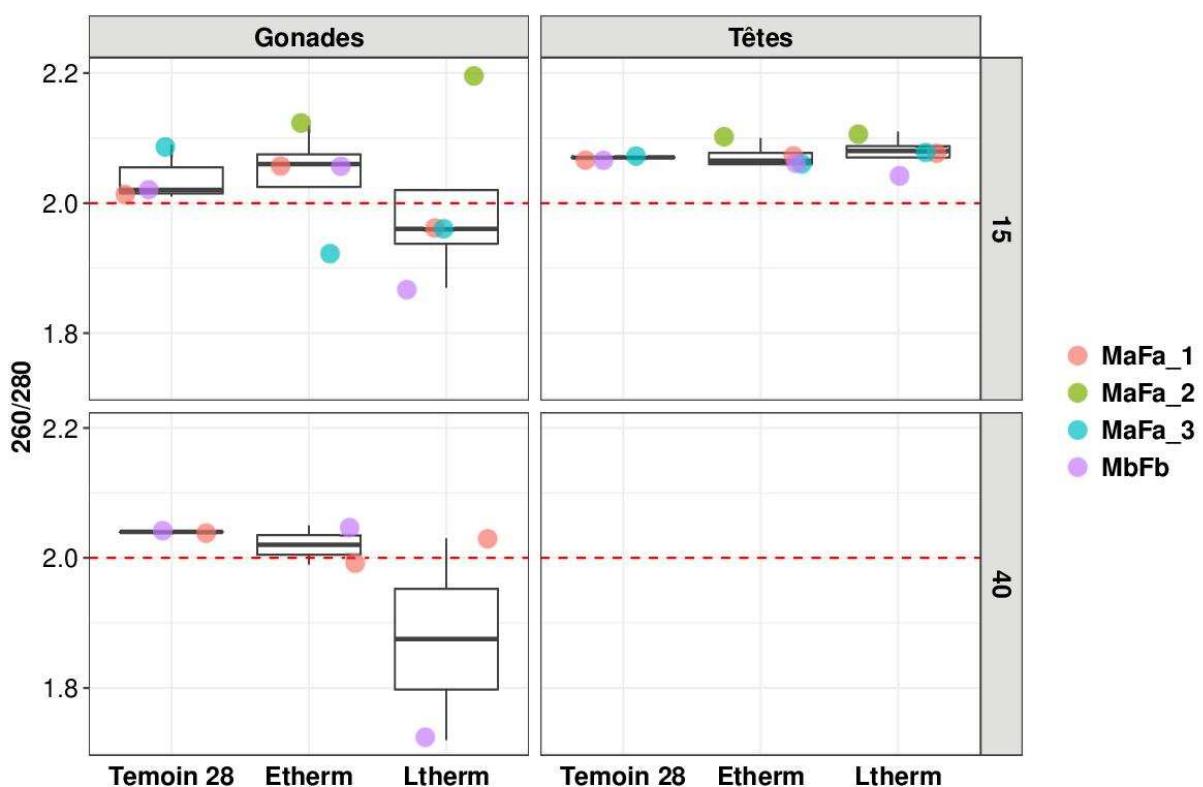


Figure S3 : Rapports 260/280 présentés en fonction des tissus (têtes ou gonades), des stades de développement (15 et 40 jpfs) et des lots de tilapias du Nil (« Témoin28 », « ETherm » et LTherm) pour chaque descendance. Notons que nous n'avions pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2. Les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être échantillonnées à 40 jpfs à cause du manque d'effectifs à ce stade (au moins 50 individus devaient être conservés pour les sexages à 4-5 mois). Les échantillons de têtes à 40 jpfs ont quant à eux été perdus suite à un problème technique lors de leur transport.

Annexe 4

Tableau S4 : Rapports 230/260 moyens avant lavage au LiCl devant théoriquement se situer entre 2.0 et 2.2. Une valeur plus faible indique la présence de contaminants organiques (EDTA, phénol, carbohydrates...) dans les échantillons.

Stade	Lot	Tissus	Mean 260/230	sd
15	Témoin 28	Gonades	1,64	0,331813
	Témoin 28	Têtes	2,113333	0,306159
	Etherm	Gonades	1,1575	0,569232
	Etherm	Têtes	2,1725	0,13048
	Ltherm	Gonades	0,79	0,371753
	Ltherm	Têtes	1,9475	0,305
40	Témoin 28	Gonades	2,04	0,028284
	Etherm	Gonades	1,465	0,586899
	Ltherm	Gonades	1,28	0,523259

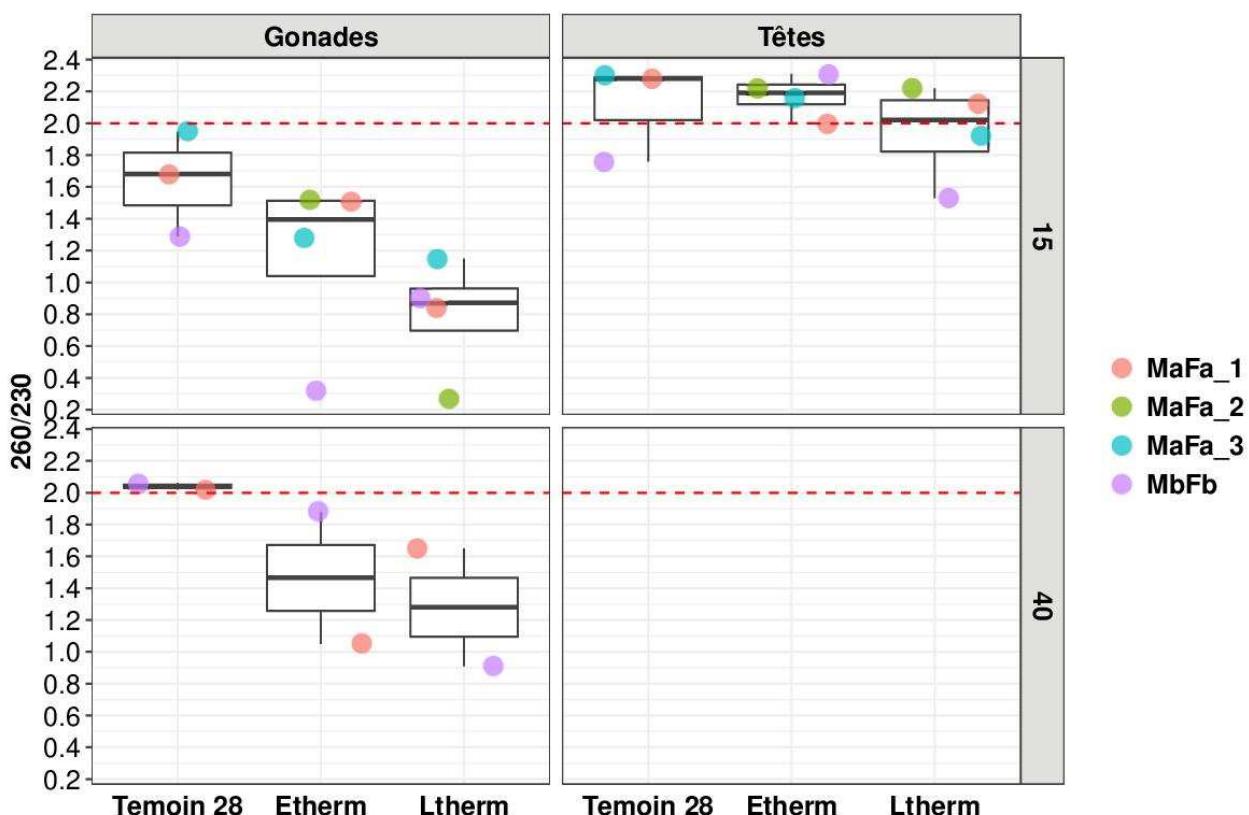
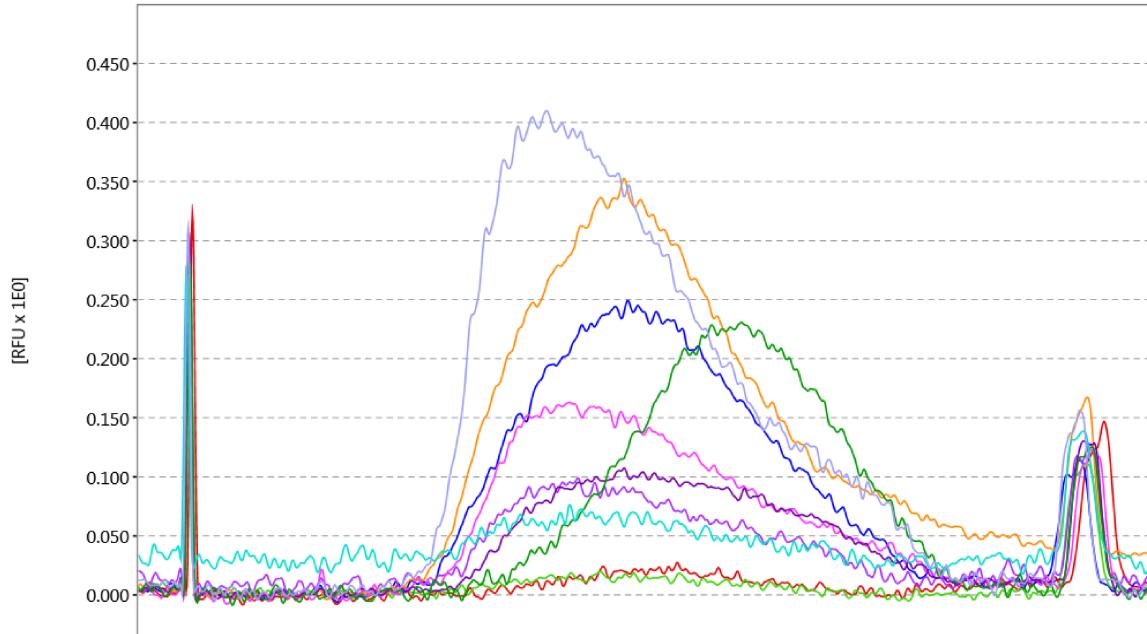


Figure S4 : Rapports 230/260 avant lavage au LiCl présentés en fonction des tissus (têtes ou gonades), des stades de développement (15 et 40 jpf) et des lots de tilapias du Nil (« Témoin28 », « ETherm » et LTherm ») pour chaque descendance. Etant donné que beaucoup d'échantillons avaient un ratio 230/260 inférieur à la limite de 2.0, nous avons procédé à un lavage au LiCl afin d'éliminer toute trace de contaminants. Notons que nous n'avions pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2. Les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être échantillonnées à 40 jpf à cause du manque d'effectifs à ce stade (au moins 50 individus devaient être conservés pour les sexages à 4-5 mois). Les échantillons de têtes à 40 jpf ont été perdus suite à un problème technique lors de leur transport.

Annexe 5

A



B

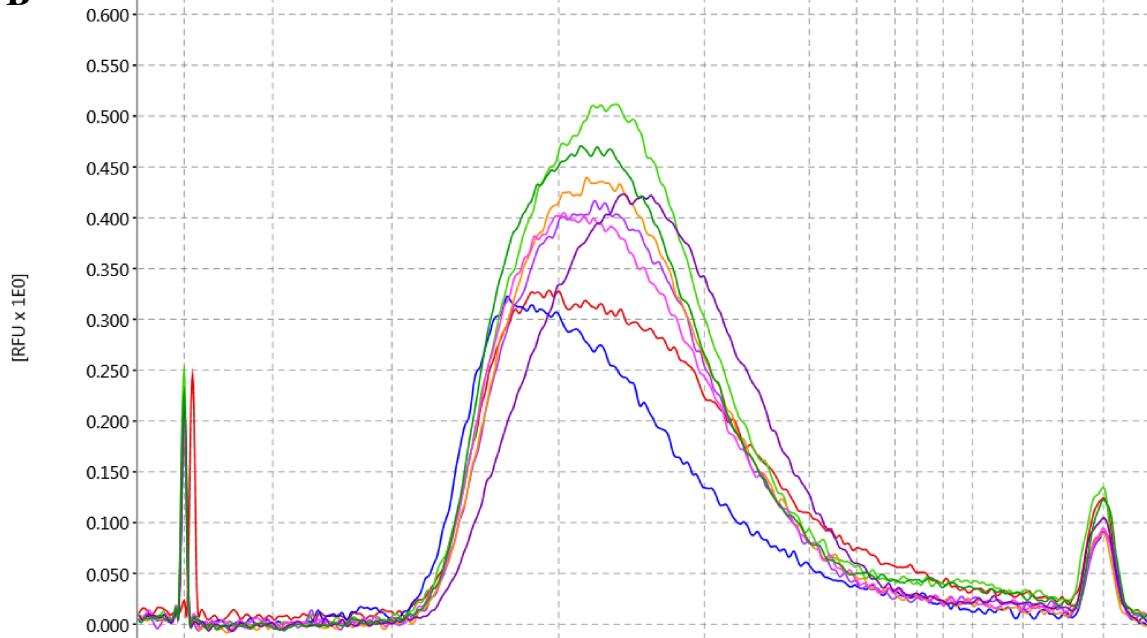


Figure S5 : Graphiques résumant l'analyse de la qualité des librairies avant séquençage (QiAxcel). L'axe des abscisses correspond à la taille des fragments d'ADNc (en pb) et l'axe des ordonnées à leur quantité (unité arbitraire). Sur un même graphique, chaque courbe correspond à un échantillon distinct. Les courbes de distribution doivent théoriquement être centrées sur une longueur de fragment de 300 pb. L'homogénéité des tailles des fragments est importante car les fragments de plus petite taille adhèrent plus facilement à la flowcell que ceux de grande taille et peuvent donc être sur-représentés. Le graphique A présente les distributions des différentes tailles de fragments avant et le graphique B après lavage au LiCl. On constate que le lavage a amélioré la qualité de la librairie du point de vue de la quantité et de la taille des fragments (courbes du graphique B centrées sur 300 pb).

Annexe 6

Tableau S5 : Quantités finales moyennes des librairies juste avant séquençage.

Stade	Traitement	Tissus	Mean Quantity ng/ul	sd
15	Temoin 28	Gonades	3,063333	3,210332
15	Temoin 28	Têtes	803,8733	127,5119
15	Etherm	Gonades	3,845	2,996114
15	Etherm	Têtes	672,8025	109,439
15	Ltherm	Gonades	2,075	3,722736
15	Ltherm	Têtes	384,8875	253,1588
40	Temoin 28	Gonades	47,58	32,96532
40	Etherm	Gonades	60,325	73,4189
40	Ltherm	Gonades	1,755	0,572756

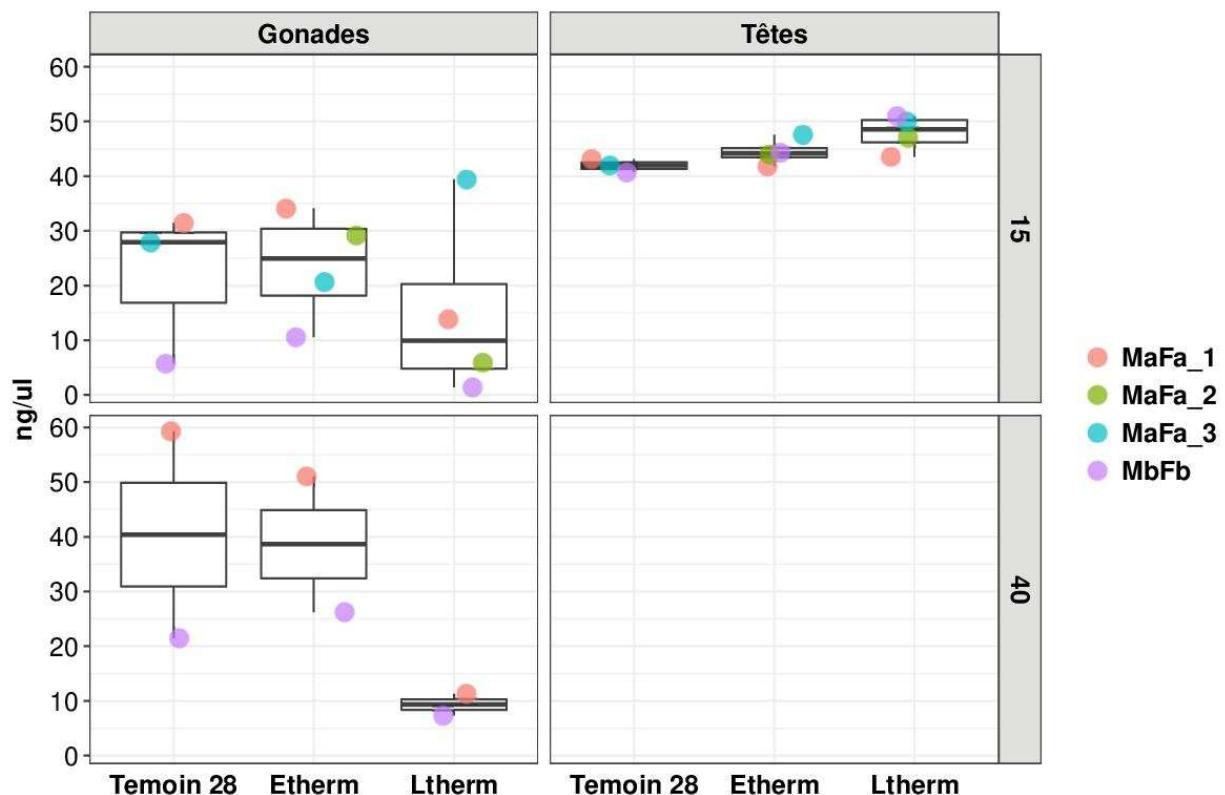


Figure S6 : Quantités finales moyennes des librairies présentées en fonction des tissus (têtes ou gonades), des stades de développement (15 et 40 jpf) et des lots de tilapias du Nil (« Témoin28 », « ETherm » et LTherm ») pour chaque descendance. Notons que nous n'avions pas de lot « Témoin 28 » pour la descendance MaFa_2. Les descendances MaFa_2 et MaFa_3 n'ont pas pu être échantillonnées à 40 jpf à cause du manque d'effectifs à ce stade (au moins 50 individus devaient être conservés pour les sexages à 4-5 mois). Les échantillons de têtes à 40 jpf ont été perdus suite à un problème technique lors de leur transport.

Annexe 7

Tableau S6 : Récapitulatif issu du rapport de contrôle de la qualité des séquençages (multiQC). Il indique le pourcentage de duplication (c'est-à-dire la répétition de clusters identiques sur la flowcell qui dépend de la richesse de la librairie et de la compétition entre les fragments de différentes tailles), le pourcentage de nucléotides C et G (en théorie proche de 50%), ainsi que le nombre de fragments séquencés (en millions).

Nom de l'échantillon	% Duplication	% GC	M Seqs
FaMa_1 15jpf Etherm Gonade	48.7%	47%	10.1
FaMa_1 15jpf Etherm Tete	46.4%	48%	9.9
FaMa_1 15jpf Ltherm Gonade	51.6%	47%	10.6
FaMa_1 15jpf Ltherm Tete	45.1%	48%	9.9
FaMa_1 15jpf Temoin 28 Gonade	48.9%	47%	9.9
FaMa_1 15jpf Temoin 28 Tete	47.2%	49%	10.8
FaMa_1 40jpf Etherm Gonade	45.0%	47%	10.5
FaMa_1 40jpf Ltherm Gonade	52.0%	48%	9.9
FaMa_1 40jpf Temoin 28 Gonade	46.5%	47%	10.4
FaMa_2 15jpf Etherm Gonade	56.0%	48%	10.6
FaMa_2 15jpf Etherm Tete	44.8%	48%	9.8
FaMa_2 15jpf Ltherm Tete	46.0%	48%	10.7
FaMa_3 15jpf Etherm Gonade	52.6%	48%	10.7
FaMa_3 15jpf Etherm Tete	44.8%	48%	10.0
FaMa_3 15jpf Ltherm Gonade	50.9%	48%	9.9
FaMa_3 15jpf Ltherm Tete	44.7%	48%	10.4
FaMa_3 15jpf Temoin 28 Gonade	49.3%	47%	10.1
FaMa_3 15jpf Temoin 28 Tete	48.1%	50%	11.0
FbMb 15jpf Etherm Gonade	60.0%	48%	10.7
FbMb 15jpf Etherm Tete	45.9%	49%	9.8
FbMb 15jpf Ltherm Tete	45.4%	48%	10.7
FbMb 15jpf Temoin 28 Tete	47.9%	49%	11.6
FbMb 40jpf Etherm Gonade	56.1%	46%	10.9
FbMb 40jpf Ltherm Gonade	63.6%	49%	9.9
FbMb 40jpf Temoin 28 Gonade	54.7%	47%	10.5

FastQC: Mean Quality Scores

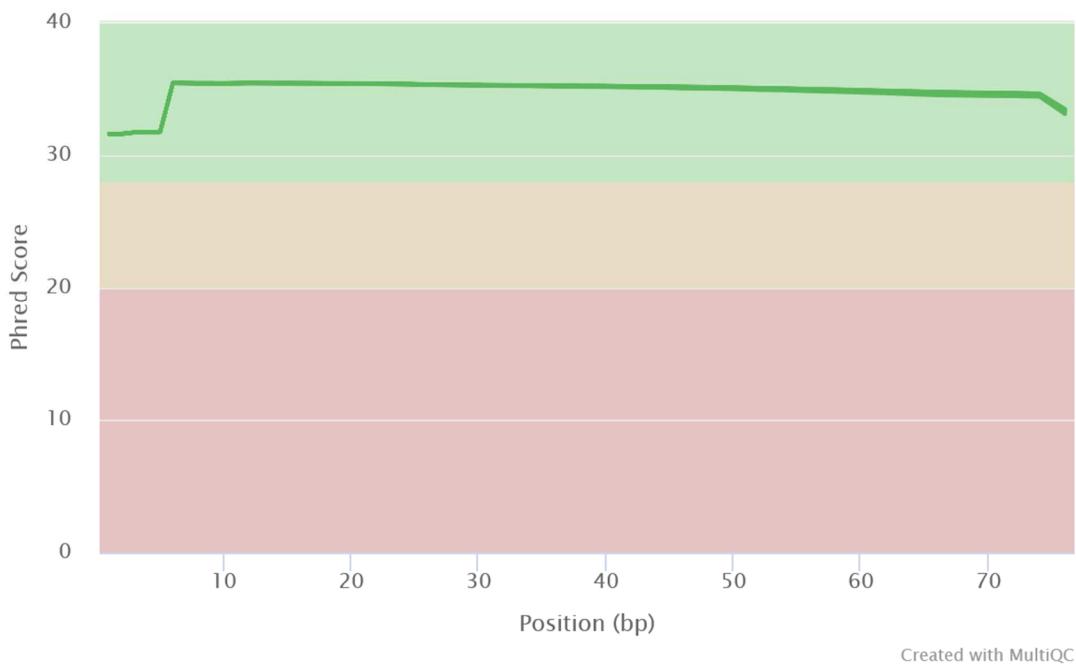


Figure S7 : Qualité moyenne des séquençages des fragments par base établie par le multiQC. L'axe des abscisses correspond à la position des bases (0 à 75) et l'axe des ordonnées au « Phred Score » qui dans notre cas est supérieur à 30, indiquant une précision d'identification d'au moins 99,9% pour une base donnée. La zone verte correspond à une bonne qualité de séquençage.

FastQC: Per Base N Content

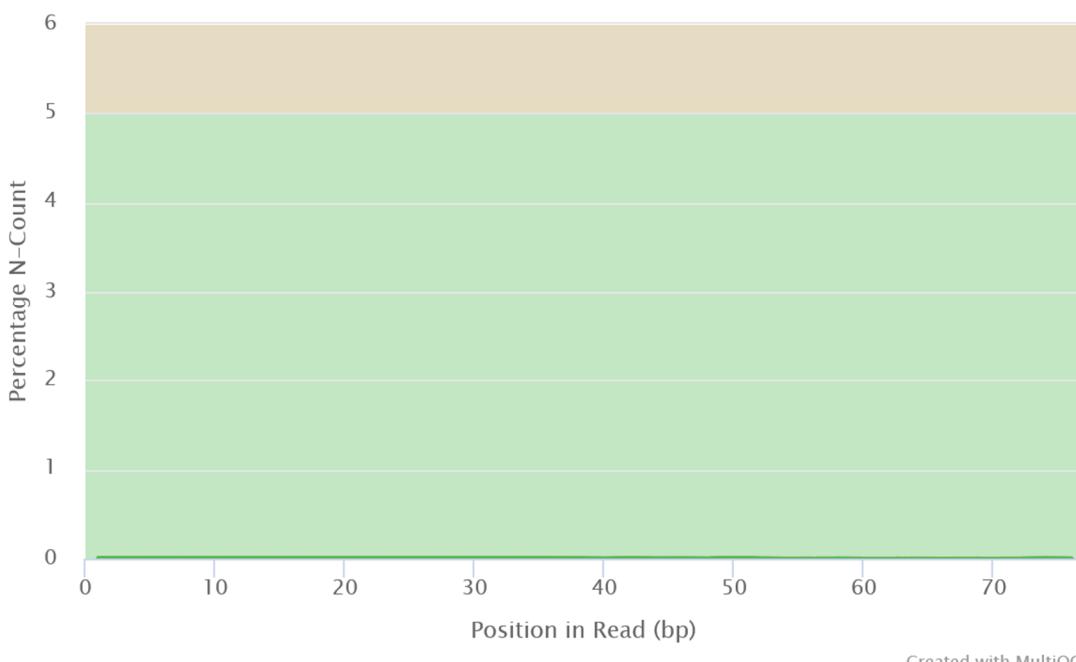


Figure S8 : Pourcentage moyen de bases non déterminées (N) en fonction de la position sur les fragments établi par le multiQC. Ce graphique indique que nous n'avons pas de bases non déterminées.

FastQC: Sequence Length Distribution

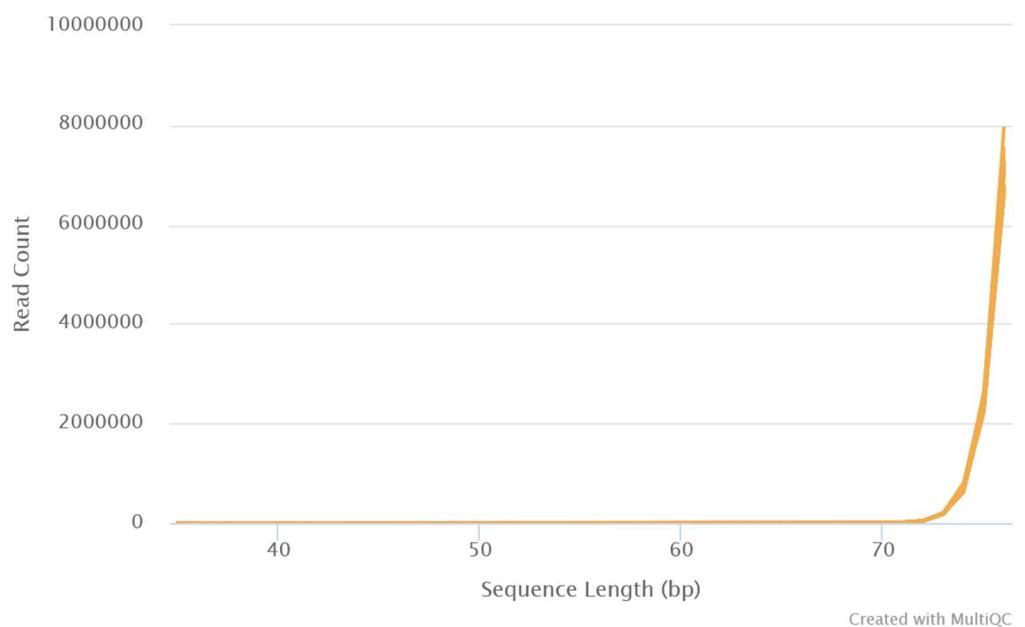


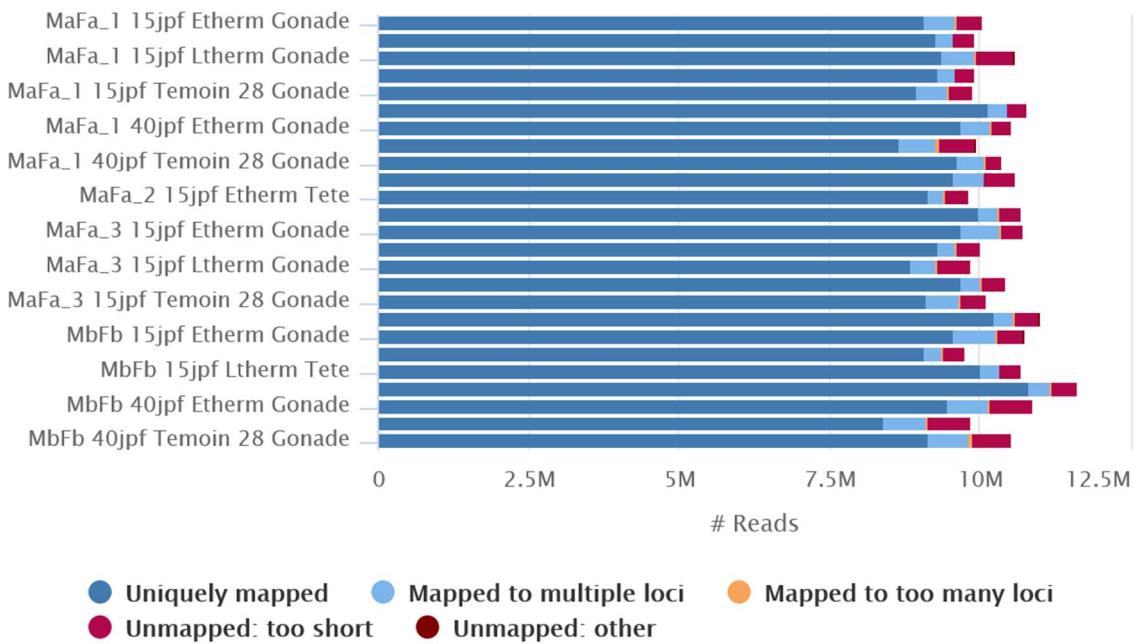
Figure S9 : distribution des longueurs des fragments séquencés établie par le multiQC. Ce graphique indique que la grande majorité des séquençages avaient une longueur de 75 pb, ce qui correspond à la longueur normale des séquençages Illumina.

Annexe 8

Tableau S7 : Pourcentage et nombre de séquences (en millions) ayant pu être alignées/étant complémentaires à une séquence du génome modèle du tilapia du Nil.

Sample Name	% Aligned	M Aligned
MaFa_1 15jpf Etherm Gonade	90.5%	9.1
MaFa_1 15jpf Etherm Tete	93.3%	9.3
MaFa_1 15jpf Ltherm Gonade	88.5%	9.4
MaFa_1 15jpf Ltherm Tete	93.9%	9.3
MaFa_1 15jpf Temoin 28 Gonade	90.7%	9.0
MaFa_1 15jpf Temoin 28 Tete	93.8%	10.1
MaFa_1 40jpf Etherm Gonade	92.0%	9.7
MaFa_1 40jpf Ltherm Gonade	87.2%	8.7
MaFa_1 40jpf Temoin 28 Gonade	92.7%	9.6
MaFa_2 15jpf Etherm Gonade	90.2%	9.6
MaFa_2 15jpf Etherm Tete	93.1%	9.1
MaFa_2 15jpf Ltherm Tete	93.5%	10.0
MaFa_3 15jpf Etherm Gonade	90.5%	9.7
MaFa_3 15jpf Etherm Tete	93.2%	9.3
MaFa_3 15jpf Ltherm Gonade	89.6%	8.8
MaFa_3 15jpf Ltherm Tete	93.0%	9.7
MaFa_3 15jpf Temoin 28 Gonade	89.9%	9.1
MaFa_3 15jpf Temoin 28 Tete	93.0%	10.2
MbFb 15jpf Etherm Gonade	88.9%	9.6
MbFb 15jpf Etherm Tete	93.1%	9.1
MbFb 15jpf Ltherm Tete	93.7%	10.0
MbFb 15jpf Temoin 28 Tete	93.3%	10.8
MbFb 40jpf Etherm Gonade	87.2%	9.5
MbFb 40jpf Ltherm Gonade	85.2%	8.4
MbFb 40jpf Temoin 28 Gonade	86.7%	9.1

STAR: Alignment Scores



Created with MultiQC

Figure S10 : Scores d'alignement des séquences avec le génome modèle du tilapia du Nil en fonction des échantillons. Les différences de nombres de séquences (Reads) mappées en fonction des échantillons est certainement due à la compétition entre les fragments de différentes tailles car les échantillons ont été poolés pour être séquencés. La plupart des séquences correspondait à un seul locus du génome (« Uniquely mapped »). Certaines correspondaient à plusieurs loci (« Mapped to multiple loci »), ce qui peut être dû à des gènes répétés. D'autres n'ont pas trouvé de locus correspondant par manque de bases complémentaires (« Unmapped : too short »).

Annexe 9

Tableau S8 : Données relatives aux échantillons d'ADN sélectionnés pour l'analyse au nanopore (ces échantillons sont issus d'une précédente étude au sein du même laboratoire). Notons que la taille des fragments d'ADN dans ces échantillons était supérieure à 10 kb.

Echant.	N	N sexés	% femelles	Concentration NANODROP	260/280	260/230*	Concentration PICOGREEN
A	35	69	100	928 ng/ul	1,82	2,34	789 ng/ul
B	35	30	27	338 ng/ul	1,81	2,39	125 ng/ul

* Après lavage à l'acétate d'ammonium

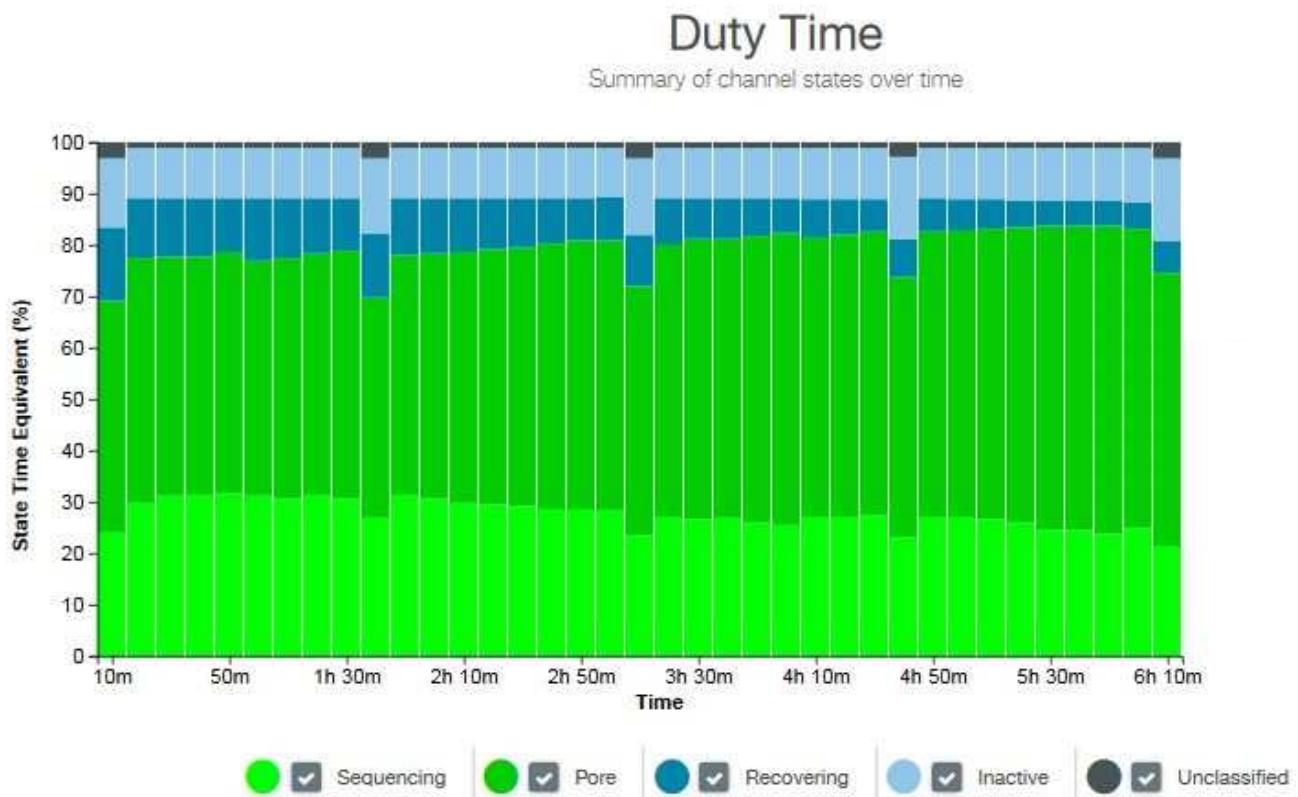


Figure S11 : Etat des pores en fonction du temps. Rend compte du pourcentage de pores en cours de séquençage (« Sequencing »), de pores actifs en attente d'un fragment d'ADN à séquencer (« Pore »), de Pores inactifs en récupération (« Recovering »), de pores inactifs non récupérables (« Inactive »), de pores inclassables dans l'une des catégories précédemment citées (« Unclassified »). Pour améliorer l'analyse, un enjeu futur serait d'optimiser le pourcentage de pores dans la catégorie « Sequencing », notamment en augmentant la taille des fragments.

Read Length Histogram

Summary read length distribution

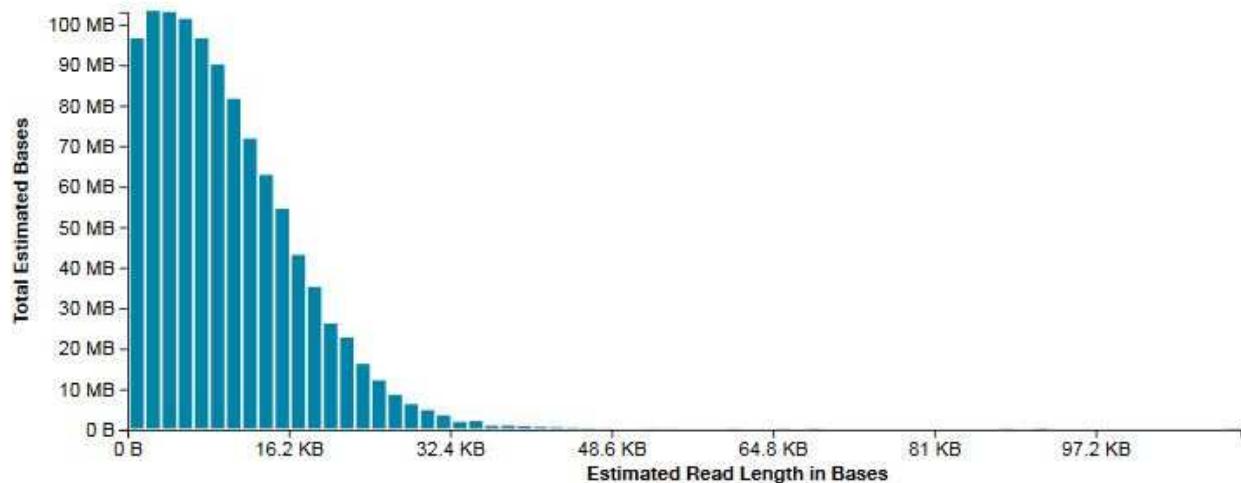


Figure S12 : Distribution des longueurs de fragments séquencés par la technologie du Nanopore (centrée aux alentours de 8kb). Pour améliorer l'analyse, un enjeu futur serait d'adapter les manipulations d'extraction de l'ADN en amont afin de limiter la fragmentation des brins.

Annexe 10

A. Protocole purification des ARN par précipitation au chlorure de Lithium :

- Redilution des échantillons avec de l'eau nuclease free (+ 80 µl pour les échantillons de gonades et + 70 µl pour les échantillons de têtes)
- Ajout de 33,3 µl d'une solution de chlorure de lithium (LiCl) nuclease free concentrée à 7,5M pour obtenir un concentration finale de 2,5M
- Homogénéinisation au vortex
- Incubation 30 minutes à -20°C
- Centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à vitesse maximal (> 13 000 rpm)
- Aspirer et jeter le surnageant
- Ajout de 250 µl d'éthanol 70% nuclease free pour nettoyer le culot d'ARN
- Incubation 2 minutes à RT
- Aspiration de l'éthanol. Attention, ne pas perdre le culot d'ARN
- Séchage à RT tubes ouverts
- Resuspension du culot dans 25 µl d'eau nuclease free
- Vérification des paramètres au nanodrop

B. Protocole Purification ADN acetate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) :

- Sortir les tubes d'ADN génomiques (Volume : 30 µl)
- Ajout de 15 µl d'une solution d'acétate d'ammonium nuclease free concentrée à 5M pour obtenir une concentration finale de 1,66M
- Homogénéinisation par 3 inversions du tube (attention jamais vortexer ADN génomique)
- Ajouter 2,5 volumes (135 µl) d'éthanol 100%
- Homogénéiniser par 3 inversions du tube
- Incubation 1 heure à -80°C
- Centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à vitesse maximal (> 13 000 rpm)
- Aspirer et jeter le surnageant
- Ajout de 250 µl d'éthanol 70% nuclease free pour nettoyer le culot d'ARN
- Incubation 2 minutes à RT
- Aspiration de l'éthanol. Attention, ne pas perdre le culot d'ARN
- Séchage à RT tubes ouverts
- Resuspension du culot dans 25 µl d'eau nuclease free
- Vérification des paramètres au nanodrop

C. Gel d'agarose migration ADN (intégrité + taille des fragments):

- Dans 100 ml de tampon Tris-acetate-EDTA (TAE buffer), ajouter 1 gr d'agar
- Chauffer jusqu'à ébullition
- Ajouter 100 µl d'agent intercalant (SYBR safe)
- Couler la solution dans un porte gel
- Laisser refroidir
- Démouler le gel et le placer dans une cuve d'électrophorèse propre et remplie de tampon TAE
- Déposer 5 µl d'échelle de poids moléculaire (smart ladder, eurogentec) dans les puits les plus extrêmes
- Déposer 8 µl d'échantillons d'ADN génomique dans les autres puits
- Appliquer un champs électrique de 80 V durant 1h30
- Révélation des bandes de migration au transilluminateur

D. Dosage de l'ADN avec le kit Quant-It picogreen (thermofisher):

- A partir des concentrations obtenues au nanodrop, diluer un aliquot à 500 pg/ μ l
- Diluer la solution stock de TE (tampon Tris-EDTA) 20x concentrée à une concentration 1X (1000 μ l TE 20x et 19 ml eau nuclease free)
- Préparer le réactif Quant-It PicoGreen concentré 200x dans du TE 1X (30 μ l de réactif dans 6970 μ l de TE 1x)
- Préparer la courbe standard d'ADN:
 - a. Diluer la solution d'ADN standard fourni par le kit concentrée à 100 μ g/ml à une concentration de 2 μ g/ml (20 μ l de solution standard concentrée dans 980 μ l de TE 1x)
 - b. Préparer une solution concentrée à 50 ng/ml de standard d'ADN en diluant 25 μ l de la solution (a.) dans 975 μ l de TE 1x
- Préparer dans une plaque 96 puits à fond noir les dilutions de solution d'ADN standard :

Quantité ADN	Prélèvement solution ADN standard (b.)	Ajout tampon TE 1x
5 ng	100 μ l	0 μ l
0,5 ng	10 μ l	90 μ l
0,05 ng	1 μ l	99 μ l
0,025 ng	0,5 μ l	99,5 μ l
0 ng	0 μ l	100 μ l

- Ajouter 1 μ l de chaque échantillon d'ADN à doser diluer dans 99 μ l de tampon TE 1x sur la plaque en dupliCAT
- Ajouter pour chaque puit, 100 μ l de réactif Quant-It PicoGreen 1x
- Lire la plaque au spectrophotomètre endéans les 5 minutes après ajout du réactif Quant-It PicoGreen

Etherm VS Ltherm +4x Signif

positive regulation of transcription from RNA polymerase II p
 one-carbon metabolic process
 cellular amino acid biosynthetic process
 alpha-amino acid biosynthetic process
organic acid metabolic process
 carboxylic acid metabolic process
 positive regulation of cellular metabolic process
 positive regulation of macromolecule metabolic process
 positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic proc
 positive regulation of macromolecule biosynthetic process
 positive regulation of RNA biosynthetic process
 positive regulation of transcription, DNA-templated
small molecule metabolic process
 sulfur compound biosynthetic process
 positive regulation of RNA metabolic process
 positive regulation of nucleic acid-templated transcription
 Positive regulation of gene expression
 positive regulation of biosynthetic process
 positive regulation of nitrogen compound metabolic process
 sulfur compound metabolic process
 positive regulation of metabolic process
 positive regulation of cellular process
organic metabolic process

Gonades 15jpf**Etherm* VS Ltherm +4x**

monosaccharide metabolic process
 one-carbon metabolic process
 glutamine family amino acid metabolic process
 organic cyclic compound catabolic process
 organonitrogen compound catabolic process
 cofactor metabolic process
cellular amino acid catabolic process
 hexose metabolic process
 organic catabolic process
 single-organism catabolic process
organic acid metabolic process
 organonitrogen compound metabolic process
 small molecule metabolic process
oxacid metabolic process
 carboxylic acid metabolic process
 single-organism biosynthetic process
 cellular amino acid metabolic process
 organophosphate metabolic process
phosphate-containing compound metabolic process
 coenzyme metabolic process
 heterocyclic catabolic process
 small molecule biosynthetic process
alpha-amino acid catabolic process
 organic acid catabolic process

Etherm VS Ltherm -4x Signif

regulation of response to stress
 positive regulation of immune system process
 regulation of immune response
 regulation of secretion by cell
 positive regulation of immune response
 sodium ion transport
 neuromast development
 protein modification process
 carbohydrate derivative biosynthetic process
 glycoprotein biosynthetic process
 macromolecule glycosylation
 protein glycosylation
 inflammatory response
 regulation of transport
 regulation of localization
 glycosylation peptide secretion
 glycoprotein metabolic process
 carbohydrate derivative metabolic process
 cellular protein modification process
 protein secretion lateral line sys
 activation of immune response lateral line devele
 regulation of defense response innate immune response
 regulation of secretion regulation of response to external stimulus
 regulation of response to external stimulus sensory system development

Etherm* VS Ltherm -4x

regulation of secretion
 regulation of defense response
 positive regulation of immune response
 sodium ion transport
 epithelial cell proliferation
carbohydrate derivative biosynthetic process
 glycoprotein metabolic process
 macromolecule glycosylation
 protein glycosylation
 regulation of immune response
 innate immune response
 neuromast development
 regulation of transport
tissue development
 epithelial cell differentiation
 regulation of localization
 glycosylation
glycoprotein biosynthetic process
 epithelium development
 peptide secretion
 columnar epithelial cell differentiation
 activation of immune response
 regulation of secretion by cell
 positive regulation of immune system process
 regulation of response to external stimulus

Figure S13 : Workclouds présentant de façon visuelle les fonctions biologiques les plus redondantes parmi les gènes répertoriés communément sur- ou sous-exprimés dans les gonades à 15 jpf des lots « Etherm » ou « Etherm* » et dans celles des lots « Ltherm ». « Etherm* » réfère au lot « Etherm » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique précoce.

!

Etherm VS Ltherm +4x Signif

immune system process
immune response

Gonades 40jpf

Etherm* VS Ltherm +4x

positive regulation of immune response
embryonic appendage morphogenesis
cellular amino acid biosynthetic process
columnar/cuboidal epithelial cell differentiation
regulation of extent of cell growth
response to xenobiotic stimulus
embryonic pectoral fin morphogenesis
negative regulation of cell motility
regulation of extent of cell growth
posterior lateral line neuromast development
humoral immune response
cell migration
vasoconstriction
regulation of proteolysis
regulation of anatomical structure size
regulation of localization
developmental growth
cell motility
regulation of cell size
negative regulation of locomotion
protein secretion
peptide secretion
negative regulation of cellular component movement
heme metabolic process
alpha-amino acid biosynthetic process
pectoral fin morphogenesis
regulation of axohogenesis
activation of immune response

Etherm VS Ltherm -4x Signif

Genes inconnus

Etherm* VS Ltherm -4x

Genes inconnus

Figure S14 : Workclouds présentant de façon visuelle les fonctions biologiques les plus redondantes parmi les gènes répertoriés communément sur- ou sous-exprimés dans les gonades à 40 jpf des lots « Etherm » ou « Etherm* » et dans celles des lots « Ltherm ». « Etherm* » réfère au lot « Etherm » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique précoce.

C

Etherm VS Ltherm +4x Signif

Tetes 15jpf

Etherm* VS Ltherm +4x

Genes inconnus

Genes inconnus

Etherm VS Ltherm -4x Signif

Etherm* VS Ltherm -4x

Genes inconnus

Genes inconnus

Figure S15 : Workclouds présentant de façon visuelle les fonctions biologiques les plus redondantes parmi les gènes répertoriés communément sur- ou sous-exprimés dans les têtes à 15 jpf des lots « Etherm » ou « Etherm* » et dans celles des lots « Ltherm ». « Etherm* » réfère au lot « Etherm » de la descendance MaFa_1 qui semblait répondre au traitement thermique précoce.

Annexe 12 A.

Tableau S9 : Comparaison des principaux gènes différemment exprimés (GDEs) dans les gonades à 40 jpf de l'ensemble des lots « Ethern », du lot « Ethern* » et de l'ensemble des lots « Ltherm ». Si un astérisque apparaît dans la colonne « padj » (« p value ajustée »), cela signifie que le gène est différemment exprimé de façon significative. La couleur du texte fait références à la couleur du sous-groupe du diagramme de Venn (**figure 27 F**) dans lequel le gène se trouve. La longueur des barres horizontales rouges et vertes symbolise l'importance de la sous-expression ou de la sur-expression du gène respectivement. Le signe « @ » est attribué aux gènes annotés dans les volcano plots (**figure 27 A, B**). NA = nombre de reads trop faible pour indiquer une valeur.

GeneName	Ethern		Ltherm		Ethern*
	log2 FC Ethern	padj Ethern	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
adcyap1a	1.3		8.93	*	0.21
nlgn3b	2.73		7.79	*	0.22
DNAH8 @	0.7		7.51	*	0.29
mf32	1.31		7.48	*	1.64
tbx1 @	0.48		7.46	*	0.98
wnt2ba	4.49		7.44	*	2.4
mybpc2a	2.73		7.34	*	3.23
nek12	1.88		7.34	*	1.38
apoda.2	2.25		7.26	*	0.74
lrrc18a	- 2.79		7.25	*	0.15
nkx6.3	5.86		7.22	*	5.52
plac8l1	2.73		7.19	*	2.23
tal1	- 1.18		7.18	*	1.76
lrrc18b	- 0.27		7.17	*	0.77
pyyb	- 1.12		7.03	*	1.81
si:ch211-186e20.2	4.73		7.01	*	0.22
ropn1l	1.69		7	*	0.81
six3a	0.29		6.94	*	0.22
hoxc4a	3.73		6.89	*	2.23
si:ch1073-184j22.1	- 1.13		6.89	*	1.63
c2cd4a	- 1.19		6.84	*	0.75
prozb	0.29		6.76	*	0.22
LRRC43	0.23		6.73	*	0.73
mkxa	3.73		6.72	*	0.22
epn3b	3.73		6.68	*	3.23
fam221a	- 1.08		6.67	*	0.58
clcn1b	0.29		6.65	*	2.23
kita	0.3		6.6	*	0.79
si:dkey-90a13.10	-		6.59	*	0.24
@	0.05				
cdkl5	0.29		6.51	*	0.22
rtn4rl2a	0.29		6.44	*	3.23
zgc:109949 @	- 0.69		6.42	*	0.03
efcab2	1.31		6.3	*	1.07
hcн2b	1.95		6.22	*	0.14
FOXQ1	5.05		6.19	*	3.23

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
drc3	1.23		6.19	*	1.73
F2R	-0.2		6.15	*	-3.14
atp2b3b	3.11		6.13	*	-3.61
klhl23	1.26		6.12	*	0.75
pih1d3	1.19		6.12	*	1.04
amn	2.26		6.05	*	3.56
cx30.3	0.11		6.04	*	-4.06
epor	3.15		6.02	*	1.59
nmrk2	0.59		5.97	*	1.4
mom5	1.73		5.94	*	0.23
spata18 @	0.27		5.93	*	0.53
fbxo36b	0.33		5.92	*	1.41
KCNJ15	0.29		5.92	*	4.11
aqp10b	1.21		5.92	*	1.73
SLC6A19	0.83		5.91	*	1.8
hand2	0.27		5.85	*	0.23
si:ch211-254p10.2	2.23		5.83	*	0.29
arl14	2.25		5.81	*	2.33
adrb3a	3.1		5.81	*	0.16
slc4a1a	0.35		5.79	*	0.01
rsph3	0.17		5.76	*	0.33
syt9a	1.2		5.76	*	1.71
chst6	1.32		5.74	*	1.62
ano8a	2.32		5.73	*	1.82
tekt1	1.05		5.7	*	0.44
apoa4a	2.61		5.67	*	1.37
hoxb7a	1.32		5.62	*	2.4
ttc16	1.37		5.62	*	0.71
ccdc114	1.54		5.58	*	0.31
g6pca.2	1.42		5.57	*	0.24
fam84a	1.29		5.54	*	0.79
si:ch73-139e5.4	0.99		5.54	*	1.87
cand2 @	0.68		5.52	*	0.37
MARCH9	2.24		5.51	*	3.32
gpc6b	0.71		5.49	*	0.21

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
alas2 @	-2.84		5.49	*	0.45
slc22a13b	1.2		5.48	*	3.02
cyp24a1	0.18		5.48	*	0.2
foxj1a	-2.44		5.48	*	1.45
hnf4a	2.18		5.45	*	1.68
vwa7	-0.44		5.45	*	0.14
tubb1	-2.54		5.45	*	0.88
USP50	0.39		5.43	*	2.56
slc20a1a	-0.71		5.43	*	0.31
slc43a2b	-1.44		5.43	*	1.31
abcb11a	0.82		5.42	*	0.31
lrrc73	0.61		5.42	*	0.95
erich3	1.97		5.41	*	0.88
dmrt3a	0.74		5.41	*	0.77
ccdc40	0.46		5.41	*	0.54
cacng8b	0.29		5.41	*	0.21
TTC29	-1.36		5.4	*	0.3
dhh	-1.96		5.4	*	0.7
PITPNM2	-4.31		5.4	*	0.79
mycbpap @	0.9		5.39	*	0.37
lrp11	0.37		5.39	*	0.33
efhc2	0.19		5.39	*	0.32
sptb	-1.45		5.39	*	0.14
ntrk2a	0.4		5.38	*	0.48
mbd3b	-0.24		5.36	*	0.25
ren	-1.2		5.33	*	5.54
kctd1	0.53		5.31	*	0.03
tyr	0.4		5.31	*	2.55
pnp5a	-1.88		5.28	*	1.2
enkur	0.06		5.27	*	0.58
glis3	-4.65		5.27	*	0.28
klf1	-4.54		5.25	*	1.02

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
cfap70	-0.51		5.24	*	0.17
ccdc105	0.86		5.23	*	0.06
efcab1	-0.33		5.22	*	1.34
slc26a6l	1.04		5.21	*	1.78
morn3	0.13		5.18	*	0.51
mdh1b	0.04		5.18	*	2.87
rgs11	0.84		5.17	*	0.33
pax8	-1.08		5.17	*	0.87
clcnk	-1.92		5.15	*	0.61
gp9	-2.7		5.15	*	0.76
ARHGEF25	1.39		5.11	*	1.47
si:ch211-197l9.5	-1.33		5.11	*	0.54
gata1a	-2.89		5.09	*	0.59
ttl9	0.37		5.08	*	0.29
bcan	0.17		5.07	*	1.54
zgc:153738	-0.65		5.07	*	0.05
ptger3	-5.51		5.07	*	0.75
serpind1	3.19		5.05	*	0.9
cers2b	-1.68		5.02	*	0.54
ltk	-0.96		5.01	*	1.53
synpo2b	-2.15		5	*	0.78
wdr95	-2.78		5	*	0.84
si:dkey-220f10.4	0.24		4.99	*	1.27
tnnt3a	0.67		4.98	*	2.25
efhc1	-5.04		4.98	*	0.36
cers3b	1.18		4.97	*	1.09
atcayb	4.48		4.97	*	-4.98
cahz	-0.73		4.96	*	0.75
star	-1.82		4.96	*	0.32
DCT	-0.11		4.95	*	0.88

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
irx7	-3.16		4.95	*	-0.22
mybpc2b	0.87		4.94	*	0.22
gsk3aa	0.95		4.93	*	0.58
zmp:0000000758	-0.13		4.91	*	0.53
slc5a1	-0.66		4.9	*	0.42
ca12	0.72		4.9	*	-0.64
slc48a1b	0.18		4.87	*	2.26
irx1a	0.83		4.87	*	1.26
kcnj16	-3.5		4.86	*	1.44
lpar3	0.04		4.85	*	0.6
TCTEX1D1	0.66		4.84	*	-0.91
slc12a1	2.83		4.83	*	0.95
rassf9	1.32		4.83	*	2.04
cldnc	0.77		4.82	*	2.01
si:ch211-103n10.5	-1.52		4.82	*	-0.51
igsf10	1.47		4.81	*	0.71
paplnb	2.14		4.78	*	-1.64
WDR27	-0.63		4.76	*	1.72
ccl25a @	9.65	*	4.75	*	0.22
abhd8b	-3.88		4.75	*	-0.95
HOXA7	1.29		4.74	*	0.78
TMEM184C	1.29		4.73	*	0.52
dna12b	0.4		4.73	*	-0.63
KLHL10	2.34		4.72	*	-0.04
ttc34	-0.33		4.72	*	0.75
tmprss2	1.15		4.71	*	1.06
rhag	-1.82		4.71	*	-0.21
APOH	3.03		4.7	*	1.07
klhl14	0.43		4.7	*	2.66
slc2a2	-1.96		4.7	*	0.12
ACTA1	0.73		4.69	*	-0.87
si:ch211-93g23.2	-1.94		4.69	*	0.88

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
zbtb7a	-0.26	*	4.68	*	0.46
slc16a4	0.92	*	4.68	*	0.16
nt5c2l1	-6.98	*	4.68	*	0.72
npy8br	1.29	*	4.66	*	1.78
lpin1	0.33	*	4.66	*	0.16
PDE3A	0.82	*	4.66	*	0.55
NTN4	0.5	*	4.65	*	0.31
slc22a4	1.35	*	4.65	*	0.37
kif25	1.75	*	4.63	*	1.56
ptprna	2.91	*	4.62	*	1.23
ca4a	0.43	*	4.62	*	0.66
nmt1b	0.77	*	4.61	*	1.28
capslb	1.96	*	4.6	*	1.86
pfkmb	0.67	*	4.59	*	1.16
zgc:91968	2.79	*	4.59	*	1.15
sptbn5	1.21	*	4.56	*	0.76
MYLPF	0.79	*	4.56	*	2.3
emx1	1.47	*	4.55	*	0.93
prkag3a	2.76	*	4.53	*	0.33
wdr66	0.3	*	4.53	*	0.35
NT5E	1.09	*	4.53	*	1.18
vwf	0.89	*	4.52	*	0.54
pi15a	0.38	*	4.52	*	1.02
iqub	0.77	*	4.52	*	0.99
zgc:92242	3.22	*	4.52	*	0.72
c1qtnf12	0.46	*	4.51	*	0.35
fibinb	0.9	*	4.51	*	0.18
npy	1.98	*	4.5	*	1.85
myl1	1.07	*	4.5	*	1.58
tspan35	2.87	*	4.5	*	1.5
arhgef38	3.14	*	4.49	*	0.03

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
esr2b	-0.66		4.49	*	0.6
IGFBP5	4.09		4.48	*	1.43
kdr1	5.39		4.48	*	0.94
lad1	2.96		4.47	*	0.76
cabp1a	1.66		4.47	*	0.84
aplnra	0.01		4.47	*	0.29
lrrc74b	0.19		4.47	*	0.04
mpz	0.74		4.47	*	0.07
slc45a2	0.78		4.47	*	0.72
tmem72	2.78		4.47	*	0.96
ANKRD34A	1.26		4.45	*	0.37
zmynd10	0.15		4.45	*	0.29
spag6	0.02		4.45	*	0.86
MPZL2	0.06		4.45	*	0.75
PALM2	0.26		4.45	*	0.76
LRRC56	0.16		4.44	*	1.64
gng2	0.66		4.43	*	1.48
zgc:92040	0.79		4.43	*	1.03
agtr1b	4.72		4.43	*	1.02
hsd11b1la	0.27		4.42	*	0.35
si:ch211-163l21.8	0.26		4.42	*	0.82
tns2b	1.99		4.41	*	0.48
LRRC9	0.2		4.41	*	0.7
tekt2	1.55		4.41	*	0.85
akr1a1a	4.69		4.41	*	0.95
fmn2b	2.04		4.4	*	0.21
satb2	1.92		4.4	*	0.14
nim1k	0.99		4.4	*	0.58
got1l1	1.4		4.39	*	0.69
KCNV1	3.02		4.39	*	-3.52
knstrn	0.86		3.58	*	0.08

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
eif2b3	0.86		3.58	*	0.21
FCHSD2	0.67		3.58	*	0.34
kazald3	0.25		3.58	*	0.07
pdx1	0.02		3.59	*	0.06
mrpl58	1.02		3.6	*	0.62
tcea2	0.34		3.6	*	0.34
gdpd2	0.22		3.6	*	0.29
nags	0.73		3.62	*	0.18
CRACR2A	0.51		3.62	*	0.3
ppp1r14bb	0.31		3.62	*	0.19
sprb	0.41		3.64	*	0.23
sytl4	0.4		3.65	*	0.02
hpse2	0.42		3.67	*	0.13
rgs9bp	0.52		3.68	*	0.62
CST7	1.13		3.7	*	0.17
gem	0.96		3.7	*	0.75
CPSF3	1.05		3.71	*	0.04
eepd1	0.62		3.72	*	0.07
tdp2b	0.05		3.74	*	0.23
NRXN2	0.69		3.76	*	0.22
RND2	0.1		3.76	*	0.45
cyp19a1a	0.77		3.77	*	0.39
YBX2	0.85		3.79	*	0.16
kcng1	1.43		3.8	*	0.84
prdm8	1.07		3.8	*	0.1
HABP4	0.24		3.8	*	0.33
cox4i2	0.69		3.81	*	0.02
dab1b	0.09		3.85	*	0.5

Aromatase

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
ch25hl3	-0.08	3.85	*	0.41	
dhrs3b	0.52	3.87	*	0.42	
CAMK2N1	0.61	3.89	*	0.3	
wee2	0.75	3.91	*	0.15	
PPIC	-0.35	3.91	*	0.01	
hsd17b1	0.12	3.92	*	0.71	
acsI2	0.19	3.93	*	0.31	
parpbp	-0.51	3.93	*	0.44	
cpeb1b	0.32	3.94	*	0.09	
lsm1	0.92	3.96	*	0.24	
si:ch73-89b15.3	0.37	3.96	*	0.6	
slc1a6	0.02	3.96	*	0.5	
tsr3	-0.15	3.97	*	0.44	
entpd2b	0.73	3.98	*	0.05	
trappc2l	0.67	-4	*	0.11	
zgc:85843	0.17	-4	*	0.56	
MTSS1	-0.19	-4	*	0.41	
zdhhc20a	0.67	4.01	*	0.01	
mgst3a	0.65	4.01	*	0.02	
grb7	-0.18	4.01	*	0.28	
lipg	0.26	4.06	*	0.11	
zgc:92287	1	4.07	*	0.49	
MFAP3	0.91	4.08	*	0.31	
eef2kmt	0.94	4.1	*	0.3	
trub1	0.31	4.1	*	0.12	
TTLL2	0.89	4.11	*	0.17	
ubtd1a	0.62	4.14	*	0.06	
gpr37l1b	-0.12	4.15	*	0.41	
fgf16	0.46	4.17	*	0.04	

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
six7	1.22		4.18	*	0.47
elavl4b	0.85		4.18	*	0.3
DHRS7B	0.72		4.18	*	0.14
ABHD5	0.73		4.19	*	0.36
scg2b	0.42		4.19	*	1.84
npy8ar	0.29		4.19	*	0.9
lama3	0.96		4.22	*	0.3
OTUB2	0.89		4.22	*	0
sh3d19	0.66		4.27	*	0.85
FAM19A1	0.05		4.28	*	0.12
mmab	1.23		4.31	*	0.38
STAC2	0.4		4.32	*	0.18
tuba8l2	0.03		4.33	*	0.48
trim46b	0.1		4.33	*	0.16
CCNA2	0.62		4.35	*	0.08
si:dkey-46i9.6	0.69		4.37	*	0.55
dmbx1b	0.32		4.39	*	0.23
otomp	0.13		4.4	*	0.34
cx44.2	0.83		4.42	*	0.34
gpat4	0.52		4.44	*	1.09
TMEM235	0.42		4.44	*	0.23
tspan7b	1.02		4.48	*	0.53
mos	0.28		4.48	*	0.38
si:ch211-81a5.1	1.29		4.49	*	0.47
RAB15	0.26		4.49	*	0.16
s100a1	1.01		4.5	*	0.17
org	0.57		4.5	*	0.02
btg4	0.83		4.51	*	0.21

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
gfer	0.83		- 4.51	*	- 0.09
ELAVL2	0.93		- 4.51	*	- 0.35
kctd14	0.76		- 4.52	*	- 0.36
slc24a4b	0.67		- 4.52	*	- 0.02
zgc:113276	0.95		- 4.53	*	- 0.75
synpr	- 1.19		- 4.53	*	- 0.08
magixb	- 0.63		- 4.56	*	- 0.81
zgc:162592	0.45		- 4.57	*	- 0.05
zgc:56699	0.99		- 4.63	*	- 0.16
lhfp13 @	1.45		- 4.71	*	- 0.18
ENO2	0.28		- 4.71	*	- 0
tbp12	0.79		- 4.73	*	- 0.05
rab11fip4a	0.56		- 4.74	*	- 0.12
ckmt2b	0.81		- 4.77	*	- 0.02
znf750	0.48		- 4.8	*	- 0.25
tfap2c	- 0.31		- 4.8	*	- 0.25
cx23	0.74		- 4.83	*	- 0.05
adsl	0.2		- 4.85	*	- 0.1
ntd5	- 0.05		- 4.85	*	- 0.14
ctsl.1	0.27		- 4.86	*	- 1.32
phf24	0.12		- 4.86	*	- 0.64
ltc4s	1		- 4.92	*	- 0.13
osbpl7	0.32		- 4.92	*	- 0.51
gyg2	0.83		- 4.94	*	- 0.04
nog3	0.31		- 4.94	*	- 0.16
opn7d	- 2.34		- 4.97	*	- 1.05
DEPDC7	0.66		- 4.98	*	- 0.12
MAST1	0.5		- 4.98	*	- 0.16

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
mpp3b	0.37		-4.98	*	0.1
si:ch211-156l18.8	0.59		-4.99	*	0.62
DLK1	0.75		-5	*	0.1
ccdc106b	0.48		-5.04	*	0.02
masp2	1.24		-5.05	*	0.83
pitx3	0.72		-5.05	*	0.14
fgf1a	0.93		-5.12	*	0.29
si:ch211-103b1.2	0.53		-5.15	*	0.13
vtnb	0.46		-5.16	*	0.17
galnt8b.1	-0.14		-5.19	*	0.71
zgc:112980	0.13		-5.2	*	0.27
foxl2	0.1		-5.2	*	0.59
zp3b	0.3		-5.22	*	0.4
zgc:109913	1.03		-5.25	*	0.29
nr2e3	-1.18		-5.26	*	0.1
clcn2a	0.91		-5.27	*	0.14
FUT4	0.44		-5.28	*	0.12
lsm14b	0.77		-5.3	*	0.11
arid3c	0.84		-5.32	*	0.09
si:cabz01007807.1	0.51		-5.32	*	0.24
cpne4b	0.74		-5.33	*	0.45
uck2a	0		-5.33	*	0.23
cyyr1	-0.45		-5.33	*	0.41
sfrp2l	0.24		-5.36	*	0.28
acer1	0.49		-5.49	*	0.22
cacng4b	0.98		-5.53	*	0.2
tmem30b	0.74		-5.55	*	0.12
caprin2	0.4		-5.55	*	0.04
wnt9b	0.4		-5.56	*	0.53

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
LACTBL1	1.16		5.57	*	0.11
cck	0.31		5.61	*	1.4
ttbk1b	1.09		5.63	*	0.83
rasd3	1.14		5.67	*	1.81
kdf1a	0.54		5.67	*	0.08
v2rx4	1.81		5.72	*	0.16
drd6b	0.24		5.72	*	0.16
lingo1b	0.3		5.73	*	0.87
zpld1b	1.06		5.74	*	0.59
rx3	0.87		5.75	*	0.44
asmt	0.62		5.75	*	0.1
pgpep1	0.72		5.85	*	0.09
CTXN1	0.22		5.87	*	0.31
polr3g	0.72		5.89	*	0.08
slc10a1	0.58		-5.9	*	0.2
ampd3a	0.07		-5.9	*	0.46
cx36.7	0.89		5.91	*	1.61
gdf9	0.17		5.94	*	0.37
si:dkey-197i20.6	0.25		5.95	*	0.1
kcnj1b	0.76		5.97	*	0.09
bmp15	0.37		5.97	*	0.03
cyp26a1	0.64		-6	*	0.05
zgc:163014	0.42		6.02	*	0.18
DMRTA1	0.77		6.03	*	0.35
gys2	0.67		6.05	*	0.18
cryaa	1.05		6.07	*	0.6
lhfp14a	0.94		6.18	*	0.21
plppr4b	0.56		6.18	*	0
and2	1.04		6.22	*	0.41

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
grip2a	0.31		6.24	*	0.03
sybu	0.13		6.25	*	0.18
tango6	1.07		6.37	*	0.04
kcnh1a	-0.44		6.38	*	0.64
slbp2	0.08		6.42	*	0.65
helt	0.71		6.48	*	1.23
ica1	1.11		6.53	*	0.06
paqr8	0.67		6.58	*	0.35
tmtopsb	0.44		6.58	*	0.14
her7	1.17		-6.6	*	0.3
si:ch211-190p8.2	0.91		-6.6	*	0.18
snx10a	0.8		6.67	*	0.17
ldha	0.25		6.69	*	0.18
si:ch73-244f7.3	-0.59		6.77	*	0.01
cpne7	0.77		6.79	*	0.11
her5	1.4		6.81	*	0.03
si:dkey-5g14.1	0.21		6.83	*	0.11
tbxta	0.85		6.86	*	0.02
pou5f3	0.84		6.87	*	0.02
ZNF718	0.21		-6.94	*	0.34
zgc:112437	0.77		-7	*	0.59
atoh1a	0.65		-7.01	*	0.7
gdf3	0.52		-7.01	*	0.21
adsl	0.34		-7.01	*	0.02
il12ba	0.66		-7.04	*	0.15
si:dkey-37o8.1 @	0.44		-7.06	*	0.25
nanos3	0.46		-7.15	*	0.32
olfc81	1.06		-7.17	*	1.2
kpna7	0.29		-7.24	*	0.15
lpar2a	0.68		-7.27	*	0.06
birc5b	0.2		-7.41	*	0.2
si:ch211-132b12.8	0.37		-7.56	*	0.06
zp3d.2	0.13		-7.84	*	0.41

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
fabp1a	0.67		-7.88	*	-0.12
si:dkey-208k4.2	0.74		-8.07	*	0
cldnd	0.7		-8.08	*	0.02
si:dkey-202g17.3	0.24		-8.4	*	0.27
zar1 @	0.71		-8.46	*	0.02
meis2b	0.2		-8.49	*	0.4
cth1	0.74		-8.53	*	0.08
map1lc3c	0.96		-8.66	*	0.65
si:dkeyp-50f7.2 @	0.25		-8.69	*	0.22
fndc5a	0.87		-8.79	*	0.44
C2CD4C	0.68		-8.94	*	0.38
fabp11b @	1		-8.98	*	0.1
si:ch211-14a17.7 @	0.64		-9.1	*	0.14
si:dkey-19b23.11	0.22		-9.13	*	0.34
acsI5 @	0.32		-9.21	*	0.24
zgc:66449	0.79		-9.39	*	0.3
si:ch211-14a17.6 @	0.82		-9.49	*	0.13
tmem144b	0.79		-10.11	*	0.03
aqp1a.2 @	1.21		-10.41	*	0.4
aldh3b2	-0.07		-11.11	*	0.28

Exprimés
dans
gonades
féminelles

Exprimé
dans
gonades
féminelles

Annexe 12 B.

Tableau S10 : Comparaison des principaux gènes différemment exprimés (GDEs) dans les gonades à 15 jpf de l'ensemble des lots « Etherm », du lot « Etherm* » et de l'ensemble des lots « Ltherm ». Si un astérisque apparaît dans la colonne « padj » (« p value ajustée »), cela signifie que le gène est différemment exprimé de façon significative. La couleur du texte fait référence à la couleur du sous-groupe du diagramme de Venn (**figure 27 F**) dans lequel le gène se trouve. La longueur des barres horizontales rouges et vertes symbolise l'importance de la sous-expression ou de la sur-expression du gène respectivement. Le signe « @ » est attribué aux gènes annotés dans les volcano plots (**figure 27 A, B**). NA = nombre de reads trop faible pour indiquer une valeur.

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
kcnj16 @	24.86	*	26.58	*	6.48
slc22a4 @	23.75	*	24.01	*	2.08
nkpd1 @	21.09	*	17.6	*	17.09
aqp8a.2 @	24.28	*	17.49	*	2.25
eps8l3a @	24.14	*	15.13	*	17.54
slc47a4	9.05		10.53	*	-15.24
mycbpap	6.1		9.11	*	0.15
slc5a2	6.19		9.05	*	1.17
ggt1b	7.65		8.84	*	0.75
SLC6A19	9.09	*	8.4		1.18
si:dkey-194e6.1	6.05		8.37	*	1.45
slc2a5	8.32	*	8.32	*	4.59
calcoco1b	5.62		8.23	*	0.15
rdh20 @	6.02		8.01	*	3.59
chrne	6.08		7.73	*	4.92
sult3st1	5.67		7.69	*	2.67
si:ch73-196l6.5 @	4.63		7.65	*	0.84
mb	5.38		7.46	*	2.61
ttc16	4.21		7.36	*	1.14
slc13a3	4.81		6.99	*	0.75
dhrs7	5.03		6.94	*	2.72
enkur @	3.14		6.61	*	1.16
cfap52 @	3.4		6.5	*	0.58
si:dkeyp-59c12.1	2.93		6.42	*	0.84
akr1a1a	3.18		6.33	*	3.37
drd2a	4.21		6.19	*	2.73
pih1d3 @	2.68		6.08	*	0.56
col10a1b	3.05		6.04	*	0.45
efcab1	3.4		5.92	*	0.45
ucp2	3.49		5.87	*	NA
dnah12	2.64		5.81	*	1.31
dnah11	2.54		5.72	*	0.98
lctla	1.31		5.62	*	2.29
si:dkeyp-46h3.1	2.65		5.58	*	2.47
gpd1b	2.88		5.32	*	1.32
xdh	4.23		5.31	*	3.32
ccdc146 @	1.92		5.31	*	0.04
mst1rb	3.44		5.26	*	0.18
spata18	2.48		5.26	*	1.14
ribc1	3.23		5.18	*	1.15
ncam3	2.28		5.18	*	2.97
zgc:174895	2.32		5.14	*	0.81
pck1	3.81		5.07	*	3.98
uroc1	3.34		5.04	*	4.12
zgc:136908	2.63		5.03	*	2.02

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
slc48a1b	3.04		5.02	*	0.32
duox	0.95		5.01	*	0.2
TEX9	2.61		4.94	*	NA
foxd1	2.38		4.75	*	0.18
upp2	2.9		4.61	*	2.4
zmp:0000000758	3.47		4.6	*	3.26
ppp1r42	1.13		4.6	*	0.55
gal3st1a	3.81		4.59	*	5.01
cyp26b1	1.63		4.59	*	1.88
rshp3	1.6		4.56	*	0.42
nrip2	1.86		4.55	*	0.5
efhc2	1.53		4.54	*	1.57
mapk15	3.72		4.49	*	1.48
aldh1l1	2.51		4.47	*	3.52
tekt2	1.79		4.47	*	0.26
ak9	1.68		4.45	*	0.15
atp6v0a2a	1.55		4.4	*	0.04
dnah1	1.42		4.39	*	0.28
chrm2b	9.77	*	4.32		3.59
hjv	2.54		4.3	*	2.6
klb	6.68	*	4.29		1.45
rbp7b	4.38	*	4.28	*	0.36
STEAP4	2.67		4.27	*	3.59
zgc:136858	2.54		4.27	*	3.35
dnah2	0.9		4.27	*	0.35
GPR149	1.07		4.26	*	0.17
mom3	1.91		4.24	*	1.47
dnai1.2	1.21		4.22	*	1.12
maats1	1.9		4.18	*	0.27
ihha	4.16		4.17	*	3.14
CLDN14	1.68		4.12	*	0.16
creb3l3a @	6.8	*	4.11	*	3.12
si:dkey-243k1.3	2.74	*	4.07	*	0.72
ttc25	1.51		4.05	*	0.6
si:ch73-222h13.1	2.04		4.04	*	1.16
crocc2	1.93		3.99	*	0.47
dnase1	1.56		3.99	*	0.47
si:dkey-24f15.2	4.71	*	3.91		2.73
bco2l	3.21		3.8	*	1.13
mat1a	2.78	*	3.79	*	3.04
adra2b	1.96		3.73	*	3.15
DNAH8	1.68		3.73	*	1.8

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
tbx1	-0.82		3.7	*	1.1
tekt4	0.6		3.59	*	0.19
hspb8	2.14		3.58	*	1.98
pllp	2.79		3.56	*	2.73
mvb12bb	5.09	*	3.55		3.18
cyp2n13	4.5	*	3.5		3.95
si:ch211-243g18.2	1.53		3.5	*	2.16
mpz	1.13		3.5	*	0.11
slc25a5	2.71	*	3.49	*	1.86
rrad	1.36		3.45	*	1.57
adssl1	2.6		3.41	*	1.07
zmynd12	1.04		3.41	*	0.25
MAMDC2	2.76		3.4	*	0.63
cel.2	2.39		3.4	*	0.6
terb2	1.15		3.4	*	0.6
ptger4a	1.76		3.39	*	1.16
tigara	2.68	*	3.38	*	2.56
abi3bpa	1.34		3.37	*	0.21
pfkfb3	1.4		3.36	*	0.26
foxa2	2.92	*	3.33	*	2.84
pou3f3b	1.47		3.33	*	0.06
a1cf	3.24	*	3.29	*	3.58
si:ch211-286f9.2	2.57		3.29	*	3.07
ccdc3b	1.26		3.26	*	0.11
stpg1	0.72		3.25	*	0.2
wdr78	1.22		3.23	*	0.08
duox2	0.49		3.23	*	0.16
klhl23	0.16		3.22	*	1.74
zgc:172182	0.56		3.21	*	0.96
phyhd1	1.92		3.19	*	3.54
si:ch211-112f3.4	-0.32		3.19	*	0.46
ugt8	1.68		3.17	*	0.73
arg1	1.13		3.15	*	2.07
slc16a6a	2.26		3.14	*	3.63
fam20a	1.89		3.14	*	2.45
tnmd	1.09		3.14	*	1.05
pdgfd	1.59		3.13	*	0.63
myo1hb	0.95		3.12	*	2.84
gnmt	1.77		3.11	*	1.86
rgs5b	1.59		3.11	*	0.76
gapdh	2.56		3.09	*	2.72

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
cnnap1	0.73		3.08	*	0.17
zgc:92275	2.48		3.07	*	2.67
clstn2	-0.25		3.07	*	0.89
myod1	1.42		3.06	*	0.4
cox4i2	1.49		3.05	*	0.26
map7d2a	0.85		3.05	*	0.84
pih1d2	0.71		3.05	*	0.36
hhip	1.91		3.02	*	2.21
slc52a3	5.27	*	3		3.44
ttc12	0.68		3	*	0.7
gsdf	0.53		2.99	*	0.7
gonadal somatic cell derived factor					
zgc:92287	0.08		2.98	*	4.61
tmed1a	3.82	*	2.97	*	2.76
vwa7	-0.85		2.97	*	1.03
si:ch211-119c20.2	0.47		2.96	*	0.2
ZNF608	1.3		2.94	*	0.96
slc41a1	1.63		2.92	*	2.52
exoc3l4	1.12		2.92	*	1.65
Irguk	0.16		2.92	*	0.22
slc25a10	1.12		2.91	*	2.29
dnah7	0.65		2.89	*	0.23
apoda.2	3.4	*	2.88	*	0.06
si:busm1-57f23.1	1.5		2.84	*	0.1
htra3a	0.31		2.83	*	0.16
prss59.2	2.35		2.81	*	0.36
atp7b	3.29	*	2.8	*	3.3
slc43a1b	2.63		2.8	*	3.48
zgc:109949	0.41		2.79	*	0.66
GPT	1.84		2.78	*	2.13
slc1a4	1.01		2.74	*	3.37
zgc:153426	0.71		2.73	*	0.1
prss1	2.65		2.72	*	0.27
ptch2	1.37		2.72	*	0.6
si:cabz01100188.1	0.11		2.7	*	0.79
wnt9a	1.11		2.69	*	0.51
gdf10b	0.83		2.69	*	0.53
haao	1.72		2.68	*	2.46
btd	5	*	2.65		1.39
tdh	1.26		2.64	*	1.65
suox	1.01		2.64	*	2.09
oit3	5.72	*	2.63		2.34
celsr3	1.29		2.63	*	1.92

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
sorbs2a	1.13		2.61	*	0.59
PTPRB	0.86		2.58	*	0.64
arsg	0.19		2.58	*	1.68
vtna	2.03		2.57	*	2.91
klf15	1.11		2.57	*	1.54
ppp1r3ca	1.4		2.56	*	1.92
smyhc1	-0.15		2.53	*	1.08
hnf1a	2.53	*	2.51	*	1.49
map3k10	0.72		2.51	*	1.33
slc16a4	0.55		2.51	*	2.37
ela2	2.25		2.5	*	0.42
pglyrp6	2.83	*	2.49	*	0.71
zgc:152863	1.16		2.47	*	0.56
col11a2	-0.03		2.47	*	0.84
cpb1	2.22		2.46	*	0.28
slco2a1	3.07	*	2.44	*	0.96
nr5a2	1.53		2.44	*	2.5
aox6	1.37		2.42	*	1.53
hao1	2.44	*	2.41	*	2.77
armc4	0.18		2.41	*	0.34
glyctk	1.59		2.39	*	2.29
ikzf4	3.43	*	2.38		2.37
zgc:136461	2.44	*	2.38	*	0.33
slc46a1	1.73		2.36	*	0.11
smpd1	1.79		2.35	*	2.4
WDR63	0.76		2.34	*	0.47
ehhadh	2.3	*	2.31	*	1.8
fam234b	2.82	*	2.3		2.35
gyg2	1.94		2.3	*	1.92
slc26a10	0.12		2.3	*	0.03
ugt5a1	3.6	*	2.29	*	1.97
zgc:55733	0		2.28	*	0.23
slc39a8	2.84	*	2.27	*	1.87
PBLD	1.68	*	2.27	*	2.06
slc25a25a	1.83		2.26	*	2.5
si:dkey-11m19.5	-0.19		2.26	*	0.98
ALDH6A1	1.55		2.25	*	2.54
si:dkey-91i10.3	3.51	*	2.24		2.58
dysf	1.31		2.24	*	1.85
sardh	1.04		2.23	*	2.26
CAPN6	0.78		2.22	*	2.21
agmo	1.07		2.21	*	0.21

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
sec14l1	2.71	*	2.2		1.31
epas1b	1.08		2.2	*	1.55
jarid2b	- 0.17		2.2	*	0.2
CDH4	- 0.37		2.19	*	0.25
hydin	0.35		2.18	*	0.21
ucp1	3.98	*	2.15		3.2
myo1ea	0.63		2.14	*	0.03
slc1a3a	1.45		2.13	*	1.27
GGT7	0.14		2.12	*	0.31
si:dkey-183n20.15	2.56	*	2.11		3.43
nppt	0.6		2.1	*	0.33
KLF15	1.03		2.09	*	1
dmrt1	- 0.62		2.09	*	0.44
serpinf1	1.32		2.08	*	2.45
mafba	0.48		2.08	*	0.07
cdkn1a	1.35		2.07	*	0.29
fgfrl1a	0.71		2.07	*	0.32
NT5E	0.32		2.07	*	0.05
met	0.15		2.07	*	1.03
sfrp5	0.57		2.05	*	0.57
si:dkey-121b10.7	0.64		2.03	*	0.69
prodha	0.5		2.03	*	2
pink1	1.05		2.02	*	0.64
gltpd2	3.12	*	2.01		3.69
DENND3	- 0.04		2.01	*	0.06
slc16a12a	3.18	*	1.99		1.12
slc47a1	4.34	*	1.97		1.96
nfe2l1a	2.42	*	1.96	*	0.43
MCOLN3	3.9	*	1.94		0.66
pparab	2.94	*	1.9		1.66
vmo1b	2.16	*	1.64		0.23
hephl1b	2.87	*	1.53		0.58
rdh8a	2.45	*	1.46		2.42
slc22a16	2.09	*	1.42		0.58
GRAMD2B	3.1	*	1.37		0.99
zgc:85843	4.04	*	1.23		3.3
pnpla2	4.42	*	1.21		0.56
ctsla	2.03	*	1.19		0.04
zgc:194887	3.23	*	1.11		2
scp2a	2.7	*	1.11		2.28
rdh1	2.04	*	1.07		1.84
sdr16c5a	2.41	*	1.06		1.84
ace2	8.66	*	1.04		0.12

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
acsf2	2.65	*	0.89		2.08
cgres1	4.2	*	0.85		0.13
slc37a2	2.48	*	0.74		0.44
rgs4	2.55	*	0.66		0.13
ABCA1	3.46	*	0.5		0.17
mogat2	7.48	*	0.44		0.1
mogat3b	3.86	*	0.39		1.97
pnpla3	2.02	*	0.39		0.16
apoa4a @	8.54	*	0.36		1.02
mpp1	2.38	*	0.36		0.01
chkb	2.01	*	0.34		0.48
si:dkey-31g6.6	5.7	*	0.23		0.44
ppdpfa	2.92	*	0.2		2.41
slc13a4	3.83	*	0.09		0.59
sec16b	2.54	*	0.24		0.97
evpla @	3.18	*	0.55		2.66
gatm	3.11	*	0.89		0.58
gpa33a	2.03	*	0.92		3.24
capn9	2.51	*	1.13		1.6
agr1 @	2.83	*	1.33		2.44
oclnb	3.14	*	1.49		7.55
grhl1	2.33	*	1.53		3.54
CLDN4	2.97	*	1.6		7.72
si:ch73-78o10.1	3.56	*	1.72		4.11
ST3GAL1	2.53	*	1.92		3.96
zgc:110333	3.08	*	1.96		5.31
igsf11	0.27		2	*	0.24
sh3bp4a	0.28		2.01	*	0.39
ism2b	0.29		2.04	*	0.52
grhl3 @	3.01	*	2.04	*	4.88
ankrd13b	0.31		2.06	*	0.7
olfm3a	0.39		2.09	*	0.32

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
kcnh6a	-0.84		2.09	*	0.32
psmb13a	0.45		2.1	*	0.62
icn	0.97		2.12	*	1.68
slc1a1	0.12		2.18	*	0.09
lingo1b	0.07		2.2	*	0.26
gstm.2	0.12		2.2	*	0.41
nxph3	0.56		2.21	*	0.05
bmp3	0.12		2.22	*	0.46
si:ch211-113j13.2	0.08		2.22	*	0.46
eif4h	0.01		2.24	*	0.13
dhrs13a.2	2.61	*	2.24	*	1.96
HCAR1	0.32		2.26	*	0.23
CNMD	0.11		2.28	*	0.11
STX19	0.26		2.3	*	0.26
c1qtnf4	0.28		2.3	*	0.12
si:ch211-183d21.3	0.29		2.31	*	0.07
treh	0.38		2.34	*	0.34
snap91	0.1		2.37	*	0.03
cldnf	4.04	*	2.42		NA
mnx2b	0.17		2.43	*	0.46
si:dkey-174m14.3	0.16		2.46	*	0.35
stc2a	0.35		2.49	*	0.05
sema3h	0.37		2.5	*	0.34
prg4b	0.18		2.51	*	0.12
oprm1	0.78		2.53	*	0.04
QRFPR	0.52		2.54	*	0.45
pacsin1a	0.28		2.55	*	0.22
gad1b	1.11		2.59	*	0.1

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	
cldnb @	-2.62	*	-2.62	*	3.61
greb1	0.28		2.67	*	0.41
iqsec3b	0.34		2.67	*	0.58
sema3ab	0.06		2.68	*	0.23
rtn4rl1b	0.35		2.69	*	0.23
cyp19a1a	0.19		2.73	*	0.37
slc38a3a	0.45		2.77	*	0.48
cacna1eb	0.33		2.82	*	0.46
slc34a2a	9.12	*	2.83		0.55
reep6	0.5		2.84	*	0.03
plch2b	0.26		2.84	*	0.29
nkl.4	0.03		2.92	*	1.72
si:dkey-183c6.8	0.19		2.93	*	0.83
mmp9 @	0.36		2.94	*	0.06
synpr	0		2.98	*	0.54
hhla2b.1 @	0.22		2.98	*	0.52
nptxra	0.09		2.99	*	0.08
scin @	2.88	*	3.02	*	2.4
kctd12b	0.35		3.04	*	0.46
si:dkey-222n6.2 @	3.27	*	3.04	*	3.14
mmp17b	1.75		3.08	*	1.32
cyp17a2 @	0.38		3.13	*	0.28
si:ch211-156l18.8	0.08		3.24	*	0.21
gpr37l1b	0.13		3.31	*	0.02
gluc @	3.19	*	3.31	*	3.61
cyp11a2 @	0.39		3.33	*	0.14
FSTL4 @	0.06		3.38	*	0.33
neto2b @	0.1		3.44	*	0.49

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
<i>ehf</i>	-2.17		3.45	*	4.76
<i>agr2</i>	0.92		3.57	*	2.7
GRIN2B	1.54		3.57	*	1.41
<i>ctsl.1</i> @	3.55	*	3.74	*	5.28
DPP10 @	0		3.82	*	0.16
<i>kcnh4a</i>	0.24		3.85	*	0.3
<i>dab1b</i>	0.01		4.02	*	0.1
NCAN @	0.26		4.03	*	0.59
<i>mrc1b</i>	1.09		4.34	*	0.27
<i>tkta</i>	0.89		6.96	*	3

Annexe 12 C.

Tableau S11 : Comparaison des principaux gènes différemment exprimés (GDEs) dans les têtes à 15 jpf de l'ensemble des lots « Etherm », du lot « Etherm* » et de l'ensemble des lots « Ltherm ». Si un astérisque apparaît dans la colonne « padj » (« p value ajustée »), cela signifie que le gène est différemment exprimé de façon significative. La couleur du texte fait références à la couleur du sous-groupe du diagramme de Venn (**figure 27 F**) dans lequel le gène se trouve. La longueur des barres horizontales rouges et vertes symbolise l'importance de la sous-expression ou de la sur-expression du gène respectivement. Le signe « @ » est attribué aux gènes annotés dans les volcano plots (**figure 27 A, B**). NA = nombre de reads trop faible pour indiquer une valeur.

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
si:ch211-5k11.8	-3.27		6.25 *		-3.53
HBE1	-3.37		6.01 *		-2.72
casr	NA		4.89 *		0.69
jarid2b @	0.11		3.42 *		0.27
nr1d1	NA		3.27 *		0.25
lrata	NA		3.06 *		0.78
zgc:171566 @	NA		2.87 *		0.23
slc34a2a	NA		2.81 *		1.11
akr1a1a	NA		2.54 *		0.97
smu1b	NA		2.41 *		0.58
rbp4l	0.9		2.37 *		0.5
serpinh1b @	0.07		2.37 *		0.01
MBTD1 @	NA		2.31 *		0.17
xkr9	NA		2.18 *		0.99
cbx7a	0.79		2.14 *		0.47
cdkn1a @	NA		2.1 *		0.39
si:ch211-199o1.2	NA		2.1 *		0.58
apodb	0.52		2.06 *		0.36
kdm6bb @	0.49		2.05 *		0.25
si:dkey-27c15.3 @	NA		2.03 *		0.04
mrc1b	NA		2.3 *		0.43
ela3l	NA		2.41 *		0.98
prss1	NA		2.45 *		1.66
insb	NA		2.48 *		0.8
diabloa	NA		2.75 *		0.33
tfa	NA		2.86 *		1.42
fabp1a	NA		2.96 *		1.96
spp2	NA		3.1 *		1.25
serpind1	NA		3.21 *		1.22
slc2a11a @	NA		3.36 *		0.68
prss59.2	NA		3.38 *		-2.62
RF00342	NA		3.56 *		0.41

GeneName	Etherm		Ltherm		Etherm*
	log2 FC Etherm	padj Etherm	log2 FC Ltherm	padj Ltherm	log2 FC Etherm*
si:ch211-186e20.2	NA		- 3.59	*	1.92
zgc:171592	NA		- 3.89	*	0.89
uox	NA		- 4.07	*	1.14
ambp	NA		- 4.15	*	1.26
fgg	NA		- 4.24	*	1.42
itih2	NA		- 4.39	*	1.22
acmsd	NA		- 4.4	*	1.04
serpinc1	NA		- 4.55	*	1.01
fabp2	NA		- 4.88	*	1.46
hpx @	-4.88		-5.18	*	
C19orf12 @	NA		-7.39	*	-2.69