

Etude de l'expression des gènes durant la différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)

Auteur : Dominique, Germaine

Promoteur(s) : Rougeot, Carole

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2018-2019

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/7272>

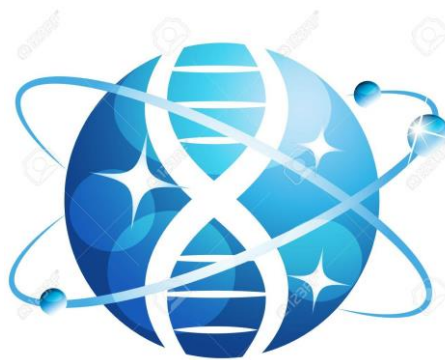
Avertissement à l'attention des usagers :

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.



**Etude de l'expression des gènes durant la
différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil
(*Oreochromis niloticus*)**



**TRAVAIL DE FIN D'ETUDE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER EN GESTION DES RESSOURCES AQUATIQUES ET AQUACULTURE**

Germaine DOMINIQUE

Promotrice : Dr Carole ROUGEOT

Encadrant : Mr Renaud NIVELLE

Année académique : 2018-2019



DEDICACE

A

Mes parents Marie Ena SAINTUMA et Gérard DOMINIQUE, ma grande sœur Rose Erchelle BARTHOLD et mon amour Jhonsley Eurica ROMAIN pour leur amour, leur soutien sans faille, leur confiance en moi et leurs encouragements dans la poursuite de mes ambitions.

Merci de tout cœur

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail de recherche a été possible grâce au support de plus d'un, en signe de gratitude, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

- ❖ DIEU TOUT PUISSANT qui m'a pourvu d'une intelligence et d'une santé robuste pour mettre à terme ce travail ;
- ❖ L'Académie de Recherche et d'Enseignement Scientifique (ARES) pour l'octroi de la bourse ;
- ❖ Pr Charles MELARD et Pr Patrick KESTEMONT promoteurs de la formation ;
- ❖ Dr Carole ROUGEOT ma promotrice, pour la direction de ce mémoire, pour m'avoir donné de nombreux conseils et des critiques bienveillantes pour la réalisation du mémoire ;
- ❖ Mr Renaud NIVELLE mon encadrant, pour m'avoir introduit à la recherche et aux méthodes de biologie moléculaire, pour avoir usé de son précieux temps et qui n'a pas ménagé ses efforts pour m'encadrer et me conseiller durant l'exécution de ce travail ;
- ❖ Mr Marc MULLER, pour l'accueil au sein du GIGA et ses précieux conseils ;
- ❖ Dr Vincent GENNOTTE pour les conseils divers ;
- ❖ Mr Christian PRIGNON pour les conseils zootechniques ;
- ❖ Dr Emmanis DORVAL, directeur de Dorval Initiative de Recherche Ecologique et Consultation (DIREC) et Dr Wilson CELESTIN, mon professeur à la Faculté d'Agronomie et de Médecine Vétérinaire de l'Université d'Etat d'Haïti (FAMV/UEH) pour leur support en vue de l'obtention de la bourse ;
- ❖ Mon collègue et collaborateur Pythagore Jean Fécu LAGUERRE, nous avons connu des moments de durs labeurs durant l'exécution de ce travail, tu m'as été d'un support inestimable ;
- ❖ Tous mes camarades de la promotion de Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture (GERAA) 2018-2019.

Résumé

Le tilapia du Nil est une espèce qui présente un déterminisme sexuel multifactoriel dont le génome de 920 Mb est séquencé et annoté. Son système chromosomique de détermination sexuelle à hétérogamétie femelle XX/XY peut être modulé par des facteurs environnementaux dont le principal est la température. L'influence des hautes températures au cours du développement et de la différenciation sexuelle conduit à des modifications du sexe phénotypique opposé au sexe génotypique. Cette espèce constitue en effet un parfait modèle pour l'étude des mécanismes de déterminisme du sexe chez des espèces à système GSD+TE. Dans notre étude, nous avons soumis des descendances XX et XY (1) à une haute température de 36,5°C et (2) à un inhibiteur de la protéine chaperonne HSP90 (BIIB021) pendant la période de différenciation sexuelle entre 10 et 30 jpf. L'objectif est de comprendre les interactions entre les gènes impliqués dans la différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil, l'influence de la température sur l'expression de ces gènes et le rôle éventuel de HSP90 dans la détermination et la différenciation sexuelle. Nous avons cherché à identifier et comparer les gènes de la voie mâle et de la voie femelle durant la phase de différenciation gonadique en observant les transcriptomes complets dans les gonades et dans les têtes à 15 et 40 jpf des progénitures XY par la méthode RNA-seq (séquençage d'ADN) et vérifié l'impact de l'inhibition de HSP90 sur les descendances de génotype XX ou XY à travers l'étude de l'expression des gènes de différenciation sexuelle (*dmrt1* et *foxl2*) et des gènes de HSP (*hsp90*, *hsp27* et *bag 3*) dans les gonades à 15 jours par la méthode de la RT-qPCR. Le traitement thermique (36,5°C) affecte le sexe-ratio des descendances XY par une féminisation de 14,5 % en moyenne à travers 2 sur 4 pour des familles traitées. Ces résultats sont supérieurs à ceux des études précédentes ayant obtenu 13 % de féminisation des descendances XY à haute température. Nous avons confirmé, par l'étude de l'expression des gènes de différenciation sexuelle (*cyp19a1* et *foxl2*), l'effet féminisant des hautes températures sur des individus à génotype XY longtemps démontré uniquement par le sex-ratio de ces descendances. Le traitement à l'inhibiteur entraîne la féminisation uniquement des descendances XX avec un taux d'inversion de -6,4% et confirme par l'étude de l'expression des gènes, les résultats d'études précédentes concluant une féminisation d'individus mâles XX spontanés due à l'inhibition de HSP90 sur le tilapia du Nil. D'une manière générale, cette étude confirme la complexité et la dépendance multifactorielle du déterminisme du sexe du tilapia du Nil.

Contenu

I. Introduction.....	1
I.1-Généralités	1
I.2- Déterminisme du sexe chez les téléostéens.....	1
I.2.1.- Les facteurs génétiques du déterminisme du sexe	2
I.2.2- Les facteurs externes.....	4
I.2.3- Déterminisme polyfactoriel du sexe	6
I.2.4-Mécanismes d'action des hautes températures sur la différenciation sexuelle.	7
I.2.5- Mécanisme régulateur du choc thermique	8
I.2.6- Les facteurs épigénétiques dans le déterminisme du sexe	9
I.3- Le modèle tilapia du Nil.....	9
I.4- Objectifs	10
II- Matériels et Méthode	11
II.1- Matériel biologique.....	11
II.2- Dispositif d'élevage	11
2.2- Choix des géniteurs.....	12
II.3- Ponte et reproduction.....	12
II.4- Conduite de l'élevage.....	12
II.5- Contrôle, échantillonnage et dissection.....	14
II.6- Prélèvement des gonades à 15 jpf pour analyse transcriptomique	14
II.7- Extraction ARN et ADN	15
II.8- Contrôle de qualité des ARNs totaux	15
II.9- RT-qPCR.	16
A- Transcription inverse	16
B- PCR quantitative (qPCR).....	16
II.10- RNA-Sequencing	16
A- Préparation des bibliothèques d'ARN.	16
B- Séquençage	17
II.11- Calcul du taux de survie.....	17
II.13- Sexage et taux d'inversion sexuelle	18
II.14- Analyse statistique	19

➤ Sexe ratio et survie	19
➤ RNA seq.....	19
➤ RT-qPCR.....	19
III- Résultats.....	21
III.1- Taux de survie	21
III.1.1- Taux de survie entre 0 et 9jpf	21
III.1.2- Taux de survie pendant et après les traitements (thermique et inhibition de HSP90).....	22
III.1.3- Cinétique de survie et de mort	22
III.2- Poids moyen à 30 et 50 jpf	23
III.3- Sex-ratio et taux d'inversion.....	24
III.4- Profil d'expression des gènes	26
III.4.1- Expression des gènes dans le traitement à l'inhibiteur de HSP90	26
III.4.2- Expression des gènes dans le traitement thermique	27
IV- Discussion.....	29
IV.1- Taux de survie et cinétique de mortalité	29
IV.2- Effet des traitements sur la croissance du tilapia du Nil.....	29
IV.2.1- Effet des hautes températures	29
IV.2.2- Effet de l'inhibiteur de HSP90.....	30
IV.3- Sex-ratio et facteur d'inversion	30
IV.3.1- Effet du traitement thermique sur le sexe-ratio.....	30
IV.3.2- Effet de l'inhibiteur de HSP90 sur le sexe-ratio	31
IV.4- Profils d'expression des gènes.....	32
IV.4.1- Expression des gènes dans le traitement à l'inhibiteur	32
IV.4.2- Expression des gènes dans le traitement thermique.....	33
V- Conclusions	34
VI- Perspectives	34

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Processus de détermination et de différenciation sexuelle en fonction du temps chez les poissons (modifié par Degrange, 2019)	1
Figure 2 : Facteurs impliqués dans le déterminisme et la différenciation du sexe et leur interaction chez les poissons. GSD : Déterminisme génétique du sexe ; ESD : Déterminisme environnemental du sexe (Mélard note de cours modifié de Santi, (2017)).	2
Figure 3 : Mode d'action des hormones stéroïdiennes : association des récepteurs à HSP90 (Despopoulos et Silbernagl., 2003).....	8
Figure 4 : Schéma du dispositif d'élevage Lth=Traitement thermique tardif (Température 36,5°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf T28=Témoin 28 (Température normal 28°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf BIIB021= Traitement à l'inhibiteur de HSP90 (BIIB021) appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf.....	11
Figure 5 : Sexe des poissons	18
Figure 6 : Taux de survie de l'éclosion à 9jpf de sept descendances de tilapia du Nil selon les génotypes (XX/XY).	21
Figure 7 : Comparaison des taux de survie des alevins de tilapia du Nil pendant le traitement et post traitement selon les conditions et les génotypes. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative.	22
Figure 8 : Cinétique de survie des alevins de tilapia du Nil dans les différents traitements selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. Les lignes en couleurs représentent les traitements : bleu Température normal 28°C (T28), rose =haute température 36,5°C (LTh) et maron= inhibiteur de HSP90 (BIIB021).	23
Figure 9 : Poids moyen à 30 et 50 jpf des juvéniles de tilapia du Nil selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative.	24
Figure 10 :Sex-ratio dans la descendance de tilapia du Nil en fonction du génotype sexuel XX/XY et du type de traitement. Poids moyen à 30 et 50 jpf des juvéniles de tilapia du Nil selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les barres représentent les % de femelles en mauve et le % de mâle en bleu.	25
Figure 11 : Taux d'inversion sexuel en fonction du génotype chez le tilapia du Nil selon le type de traitement (LTh : haute température 36,5°C et inhibiteur de HSP90 : BIIB021) entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative	26
Figure 12 : Expression des différents gènes dans les gonades à 15 jpf chez des individus de tilapia du Nil (2 génotypes différents) traités à un inhibiteur de HSP90 (70mg/kg) entre 10-30 jpf. BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu.	27

Figure 13 : Volcanoplot permettant de comparer l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle et le stress thermique, dans les des tissus de gonades et de têtes à 15 et 40 jpf chez le tilapia du Nil.28

Table 1 : Gènes déterminants majeurs et leur expression chez des espèces de poisson.....	3
Table 2 : Gènes déterminants mineurs et leur expression chez des espèces de poisson	4
Table 3 : Synthèse ADNc par le programme du thermocycler	16
Table 4 : Taux de survie entre 0 et 9jpf par lot et en fonction du génotype de 7 descendances de tilapia du Nil	21
Table 5 : Synthèse des résultats des études précédentes ayant soumis des juvéniles (XY et YY) de tilapia du Nil à haute température.....	31

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Description des familles des géniteurs utilisées pour produire les différentes descendance.	A
Annexe 2 : Identification des lots et devenir des descendance obtenues	A
Annexe 3 A et B : Courbe de variations saisonnières des températures de l'eau d'élevage par famille et selon le traitement	A
Annexe 4 : Paramètres physico-chimique de l'eau d'élevage des alevins de tilapia du Nil en aquarium de 50l.	G
Annexe 5 : Evolution du coefficient d'ajustement en fonction des jours post fécondation	G
Annexe 6: Valeur nutritives des aliments utilisés en fonction de l'âge des alevins.	G
Annexe 7: Protocole purification des ARN par précipitation au chlorure de Lithium.	G
Annexe 8 : Liste des gènes d'intérêt étudiés	H
Annexe 9 : Protocole de préparation de tube pour la synthèse d'ADNc à partir d'ARN	H
Annexe 10: Mix primers qPCR	H
Annexe 11: Mix cDNA qPCR	I
Annexe 12: Programme suivi par le thermocycleur pour la réalisation du RT-qPCR	I
Annexe 13: Stade de sexage des différentes descendance et nombre de poissons sexés par lot.	J
Annexe 14 : Pureté de l'ARN et sa qualité d'extraction pour la réalisation de la qPCR	K
Annexe 15 : Qualité des échantillons d'ARNm pour la réalisation du RNaseq	L
Annexe 16 : Volcanoplot permettant de comparer l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle et le stress thermique, dans les des tissus de gonades et de têtes à 15 et 40 jpf chez le tilapia du Nil (résultat étude réalisé par Nivelles Renaud).	M

LISTE DES SIGLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
CECI	Consortium des Equipements de Calcul Intensif
CEFRA	Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture
ESD	Environmental Sex Determination
TI	Taux d'inversion sexuelle
GDE	Gène Différentiellement Exprimé
GIGA	Groupement Interdisciplinaire de Genoproteomique Appliquée
GSD	Genetic Sex Determination
GSD + TE	Genetic Sex Determination + Temperature Effect
HSP	Heat Shock Protein
jpf	jour post-fécondation
jpt	Jour post traitement
lncARN	long non coding ARN
Ltherm	nom donné aux lots soumis au traitement thermique tardif
miARN	micro ARN
pH	potentiel Hydrogene
RIN	RNA Integrity Number
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
TSD	Temperature-dependent Sex Determination
UV	Ultra violet
T28	Température normal 28°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

I. Introduction

I.1-Généralités

La reproduction est un mécanisme physiologique permettant la perpétuation des espèces dans le temps. Il existe deux types de reproduction, la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. Chez les vertébrés, la reproduction sexuée est la plus commune (Otto et Lenormand., 2002). Elle fait intervenir l'implication des individus mâles et femelles qui vont générer des gamètes mâles et femelles qui vont fusionner en un zygote pour donner un nouvel individu. Cela permet un brassage de l'information génétique permettant une meilleure adaptation (fitness) de l'individu à l'environnement en fonction des modifications.

Lors de la reproduction sexuée, la fécondation et le développement embryonnaire fait intervenir respectivement le déterminisme du sexe et la différenciation sexuelle (fig.1). Selon Hayes (1998), le déterminisme du sexe est l'ensemble des mécanismes génétiques et/ou environnementaux qui régissent le processus de différenciation sexuelle. La différenciation sexuelle, quant à elle, désigne les processus génétiques et physiologiques du développement des gonades non encore différenciées en ovaires (gonades femelles) ou en testicules (gonades mâles) (Baroiller, 1998; Hake et O'Connor, 2008., Piferrer et al., 2012). Selon Piferrer (2001), l'interaction de ces deux mécanismes est indispensable pour le développement d'un sexe phénotypique (mâle et/ou femelle) correspondant au génotype. Chez les téléostéens gonochoriques, des facteurs physiologiques et environnementaux peuvent influencer la différenciation sexuelle et conduire en conséquence à des sexes phénotypiques différents du sexe génotypique. A cause de la diversité de leur mode de reproduction et du système de détermination du sexe pouvant être génétique ou environnemental ou mixte (Devlin et Nagahama., 2002), les poissons téléostéens gonochoriques présentent un grand intérêt en termes d'étude du déterminisme et la différenciation du sexe parmi les vertébrés.

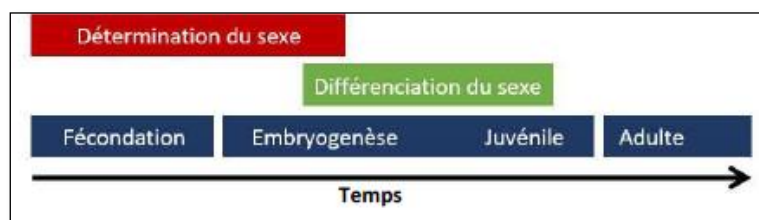


Figure 1 : Processus de détermination et de différenciation sexuelle en fonction du temps chez les poissons (modifié par Degrange, 2019)

I.2- Déterminisme du sexe chez les téléostéens

Chez les téléostéens, on distingue trois grands types de déterminisme du sexe : (1) le déterminisme du sexe lié à des facteurs internes ou génétiques ; (2) le déterminisme du sexe lié à des facteurs externes ou environnementaux et (3) le déterminisme polyfactoriel du sexe (fig.2).

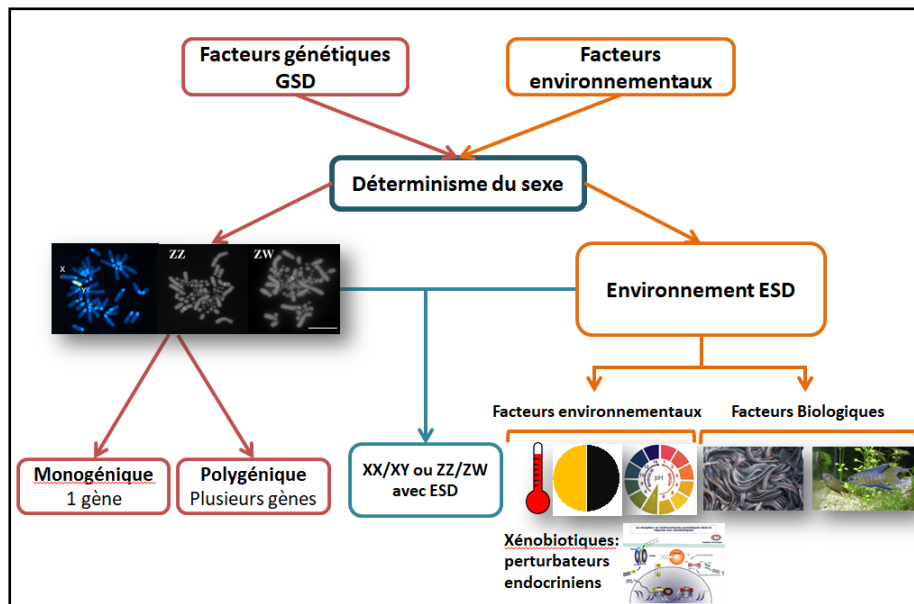


Figure 2 : Facteurs impliqués dans le déterminisme et la différenciation du sexe et leur interaction chez les poissons. GSD : Déterminisme génétique du sexe ; ESD : Déterminisme environnemental du sexe (Mélard note de cours modifié de Santi, (2017).

I.2.1.- Les facteurs génétiques du déterminisme du sexe

C'est chez le guppy (*Poecilia reticulata*) et le medaka (*Oryzias latipes*) que l'existence d'un déterminisme génétique du sexe (GSD) a été démontré pour la première fois en 1920 (Schmidt., 1919 ; Aida., 1921). Dans ce cas, le sexe (mâle ou femelle) est déterminé au moment de la fécondation par une série de gènes portés par des chromosomes sexuels dits déterminants majeurs du sexe. Ces gènes vont initier la différenciation des cellules gonadiques en ovaires ou testicules sans avoir été au préalable influencés par des facteurs environnementaux. Ce type de mécanisme est le plus souvent caractérisé par un système de chromosomes sexuels XX/XY (hétérogamétique mâle) comme chez les mammifères. C'est le cas de certains poissons comme le medaka (Yamamoto., 1954), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). Le système inverse, à savoir hétérogamétique femelle (ZW/ZZ) comme chez les oiseaux existe aussi. C'est le cas du tilapia doré (*Oreochromis aureus*) (Chourrout., 1998 ; Cnaani et al., 2008). Le déterminisme du sexe chez les poissons peut aussi impliquer totalement ou partiellement des gènes portés par des autosomes ou chromosomes non sexuels. On parle dans ce cas de déterminisme polygénique du sexe (Bull., 1985), comme cela semble être le cas chez le zebrafish de laboratoire (Liew et Orban., 2014 cité par Wilson et al., 2014).

I.2.1.1- Mécanisme génétique du déterminisme et de la différenciation du sexe

Le développement du sexe en testicule ou ovaire fait intervenir deux principaux groupes de gènes, les gènes déterminants majeurs ou gènes sex-déterminants et les gènes déterminants mineurs (Devlin et Nagahama., 2002; Mei et Gui., 2015). Les gènes majeurs sont portés par les chromosomes sexuels alors que les gènes déterminants mineurs sont portés par des autosomes ou chromosomes non sexuels. Selon Mei et Gui., (2015), les gènes majeurs sont exprimés dans la gonade indifférenciée et contrôlent directement la différenciation des gonades en testicule ou ovaire.

Gènes déterminants majeurs

Les principaux gènes majeurs identifiés chez les poissons regroupent :

- *Dmy* l'homologue de *Dmrt*, appelé aussi *DMRt1b(Y)*. Selon Nanda et al., (2002), ce gène s'exprime seulement chez les embryons mâles du medaka et son expression précède la différenciation gonadique. L'inhibition de ce gène entraîne une féminisation des individus mâles de medaka (Matsuda et Sakaizumi., 2016).
- *gsdfY*, le gène "gonadal soma derived growth factor on the chromosome Y" (Myosho et al., 2012). La présence d'un fragment génomique incluant ce gène dans le génome des individus XX suffit pour induire leur masculinisation.
- *Sox3* (*Sry box3*), localisé sur le chromosome X, ce gène stimule l'expression de *gsdf* et initiant le développement testiculaire (Takehana et al., 2014).
- *Amhy* (Y linked anti Müllerian hormone), code pour un facteur connu sous le nom de substance inhibitrice müllerienne qui est sécrétée par les cellules de Sertoli et inhibe le développement des canaux de Müller chez les embryons mâles.

Ces différents gènes sont typiques au système de détermination sexuelle mâle chez les individus de type XX/XY et sont présentés au tableau 1.

Table 1 : Gènes déterminants majeurs et leur expression chez des espèces de poisson.

Gènes	Expression	Espèces	Références
<i>Dmy</i>	Chromosome Y	Medaka <i>Oryzias curvinotus</i>	Matsuda et al., 2002; Matsuda et Sakaizumi, 2016; Nanda et al., 2002
<i>gsdfY</i>		<i>Orizyas luzonensis</i>	Crespo et al., 2013 ; Myosho et al., 2012
<i>Sox3</i>	Testicule	Poisson de riz indien (<i>Oryzias dancena</i>)	Takehana et al., 2014
<i>Amhy</i>	Testicule	silverside de Patagonie (<i>Odontesthes hatcheri</i>)	Hattori et al., 2012

Gènes déterminants mineurs

Les gènes déterminants mineurs ou gènes autosomiques, activés par les gènes déterminants majeurs en amont, vont induire en aval, la différenciation sexuelle. Ces gènes stimulent, entre autres la production d'hormones stéroïdiennes pour la formation des gonades mâles ou femelles selon le génotype (Heule et al., 2014; Nakamura., 2010).

Les principaux gènes autosomiques (tab.2) sont :

- *dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) qui appartient à la famille de gène présentant un DM-Domaine. Il a été isolé chez la truite arc en ciel et est impliqué en amont de la cascade de la différenciation testiculaire. Chez le tilapia du Nil, l'expression de *dmrt1* a été mis en évidence chez le mâle, un autre gène présentant un DM-Domaine (*DMO*) a été mis en évidence chez la femelle (Guan et al., 2000). Ces gènes présentent très peu d'homologie et représenteraient en effet un signal dans la cascade de

détermination sexuelle par le contrôle de l'expression de gènes spécifiques et de la différenciation sexuelle.

- *sox9* (SRY related high mobility group (HMG) box-9). Le produit de ce gène est considéré comme un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des testicules et régulé par le gène *Sry* (Westernet al., 1999).
- *SRY*, Sex determining region Y est un membre fondateur de la famille des gènes *sox*. C'est le gène déterminant mâle chez les mammifères. Chez les poissons, ce gène est isolé dans le génome de plusieurs espèces (Zhou et al., 2002). Toutefois il n'est pas spécifiquement lié au sexe mais pourrait être un facteur secondaire du contrôle de l'initiation de la voie de différenciation sexuelle.
- *foxl2* (Forkhead transcription factor-2) membre d'une famille de facteurs de transcription possédant un domaine "Forkhead" de liaison à l'ADN. Ce gène initie en amont le processus de différenciation ovarienne et son maintien après la phase de différenciation.
- *cyp19a1* (Cytochrom P450 family 19), ayant un rôle déterminant dans le déterminisme et différenciation des gonades chez la majorité des téléostéens. L'expression de ce gène est régulée par l'action combinée des gènes *sf-1* et *foxl2* (Guerrero-Estévez et al., 2010 ; Guiguen et al., 2010). Il existe deux copies du gène *cyp19a1* chez les poissons, hormis les anguilles, le *cyp19a1a* qui code pour l'aromatase gonadique et le *cyp19a1b* qui code pour l'aromatase cérébrale. L'aromatase stimule la synthèse de l'œstradiol à travers la transformation de la testostérone en œstradiol et de l'androsténédione en œstrone. Le 17 β -œstradiol étant l'œstrogène responsable de la différenciation sexuelle femelle, en cas d'inhibition ou d'une forte réduction de l'effet du gène de l'aromatase gonadique, la cetotestostérone va initier le processus de différenciation testiculaire. Il en résultera une réversion sexuelle des femelles génétiques en mâles phénotypiques (Guiguen et al., 2010).

Table 2 : Gènes déterminants mineurs et leur expression chez des espèces de poisson

Gènes	Expression	Espèces	Références
<i>dmrt1</i>		truite arc en ciel, zebrafish poisson chat africain (<i>clarias gariepinus</i>) et tilapia du Nil	Guo et al., 2005; Ijiri et al., 2008; Marchand et al., 2000; Webster et al., 2017
<i>Sox9</i>	Testicule	truite arc en ciel, zebrafish, medaka, tilapia du Nil, carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>), gupy et poisson chat africain	Guerrero-Estévez et Norma, 2010 ; Rhen et Schroeder, 2010
<i>foxl2</i>	Ovaire	truite arc en ciel, medaka et tilapia du Nil	Bertho et al., 2016 ; Guerrero-Estévez et Norma., 2010
<i>cyp19a1</i>	Gonade Cerveau	truite arc en ciel	Guiguen et al., 2010

1.2.2- Les facteurs externes

Divers facteurs de l'environnement dans lequel se trouve l'animal peuvent déterminer le sexe de l'individu ou influencer l'expression des gènes pendant la différenciation sexuelle, et conduire en conséquence à une différence entre le sexe génétique et le sexe physiologique ou

phénotypique. On parle dans ce cas de déterminisme environnemental du sexe (ESD), le sexe est déterminé après la fécondation en réponse à un signal environnemental (Piferrer et al., 2012). Les principaux facteurs environnementaux affectant le sexe sont : le pH, la teneur en oxygène, l'intensité de lumière, la densité de population, les comportements sociaux, les stéroïdes exogènes et la température.

I.2.2.1- pH et teneur en oxygène

Le pH peut agir seul ou en combinaison avec la température pour modifier le sex-ratio en faveur des mâles ou des femelles. Il a été démontré que les pH acides (6,2) masculinisent les populations du poisson porte épée (*Xiphophorus helleri*) alors que des descendances femelles sont obtenues à pH légèrement basique de 7,2 (Rubin, 1985). D'autres espèces ont montré des sex-ratios déséquilibrés vers les mâles avec le pH. C'est le cas de *Poecilia melanogaster*, *Apistogramma caetei* et *Pelvicachromis pulcher* (Romer et Beisenherz., 1996; Rubin., 1985).

La teneur en oxygène de l'eau pourrait aussi influencer le sexe-ratio du zebrafish (*Danio rerio*). Un traitement hypoxique induirait un sexe-ratio à prédominance mâle par rapport à un contrôle normoxique (Baroiller et al., 2009).

I.2.2.2- Intensité lumineuse

Les deux cas connus de déterminisme du sexe lié à la photopériode (PSD) chez les vertébrés ont été démontrés chez l'athérine (*Chirostoma estor*) et chez le californie grunion (*Leuresthes tenuis*). Chez *Chirostoma estor*, l'augmentation de la photopériode induirait une augmentation de la proportion de mâles (Corona-Herrera et al., 2018). A l'inverse, chez le californie grunion, une photopériode longue (15L : 9D) induit une déviation du sexe-ratio vers les femelles comparativement à une photopériode de 12L : 12D. Le même phénomène est observé en milieu naturel en début de saison de reproduction de cette espèce avec plus de femelles que de mâles. Brown et al. (2014) suppose que cela constitue une stratégie de reproduction de cette espèce.

I.2.2.3- Densité de population et comportements sociaux

L'effet de la densité de population et des comportements sociaux dans le déterminisme du sexe prêterent souvent à confusion et sont quelques fois interprétés comme similaires. Chez l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*), le confinement induit un sexe-ratio favorable aux mâles (Davey et Jellyman., 2005). Chez le *Macropodus opercularis* (Baroiller et D'Cotta., 2001), l'individualisation favorise la voie mâle (89% des individus) alors que la différenciation sexuelle femelle est augmentée jusqu'à 69% au fur et à mesure qu'on regroupe les individus. Baroiller et al., (2009) ont constaté qu'en sélectionnant le caractère dominant, la proportion de mâles chez les individus regroupés augmente et suppose en effet que le déterminisme du sexe de cette dernière espèce est influencé par les facteurs sociaux au lieu de la densité.

I.2.2.4- Stéroïdes exogènes

Les stéroïdes de synthèse sont d'autres facteurs non naturels pouvant modifier le sexe des individus. Les principaux stéroïdes exogènes connus sont : la 17 α -méthyltestostérone qui induit une masculinisation des individus et le 17 α -éthynylœstradiol qui les féminisent. Comme pour les autres facteurs externes, si administrés au cours de la période critique de

différenciation sexuelle (10 jpf à 30 jpf), les stéroïdes exogènes peuvent modifier le sexe phénotypique initial (Yamamoto., 1969). Chez le tilapia du Nil, une dose de 50 mg de 17 α -méthyltestostérone par kilogramme d'aliment consommé pendant 3 à 4 semaines masculinise les individus de génotype XX. De même, une dose de 2000 $\mu\text{g/l}$ de 17 α -éthynylœstradiol appliquée pendant 4 h au 1^{er} jpf sur des embryons de tilapia du Nil induit une forte expression des gènes de la voie femelle (*foxl2* et *cyp19a1*) chez environ 60% des individus de génotype XY indiquant une modification du sexe phénotypique au cours de l'embryogenèse (Gennotte et al., 2015).

I.2.2.5- Température

Le facteur environnemental le plus souvent mis en évidence et sans doute le plus important qui affecte la différenciation entre les sexes des populations chez les poissons est la température. L'une des plus importantes études sur la thermosensibilité du déterminisme du sexe (TSD) chez les poissons est celle menée chez la capucette d'Atlantique (*Menidia menidia*), une espèce à TSD strict. Chez ce petit athérinidé marin, les basses températures de juillet induisent d'abord la production de femelles physiologiques alors que des individus à phénotype mâles sont produits à hautes températures plus tard en septembre de façon à ce que les femelles puissent grandir plus vite et être prêtes pour se reproduire avec les mâles (Conover et Kynard, 1981). Depuis, plus de 60 espèces de poissons, appartenant à environ 9 ordres différents ont été identifiées comme étant thermodépendantes (Baroiller et al., 2009). Les espèces à TSD strict sont celles chez lesquelles : (1) il n'y a pas de chromosomes sexuels apparents ni de déterminisme génétique, (2) le sexe-ratio est modulé par l'action de la température et (3) dans la gamme de températures proches de celles rencontrées par l'espèce dans le milieu naturel pendant son développement embryonnaire (Valdivia., 2013). Cependant, la ligne de démarcation entre TSD et GSD n'est pas souvent claire (Baroiller et al., 2009). En effet, selon Devlin et Nagahama (2002), il existe chez certaines espèces un continuum entre GSD (déterminant génétiques majeurs, déterminants génétiques mineurs) et ESD (TSD le plus souvent). Dans ce cas, au moins l'une de ces trois conditions remplies par les espèces à TSD strict n'est pas respectée et le sexe de l'espèce évolue d'un mécanisme à l'autre en réponse à des variations/synergies environnementales et génétiques (Piferrer., 2001).

I.2.3- Déterminisme polyfactoriel du sexe

Le déterminisme polyfactoriel du sexe ou mixte fait intervenir à la fois les facteurs génétiques majeurs et/ou mineurs ainsi que les facteurs environnementaux. Les espèces ayant un déterminisme du sexe dit polyfactoriel sont dites à GSD+ESD. Par exemple, chez certaines espèces de poissons, le déterminisme génétique du sexe (GSD) peut dans certains cas être influencé par la température (TSD). En effet, lorsque les conditions environnementales sont normales, par exemple régime thermique optimum, les facteurs génétiques majeurs liés aux chromosomes XX/XY prennent le dessus, alors que des conditions environnementales spécifiques, basses ou hautes températures, peuvent être féminisantes ou masculinisantes selon les espèces. Chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), par exemple, les basses températures de 15°C masculinisent les populations (Blazquez., 1998; Pavlidis et al., 2000), au contraire, chez le poisson chat africain (*Clarias gariepinus*) ce sont les hautes températures de 36°C qui dévient le sex-ratio vers le phénotype masculin (Santi., 2017) et, chez les alevins

du poisson chat américain, les hautes températures qui ont un effet féminisant (Patino et al., 1996).

Baroiller et al. (1995) ont mis en évidence chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) pour la première fois un effet des hautes températures sur le sexe-ratio. Des températures élevées de 36,5°C appliquées pendant la période thermosensible à partir du 10^{ème} jpf jusqu'au 30^{ème} jpf induisent chez des individus XX la formation de gonades mâles fonctionnels (Baroiller et al., 1995). Les hautes températures pour être efficaces doivent être appliquées juste avant le début et jusqu'à la fin de la période critique de différenciation gonadique soit de 9 à 25 jpf (Baroiller et al., 1995; Ijiri et al., 2008). Cependant, malgré les forts taux de mortalité, Rougeot et al. (2008), ont observé une action des hautes températures plus tôt au cours du développement, directement après la fécondation (4 jpf). Ils suggèrent un effet sur le cerveau en développement et/ou les cellules germinales primordiales qui pourrait avoir comme effet de masculiniser les descendances 100% femelles jusqu'à 27%. Bezault et al., (2007) ont aussi observé que des populations sauvages peuvent présenter dans leur descendance une déviation du sex-ratio en faveur des femelles et supposent en effet qu'en absence d'autres facteurs tels les stéroïdes exogènes, cela pourrait être dû à leur thermosensibilité. Toutefois, les sex-ratios obtenus dans la masculinisation à hautes températures peuvent être très variables d'une descendance à l'autre. Certaines descendances sont thermosensibles et d'autres ne le sont pas (pas de déviation du sexe ratio). Le trait thermosensible est en effet un caractère héritable à la fois des deux parents et, est très variable d'une famille à l'autre. Certaines familles sont thermosensibles et d'autres ne le sont presque pas.

1.2.4-Mécanismes d'action des hautes températures sur la différenciation sexuelle.

Chez les poissons téléostéens, la différenciation en sexe femelle est sous le contrôle des œstrogènes en particulier de la 17 β -œstradiol et la différenciation mâle sous le contrôle de la 11 cetotestostérone. L'œstradiol est une hormone de la catégorie des œstrogènes synthétisée par l'enzyme P450 Aromatase à partir de la testostérone. L'œstradiol se lie aux récepteurs spécifiques, qui se lient à l'ADN pour induire une hausse de l'expression du gène de l'aromatase et d'autres gènes cibles. Les mécanismes par lesquels les hautes températures influencent la différenciation sexuelle sont jusque-là mal connus. Cependant, des études suggèrent que la température va avoir une action sur de nombreux gènes de la différenciation sexuelle, notamment: *cyp19a*, *foxl2*, *amh*, *dmrt1*, *sox9*. En effet, la température va entraîner une inhibition de l'expression du gène de l'aromatase (*cyp19a*), il en résultera une diminution de la production d'œstradiol. La quantité insuffisante d'œstradiol favorise la différenciation de la voie testiculaire sous l'action de la 11 cetotestostérone. En outre, la testostérone lorsqu'elle est en quantité suffisante, contrôle négativement l'expression des gènes régulateurs de l'aromatase et entraîne une forte expression des gènes déterminants mâles dont *amh*, *dmrt1*, *sox9* (Poonlaphdecha et al., 2013 ; D'Cotta et al., 2001).

Il fut mis en évidence que les mécanismes moléculaires associés au TSD ou GSD+TSD font intervenir des mécanismes régulateurs du choc thermique et des facteurs de types épigénétiques.

I.2.5- Mécanisme régulateur du choc thermique

Le stress chez les individus fait intervenir des mécanismes de protection de la fonction des molécules impliquées dans le métabolisme des cellules. Les HSPs (protéines du choc thermique) sont un groupe de protéines de réponse au stress en particulier au stress thermique. Elles ont pour rôle d'assurer le bon repliement des protéines pour empêcher leur dénaturation et de permettre la reconstitution des protéines dénaturées. Elles peuvent aussi se lier à des protéines anormales pour les éliminer et empêcher leur accumulation. Les HSPs sont classées en plusieurs familles selon leur masse molaire. On distingue en effet, les HSP25, HSP40, HSP70, HSP90 et HSP105. La famille HSP90 joue un rôle particulier parmi ces différentes familles d'HSPs à travers son rôle dans la maturation et la stabilisation des protéines cellulaires (Morimoto et al., 1997; Whitesell et al., 2003). Les HSPs90 vont s'associer aux récepteurs d'hormones stéroïdiennes pour former un complexe récepteur-HSP90 (fig. 3) qui est inactif (Pratt et Toft., 1997). Ce complexe permet de stabiliser le récepteur en empêchant sa dégradation et sa liaison à d'autres hormones non spécifiques. Même inactif, le complexe est capable en raison de son affinité pour les hormones stéroïdiennes, de se lier à celles-ci. Une fois le complexe lié à l'hormone spécifique, HSP90 se dissocie du récepteur qui va à son tour se transloquer vers le noyau, se lier aux gènes cibles et réguler leur expression (Li et al., 2014; Wirth et al., 2003).

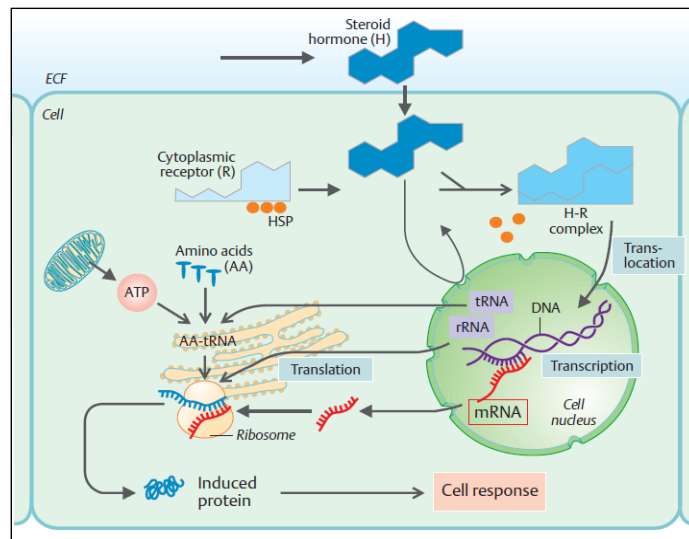


Figure 3 : Mode d'action des hormones stéroïdiennes : association des récepteurs à HSP90 (Despopoulos et Silbernagl., 2003).

Dans le cadre de l'inversion thermique du tilapia du Nil, il a été observé une hausse de l'expression du gène *hsp70* (Li et al., 2014) dont le rôle dans le déterminisme et la différenciation sexuelle est encore mal connu. Des études préalables au CEFRA chez le tilapia du Nil cherchaient à déterminer une possible implication de HSP90 dans le déterminisme et la différenciation sexuelle en utilisant 6 lots d'une descendance XX théorique issue d'une même famille dont un témoin (148 individus), un traité (149 individus) à haute température (36,5°C) et 4 autres lots (100 individus) traités avec des doses croissantes (0,5 ; 1 ; 70 et 140 mg/kg de poisson) d'un inhibiteur de HSP90 (BIIB021) durant la phase de différenciation gonadique (10 à 30 jpf). Ces études ont montré une surexpression des gènes de la famille d'HSP (*hsp27*,

hsp70 et *hsp90*) dans les lots traités à haute température par rapport au témoin, ainsi qu'une forte masculinisation comme attendue dans les lots traités. Cependant, aucun effet masculinisant n'a été mis en évidence entre les lots traités à l'inhibiteur de HSP90 et les lots témoins, il n'y a eu aucune différence significative de sex-ratio et aucun effet sur la survie. Toutefois, il y avait un taux de mâles assez élevé dans les contrôles, qui diminuait au fur et à mesure que la concentration de l'inhibiteur augmentait, ce qui laisse penser à un léger effet féminisant de l'inhibiteur.

I.2.6- Les facteurs épigénétiques dans le déterminisme du sexe

Selon la définition de Russo et al., (1996) citée par (Piferrer., 2013), l'épigénétique est l'étude des modifications héréditaires dans la fonction des gènes qui ne peuvent pas être expliquées par des changements dans la séquence d'ADN. Il s'agit d'un ensemble de mécanismes régulateurs agissant sous l'effet des facteurs environnementaux pour reconstruire la structure de la chromatine et entraîner des changements dans l'activité des gènes sans modifier leurs séquences. Le principal facteur environnemental à la base de ces modifications est la température. Les mécanismes de contrôle épigénétiques de l'expression des gènes comprennent, (1) la modification des histones et (2) l'action des ARNs non codants et (3) la méthylation de l'ADN (Brock et Fisher., 2005) qui est le plus courant et le plus étudié chez les eucaryotes.

Chez les juvéniles du bar européen, l'action des hautes températures pendant la période thermosensible induit une augmentation du taux de méthylation du gène de l'aromatase gonadique (*cyp19a1a*) qui diminue fortement l'expression de ce gène réduisant en conséquence la production d'œstradiol. Cela entraîne une masculinisation des individus génétiquement XX. Chez le tilapia du Nil, les mécanismes épigénétiques interviennent dans la masculinisation des femelles à hautes températures pour modifier le phénotype sexuel de l'individu (Navarro-Martín et al., 2011). En effet, Wang et al., (2017) ont constaté une méthylation de l'ADN promoteur du *cyp19a1a* deux fois plus importante chez les mâles que chez les femelles. Cette hyperméthylation entraîne la diminution voire l'inhibition de l'expression du gène *cyp19a1a* avec pour impact une réduction de la production d'œstrogènes et au final une masculinisation des femelles (Tachibana., 2016 ; Wang et al., 2017).

I.3- Le modèle tilapia du Nil

Le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), est une espèce largement étudiée qui présente un déterminisme multifactoriel (impliquant un système à homogamétie femelle XX/XY) et dont la détermination du sexe peut être influencée par des facteurs génétiques mineurs et environnementaux, en l'occurrence la température (GSD+TE). Il est connu que cette espèce possède un génome de 920 Mb qui a été séquencé et annoté. Même s'il existe beaucoup de documentation concernant les différents facteurs déterminants du sexe chez le tilapia, les connaissances concernant les mécanismes d'interactions, de synergies et de transmissibilité de ces facteurs sont encore très limitées. Le tilapia du Nil constitue en effet un modèle de recherche pour la description et la compréhension des interactions entre les cascades génétiques et physiologiques de la différenciation sexuelle et les liens avec les variations environnementales et pourrait être utile à la compréhension de ces mécanismes pour d'autres espèces proches.

I.4- Objectifs

L'objectif principal de notre étude est de mieux comprendre les interactions entre les gènes impliqués dans la différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil, l'influence de la température sur l'expression de ces gènes et le rôle éventuel de HSP90 dans la détermination et la différenciation sexuelle. L'étude vise spécifiquement à:

- (1) identifier et comparer les gènes de la voie mâle et de la voie femelle durant la phase de différenciation gonadique à 15 jpf et à 40 jpf en observant les transcriptomes complets dans les gonades et dans les têtes à 15 et 40 jpf des individus XX par la méthode d'identification de la différence d'expression des gènes dite RNA-seq (séquençage d'ADN). Ces résultats seront confrontés avec ceux obtenus précédemment pour les individus XX inversés et ceux pour lesquels un choc thermique a été appliqué.
- (2) vérifier le rôle potentiel des inhibiteurs d'HSPs: féminisation des descendance XY. Ces résultats seront comparés aux résultats préliminaires ayant montré une légère féminisation des individus XX de tilapia du Nil.
- (3) étudier au cours du traitement à l'inhibiteur de la protéine HSP90 par la méthode RT-qPCR l'expression des gènes *dmrt1* et *foxl2* avec pour gènes normalisateurs *gadph* et *ef1- α* afin de corroborer la réversion ou l'absence de réversion sexuelle sous l'effet de l'inhibiteur HSP90 ; et des gènes *hsp90*, *hsp27* et *bag 3* codant pour la famille HSP ou leur co-protéines (avec *gadph* et *ef1- α* comme gènes normalisateurs) afin de confirmer l'inhibition de HSP90.

II- Matériels et Méthode

II.1- Matériel biologique

L'espèce modèle de cette expérience est le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). Des souches d'origine Egyptienne domestiquées au Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (CEFRA) sont utilisées.

II.2- Dispositif d'élevage

J0	Reproduction	Croisement	$\text{♀ XX} * \text{♂ YY}$				$\text{♀ XX} * \text{♂ XX}$			
		Descendance	100 % XY (Théorique)				100% XX (Théorique)			
9 jpf	Conduite de l'expérience	Formation des lots et mise en charge	Circuit fermé	XY_1 T28	XY_2 T28	XY_3 T28	XY_4 T28	XY_5 T28	XY_6 T28	XY_7 T28
			Circuit ouvert	XY_1 LTh	XY_2 LTh	XY_3 LTh	XY_4 LTh	XY_5 LTh	XY_6 LTh	XY_7 LTh
				NA	XY_2 BIIB021	NA	XY_3 BIIB021	XY_4 BIIB021	NA	XY_5 BIIB021
10 jpf	Nourrissage et suivi physico-chimique	Début traitement thermique et inhibiteur de HSP90 (BIIB021)								
15jpf		Prélèvement, dissection (tête-tronc) et immersion dans RNAlater								
30 jpf		Arrêt traitement Lth et BIIB021, remontée graduelle à température 28 °C pour les LTh								
33 jpf		Transfert lots traités inhibiteur de HSP90 (BIIB021) en circuit fermé								
40 jpf		Prélèvement, dissection (tête-tronc), extraction gonades et immersion dans RNAlater								
70 à 90 jpf		Contrôle poids et taille individuel, sexage								

Figure 4 : Schéma du dispositif d'élevage

Lth=Traitement thermique tardif (Température 36,5°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

T28=Témoin 28 (Température normal 28°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

BIIB021= Traitement à l'inhibiteur de HSP90 (BIIB021) appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

2.2- Choix des géniteurs

Des femelles normales (femelles XX), issues de croisement femelle XX et mâle XX inversé à la méthyltestostérone ont été utilisées pour les reproductions. Deux catégories de mâles sont utilisés: les néomales XX issus de croisement femelle XX et mâle XX inversé par méthyltestostérone (70 mg méthyltestostérone/kg aliment entre 10 et 40 jpf) et des supermâles YY issus de croisement de femelle YY et de supermâle YY. Les informations concernant les géniteurs et leur famille sont présentées en Annexe 1.

II.3- Ponte et reproduction

Les géniteurs sélectionnés sont désinfectés avec de l'eau oxygénée avant d'être transférés dans des aquariums (250 l) cloisonnés en 2 pour recevoir dans chaque compartiment un géniteur. Ceux-ci sont nourris 3 à 5 fois/jour avec un aliment spécial pour géniteur Coppens (granulé commercial) avec 47% de protéines et 5% de lipides.

La reproduction se fait de façon artificielle. Les femelles sélectionnées sont observées tous les jours afin d'identifier les signes de ponte imminente: papilles génitales protubérantes, abdomen mou, femelles peu actives ne mangeant pas et grattant fréquemment le fond de l'aquarium (nidation). A ce moment, les femelles sont strippées pour vérifier la qualité et la maturité des ovocytes déterminées par le nombre et l'aspect (gros et sans présence de sang).

La femelle prête à pondre et le mâle sont ensuite anesthésiés chacun dans une solution d'eau et de benzocaïne à raison de 0,4 ml/l d'eau. Les familles d'appartenance des géniteurs sont identifiées par un lecteur de pit tag relié à un ordinateur pour éviter le croisement de géniteurs appartenant à une même famille et réduire le risque de consanguinité. Les ovules et le sperme sont ensuite récoltés par stripping à sec. La fécondation a eu lieu par mélange simultanée du sperme, de l'ovule et d'une certaine quantité d'eau d'écloserie pour activer les spermatozoïdes et les œufs. Le mélange est ensuite agité pendant 3 à 5 minutes puis rincé et traité contre les pathogènes avec une solution d'eau oxygénée à 400 ppm pendant 30 minutes. Les œufs fécondés sont finalement rincés et pris en photo pour le comptage à partir du logiciel imageJ puis mis à l'écloserie.

A l'écloserie, les œufs sont placés dans des bouteilles de Zoug à système recirculé avec filtre UV à une température constante de 28°C jusqu'à 9 jpf. L'eau venant par le bas de la bouteille simule les conditions du milieu naturel en termes d'oxygénation et de vitesse de courant d'eau. Les œufs sont vérifiés tous les jours et ceux n'ayant pas été fécondés sont éliminés pour éviter le risque de développement de pathologie.

II.4- Conduite de l'élevage

A partir de 9 jpf, pour chaque famille, les alevins sont comptés et séparés en plusieurs lots (2 ou 3) de même nombre soit 150 ou 200 poissons et mis dans des aquariums de 50 litres dans un système à circuit recirculé. Chaque lot est identifié par un code comme suit :

GénotypeDescendance_Numéroreproduction_Traitement reçu (Annexe 2).

- Le témoin (Témoin 28) est élevé de 10 jpf jusqu'au sexage (entre 70 à 90 jpf) à une température constante de 28°C.

- Le traité (Ltherm) est soumis à partir de 10 jpf à une augmentation graduelle de la température de l'eau de 28°C à 36.5°C à raison d'1°C toutes les heures. Cette température est maintenue pendant 20 jours soit de 10 jpf à 30 jpf puis la température est diminuée à raison d'1°C toutes les heures jusqu' à atteindre 28°C. Les poissons restent à cette température jusqu'au moment du sexage vers 70 à 90 jpf. La durée du traitement thermique et l'âge auquel il est appliqué est déterminé à partir des études de Baroiller et al. (1995) qui ont mis en évidence une augmentation significative de la proportion de mâle lorsque le traitement débute à 13 jpf, la température est proche de 36°C et qu'il dure au moins 10 jours. Les températures de l'eau sont mesurées dans chaque aquarium à l'aide d'une sonde, les courbes de variations journalières sont en annexe 3)
- Le lot traité [BIIB021 (70mg/kg de poisson)] (lorsque le nombre d'alevins le permet), est soumis de 10 jpf jusqu'à 30 jpf à un inhibiteur (BIIB021) de la protéine chaperonne HSP90 et élevé à une température de 28°C.

L'inhibiteur utilisé (BIIB021) est une molécule synthétique, biodégradable ayant un potentiel de traitement thérapeutique contre le cancer. Elle est photosensible et soluble dans l'éthanol. Cette molécule cible le site de liaison de l'ATP poche de HSP90 (Lundgren et al., 2009) et interfère avec celle-ci. Elle entraîne la dégradation et la déstabilisation des protéines qui dépendent de HSP90 (les protéines clientes) pour une activité appropriée et le repliement via la voie du protéasome (Schneider et al., 1996).

L'inhibiteur est administré aux poissons par voie alimentaire. La dose d'inhibiteur distribuée est de 70 mg/kg de poisson, cette valeur est choisie sur base d'une étude précédente sur le tilapia du Nil (Agirman., 2016). L'inhibiteur est dilué dans l'éthanol 100% puis ajouté à l'aliment, le mélange est ensuite étuvé jusqu'à faire sécher l'aliment et laisser partir l'éthanol. L'aliment est ensuite conservé au frigo à l'abri de la chaleur et de la lumière. Les lots soumis à l'inhibiteur sont élevés au cours de la période du traitement dans un système à circuit ouvert dans des aquariums de 50 litres. A l'arrêt du traitement, les poissons sont restés 3 jours dans ce circuit avant d'être transférés dans le système à circuit fermé là où sont élevés les autres lots. Cela permet l'élimination des résidus d'inhibiteur pouvant contaminer le circuit recirculé et influencer les résultats des autres lots. Les paramètres physico-chimiques de l'eau du circuit sont mesurés tous les jours, les valeurs moyennes sont présentées en annexe 4.

Les juvéniles des différents lots sont nourris selon la table de nourrissage générée par le CEFRA jusqu'à atteindre un poids de 1g plus ou moins soit jusqu'à 40 jpf d'après la courbe des expériences antérieures selon la formule :

$$\text{Aliment}(g) = Ni * \frac{Cf}{2750}$$

Avec Ni : Nombre d'individus ; Cf : coefficient d'ajustement de la ration par rapport à l'âge des alevins avant 40 jpf déterminé sur base de connaissances empiriques (annexe 5).

A partir de 40 jpf, le nourrissage est fait sur base d'une ration optimale d'après le poids moyen et la biomasse totale selon la formule :

$$Aliment(g) = \frac{R. optimal - P_{tot}}{100}$$

Avec : $R. optimal (\% P_{corporel} \cdot j^{-1}) = 9.291 - P_m^{-0.324}$

P_m : Poids moyen

P_{tot} : Biomasse

Dans les 2 cas, le calcul des rations est réajusté tous les 10 jours au cours de l'expérience, sur base de contrôles réguliers réalisés (Biomasse total et Nombre total).

Les caractéristiques nutritionnelles des aliments utilisés sont présentées en annexe 6.

II.5- Contrôle, échantillonnage et dissection

Un contrôle de survie (nombre total) et de biomasse totale est réalisé tous les dix jours pour chaque lot. L'échantillonnage est réalisé à 2 moments différents à 15 jpf et 40 jpf. A 15 jpf, les gonades peuvent être isolées sous binoculaire et, les lots « Ltherm » sont à ce moment en début de traitement thermique tardif, les analyses ultérieures à ce stade doivent donc mettre en évidence les premiers gènes différentiellement exprimés (GDEs) lors de ce traitement comparativement aux lots « Témoin ». Septante-cinq individus sont échantillonnés à 15 jpf pour chaque lot tandis qu'à 40 jpf 50 individus sont prélevés si le nombre restant le permet. Notons qu'à cause du faible taux de survie, les lots inhibiteurs ne sont pas sujets à au prélèvement à 40 jpf.

Les poissons prélevés sont euthanasiés dans une solution de benzocaïne en surdose (2ml/l d'eau), puis pesés. Pour les échantillons à 15 jpf, les têtes sont ensuite séparées des troncs et l'ensemble (tête-tronc) répartis par groupe de 20 dans des tubes Falcon remplis de RNAlater à dix fois le volume de poisson. Le RNAlater est une solution aqueuse stabilisante, très concentrée en sulfate d'ammonium, contenant de l'EDTA (agent chélatant) et du citrate de sodium servant de tampon. Le pH de cette solution est amené à 5,2 à l'aide du H₂SO₄. En pénétrant dans les cellules le RNAlater permet la préservation de l'ARN des tissus de la dégradation par précipitation des RNAses et des autres protéines solubles (Mutter et al., 2004). Les tubes sont ensuite stockés une nuit à 4°C pour faciliter la pénétration des tissus par le RNAlater et sont conservés à -20°C jusqu'au prélèvement des gonades. Pour ceux à 40 jpf, les gonades sont d'abord prélevées, placées dans des tubes Eppendorf de 2 ml, les têtes et troncs sont mis dans des tubes de Falcons. Les tubes sont conservés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C.

II.6- Prélèvement des gonades à 15 jpf pour analyse transcriptomique

Les gonades sont les principaux organes de reproduction sexuée, choisis comme tissus de référence pour l'étude de l'expression des gènes à cause de la divergence de la voie de différenciation entre les gonades mâles et femelles. Les échantillons fixés préalablement dans du RNAlater sont sortis de la chambre froide à -20°C et mis sur glace. Les troncs sont placés sur une plaque de cire dans du RNAlater et disséqués sous binoculaire. Une ouverture ventrale sur la longueur puis le flanc permet d'écarter les viscères et libérer les gonades du coté dorsal du poisson. Le prélèvement des gonades se fait à l'aide d'une micropince de dissection en évitant de contaminer le prélèvement avec des résidus d'autres de tissus. Les gonades prélevées sont déposées immédiatement dans un tube Eppendorf de 2 ml et les troncs

dans un tube Falcon, les deux sont plongés dans l'azote liquide (-200°C). Les échantillons de têtes congelés sont additionnés de 10 ml d'eau bidistillées puis broyés à l'aide d'un turax de type KINEMATICA qui permet à la fois de broyer et d'homogénéiser l'échantillon. Les échantillons de têtes et gonades sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN et de l'ADN.

II.7- Extraction ARN et ADN

L'extraction des ARN et ADN est réalisée sur des colonnes de silice avec les kits «All prep DNA/RNA» de QIAGEN®. Les principales étapes de l'extraction à partir de ces kits comprennent :

- 1) la lyse cellulaire des têtes et gonades) à l'aide un tampon de lyse composé de thiocyanate de guanidine et de β -mercaptoethanol
- 2) l'isolation de l'ADN génomique sur une colonne d'affinité à l'ADN génomique
- 3) la purification des ARNs totaux selon le protocole «All prep DNA/RNA» de QIAGEN®
- 4) la purification de l'ADN génomique par rinçage 2 fois de suite à l'aide de solution tampon AW1 et AW2 puis élution par centrifugation dans un tampon d'élution préchauffé à 70°C
- 5) le contrôle de la qualité des échantillons d'ARN et D'ADN au NanoDrop sur base des absorbances des acides nucléiques et d'éventuels contaminants.

La qualité des échantillons d'ARN et d'ADN est vérifiée d'une part par le ratio A260/A280 (Acides nucléiques/Protéines). Un échantillon d'ADN pur doit avoir un ratio proche de 1,80 tandis que pour l'ARN, le ratio doit être proche de 2,00. Un ratio plus faible que ces valeurs de référence pour les échantillons d'ARN et d'ADN met en évidence une contamination de ceux-ci par des protéines. D'autre part, la contamination des échantillons par des composés organiques est déterminée par le rapport A260/A230 (Acides nucléiques/Solvants). Un échantillon avec un rapport de 1,80 à 2,20 est considéré comme de bonne qualité. En dessous de ces valeurs de référence, l'échantillon comporte une quantité significative de contaminant tel que des sels d'extraction, de l'éthanol et des protéines. Une purification supplémentaire est réalisée pour les échantillons dont le rapport A260/A230 n'atteint pas la valeur de référence. Les échantillons d'ARN totaux sont précipités au chlorure de Lithium (LiCl) (protocole en annexe 7) puis rincés à l'éthanol 70%. L'ARN précipité est remis en suspension dans 25 μ l d'eau RNAses free.

II.8- Contrôle de qualité des ARNs totaux

L'intégrité des échantillons d'ARNs est analysée au bioanalyzer par la plateforme génomique du GIGA. Le bioanalyzer permet l'analyse quantitative et qualitative des acides nucléiques par électrophorèse capillaire selon leur taille (temps de migration). Celui-ci fournit un facteur d'intégrité ou RIN score (RNA integrity number) allant de 0 à 10 qui doit être supérieur à en théorie 7 pour assurer une qualité suffisante des ARNs totaux et pouvoir réaliser le RNA-seq. le RIN score est basé en partie sur le rapport entre la quantité d'ARN ribosomique 28S sur 18S qui doit être en théorie proche de 2).

II.9- RT-qPCR.

La RT-qPCR est réalisé pour l'analyse de l'expression des gènes de différenciation sexuelle (*dmrt1* et *foxl2*) et de HSP (*hsp90*, *hsp27* et *bag3*) dans les gonades à 15 jpf à partir des échantillons d'ARNs totaux.

A- Transcription inverse

La retrotranscription est réalisée à l'aide d'une enzyme la transcriptase inverse, l'iScript Reverse Transcriptase mélangée avec des inhibiteurs de RNAses et qui contient un mélange d'oligo (dt) de courtes amorces nécessaires à la rétrotranscription. Un contrôle négatif dans lequel on évite d'ajouter la Reverse Transcriptase est réalisé (annexe 8). Les tubes sont ensuite incubés dans un thermocycler en procédant comme sur le tableau 3.

Table 3 : Synthèse ADNc par le programme du thermocycler

Priming/Amorçage	5 min à 25°C
Reverse transcription	20min à 46°C
Inactivation de la retrotranscription	1 min à 95°C
Conservation	Maintenir à - 4°C

Les tubes contenant de l'ADN sont conservés à -20°C jusqu'à la qPCR.

B- PCR quantitative (qPCR).

Deux mix différents sont utilisés pour réaliser la qPCR (annexe 9 et 10). La quantité de réactif est calculée de façon à pouvoir mettre 2,68 ng d'ADNc par puits sur la plaque.

Le FastStart Universal SYBR Green Master contient à la fois les nucléotides (dNTP), du SYBR Green capable d'émettre une fluorescence au contact du double brin de l'ADN, la taq-polymérase (hot start polymerase) qui n'est active qu'à une température minimum de 75°C.

Sur des plaques de 384 puits, les échantillons sont disposés en triplicats colonne pour chacun des gènes d'intérêt (annexe 11) tandis que les amorces sont placées en ligne. Après être scellée d'un film plastique, la plaque est amenée au thermocycleur pour la réalisation de la PCR en temps réel. Le programme suivi par le thermocycleur est présenté en annexe 12.

II.10- RNA-Sequencing

Le RNA-seq est une méthode de séquençage du transcriptome de seconde génération qui génère un très grand nombre de séquence simultanément. Selon (Wang et al., 2009), cette méthode permet à la fois de quantifier l'expression des gènes et identifier des nouveaux transcripts.

A- Préparation des bibliothèques d'ARN.

Les étapes préparatoires des bibliothèques d'ARN sont réalisées à l'aide du kit Illumina® TruSeq Stranded mRNA et sont décrites comme suit :

- 1) isolement des ARNm à l'aide des 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) fragmentation des ARNm poly-A durant la deuxième élution et hybridation des hexamères aléatoires (oligonucléotides) servant d'amorce à la synthèse d'ADNc.

- 3) retranscription des fragments d'ARN grâce à une reverse transcriptase. Cela constitue la synthèse du premier brin d'ADNc.
- 4) séparation des ARNs ayant servi de modèles au premier brin et synthèse d'un second brin d'ADN incorporant des nucléotides 'U' à la place des nucléotides 'T'. L'incorporation de 'U' « éteint » le second brin pendant l'amplification (étape 7).
- 5) ajout d'un nucléotide 'A' aux extrémités 3' des fragments les empêchant de s'unir entre eux au moment de la ligation des adaptateurs.
- 6) liaison des adaptateurs aux extrémités des doubles brins d'ADN, les préparant ainsi pour leur hybridation sur la « flowcell » du séquenceur Illumina. L'incorporation d'un index spécifique à chaque échantillon permet d'identifier l'origine des fragments.
- 7) amplification de la librairie par PCR (15 cycles) de manière à augmenter la quantité de matériel et diminuer de façon exponentielle la présence du deuxième brin marqué par des 'U' à la place des 'T' au niveau de l'étape 4. La polymérase permet d'avoir à la fin une librairie brin spécifique qui facilite en aval les analyses bio-informatiques.
- 8) enrichissement des fragments d'ADNc ayant des molécules d'adaptateurs aux deux extrémités par PCR sur la « flowcell » et formation des clusters (groupes de fragments identiques).

B- Séquençage

La PCR forme des clusters dont chacun est séquencé base par base à l'aide de nucléotides marqués. Un nucléotide marqué est ajouté à chaque fois par une polymérase à l'extrémité 3' du nouveau brin et est excité par un rayon laser et en conséquence émet un spectre de fluorescence spécifique l'identifiant comme 'A', 'T', 'C' ou 'G'. Cette méthode permet le séquençage de l'ADNc issu des ARNm d'intérêt ainsi que des indexes servant à identifier l'origine des fragments.

II.11- Calcul du taux de survie

Le taux de survie est évalué à 3 moments : entre 0 et 9 jpf (TS9), entre 10 et 30 jpf (TS30) correspondant à la période de traitement et de sensibilité de la différenciation sexuelle et entre 30 et 50 jpf (TSn) correspondant à la période post-traitement.

La formule utilisée pour le calcul de la survie entre 0 et 9 jpf est la suivante :

$$TS9 (\%) = \frac{Nb \text{ individus à } 9 \text{ jpf}}{Nb \text{ œufs}} * 100$$

Ce taux de survie dépend à la fois du taux de fécondation, du taux d'éclosion et de la survie après l'éclosion. Le nombre d'œufs est déterminé à l'aide du logiciel ImageJ à partir des photos prises après la fécondation de chaque lot d'œufs.

Le taux de survie pendant le traitement (TS30) est déterminé à l'aide de la formule :

$$TS30 (\%) = \frac{Nb \text{ individus à } 30 \text{ jpf}}{Nb \text{ individus à } 9 \text{ jpf} - Nb \text{ individus prélevés pour analyses}} * 100$$

Le taux de survie post-traitement (TSn) est déterminé à l'aide de la formule :

$$TSn (\%) = \frac{Nb \text{ individus à } 50 \text{ jpf}}{Nb \text{ individus à } 30 \text{ jpf} - Nb \text{ individus prélevés pour analyses}} * 100$$

Avec n= période de 20 jours post-traitement.

Les poissons prélevés pour les analyses sont enlevés du nombre initial de poissons à 9 jpf pour ne pas être pris en compte dans le calcul du TS30 et du TSn. Les morts ont été relevés quotidiennement de manière à pouvoir générer la cinétique de survie.

II.13- Sexage et taux d'inversion sexuelle

Le sexage est réalisé entre 70 à 80 jours après la date de fécondation selon la méthode squash gonadique de Guerrero et Shelton, (1974). Pour une même famille, le sexage des lots témoins et traités est réalisé au même moment afin que les données entre témoins et traités soient comparable. Le processus s'est déroulé comme suit :

- ✓ euthanasie des poissons avec une surdose (200 ml/l) de benzocaïne
- ✓ pesée totale du lot et pesée individuelle des poissons sacrifiés
- ✓ prélèvement d'un fragment de gonade dans le fond de la cavité péritonéale.
- ✓ placement du fragment de gonade entre lame et lamelle, ajout de quelques gouttes d'acéto-carmin pour le contraste et écrasement des gonades par pression simultanée sur les deux lames (squash gonadique fig 5a).
- ✓ observation des tissus gonadiques par coloration à l'acéto-carmin en utilisant un microscope optique. Les gonades femelles présentent des ovocytes à divers stade (fig 5b) et les gonades mâles un enchevêtrement lobulaire (fig 5c).

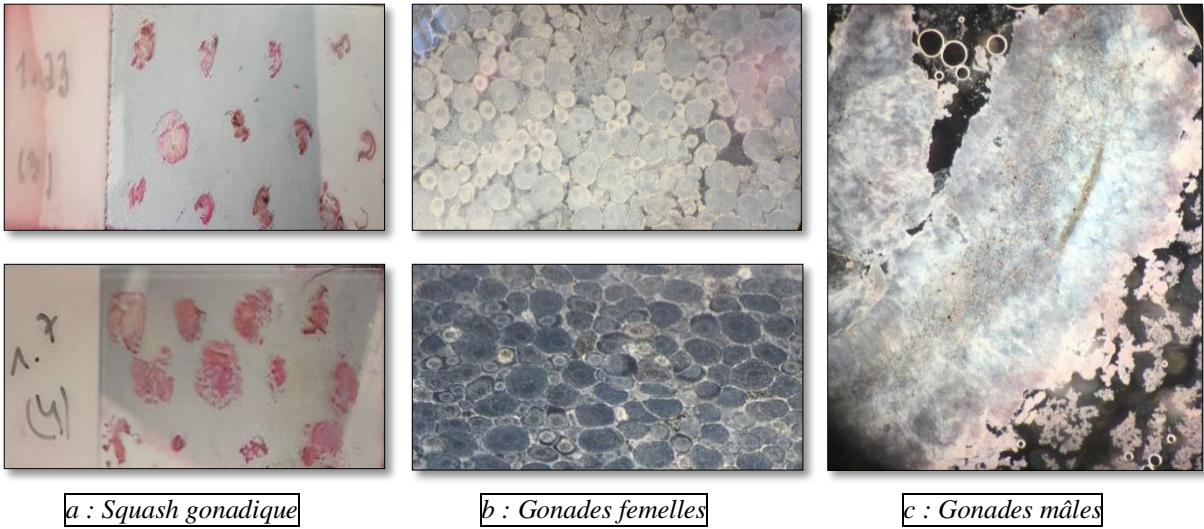


Figure 5 : Sexage des poissons

Le sexe ratio est déterminé après le sexage à partir de la formule :

$$SR (\%) = \frac{Nb \text{ mâles identifiés}}{Nb \text{ de poissons sexés}} * 100$$

Un taux d'inversion (TI) est calculé afin de mettre en évidence le niveau de masculinisation ou de féminisation au sein des différentes familles suite au traitement. Ce taux d'inversion est donné par la formule suivante :

$$TI (\%) = \frac{\text{Fraction femelles dans lot traité} - \text{Fraction femelles lot témoin}}{1 - \text{Fraction femelles dans le lot témoin}} * 100$$

pour les lots génotypes XY théorique (taux de féminisation)

ou :

$$TI (\%) = \frac{\text{Fraction mâles dans lot traité} - \text{Fraction mâles lot témoin}}{1 - \text{Fraction mâles dans le lot témoin}} * 100$$

pour les lots génotypes XX théorique (taux de masculinisation)

II.14- Analyse statistique

➤ Sexe ratio et survie

Les données sont traitées dans R (v3.4.4). Pour chaque donnée, un modèle linéaire généralisé est généré avec comme variable indépendante le traitement. En fonction du traitement, un test post hoc de Tukey est appliqué pour chaque paramètre (pourcentages de mâles, taux d'inversion, taux de survie). Concernant la différence de SR entre les traités et leurs témoins respectifs, un test de Fisher Exact a été appliqué (test des proportions tenant compte des proportions extrêmes : 100 et 0%). De plus, un test t-de student a été réalisé sur les TS9.

➤ RNA seq

Les données de séquençage sont trimées par la plateforme génomique du GIGA puis un test de qualité des données est réalisé à l'aide du software « multiQC ». Pour chaque échantillon, les séquences obtenues sont assemblées sur le génome du tilapia préalablement indexé à l'aide du software STAR (assembleur et indexation du génome préalable). Cette étape est très complexe et est réalisée sur le cluster de calcul CECI. Les données de comptage obtenues sont traitées dans R (v3.4.4) avec le package DSeq qui donnent une illustration des différences d'expression des gènes selon le traitement.

➤ RT-qPCR

La qPCR donne une expression relative entre 2 échantillons exprimée en Fold change (nombre de fois) ou relative quantification (RQ). Pour être significatif le Fold change doit avoir une valeur supérieure à 2 c'est-à-dire qu'il est 2 fois moins ou 2 fois plus exprimé. Le «fold change» est obtenu à partir de ces calculs :

- ✓ $\Delta Ct = Ct \text{ gène} - Ct \text{ contrôle endogène}$
- ✓ $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ condition traitée} - \Delta Ct \text{ Condition contrôle}$
- ✓ $RQ = \text{Relative quantification} = \text{Fold change} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$

Avec : Ct = cycle Treshold ; Contrôle endogène (Gènes normalisateurs) = gènes dont l'expression n'est pas affectée par le traitement étudié.

Les résultats sont présentée en Log2 de Fold change. Pour toutes les analyses statistiques, les différences sont jugées significatives au seuil de 5%. Les graphiques présentées sont générés dans R (c3.4.4) à l'aide du package ggplot2.

III- Résultats

III.1- Taux de survie

III.1.1- Taux de survie entre 0 et 9jpf

Le taux de survie moyen entre 0 et 9 jpf (TS9) des génotypes XX et XY sont respectivement de 75,0% et 59,0% (tableau 4). La différence entre les TS9 des génotypes XX et XY n'est pas significative (test de student avec $p > 0,05$). Comme illustré sur la figure 6, il semble varier en fonction de la ponte et non en fonction du génotype. En effet, TS9 varie entre 55,9% et 90,2% pour le génotype XX et entre 45,2% et 70,4% pour les génotypes XY.

Table 4 : Taux de survie entre 0 et 9jpf par lot et en fonction du génotype de 7 descendances de tilapia du Nil

Génotype	TS9	Génotype	TS9
XX_5	90,2	XY_1	45,2
XX_6	55,9	XY_2	70,4
XX_7	80,0	XY_3	56,4
		XY_4	64,8
Moyenne ± sd*	75,4±18,0	Moyenne ± sd*	59,2±11,0
pvalue	0,25	pvalue	0,25

*Ecart type standard

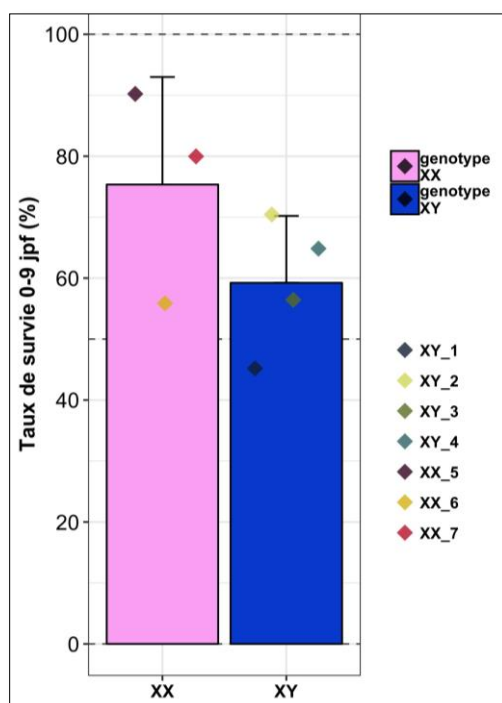


Figure 6 : Taux de survie de l'éclosion à 9jpf de sept descendances de tilapia du Nil selon les génotypes (XX/XY).

III.1.2- Taux de survie pendant et après les traitements (thermique et inhibition de HSP90)

Le taux de la survie moyenne durant les 20 jours (10-30 jpf) d'exposition thermique (28°C et 36,5°C) est respectivement de 93,29% et 73,39% contre 67,5% et 61,3% durant les 20 jours (30-50 jpf) suivant où l'eau d'élevage des lots traités était revenue à la même température que celle des lots témoins. La figure 7 montre que pendant la période de traitement, les taux de survie sont significativement différents dans les diverses conditions (T28, LTh et BIIB02) mais il n'y a pas de différence significative entre les génotypes. Toutefois, le taux de survie des individus à génotype XY traités à haute température semble être plus proche de celui des individus témoins (XX et XY). Il n'y a aucune différence significative entre les taux de survie post-traitement dans les diverses conditions ni entre les génotypes.

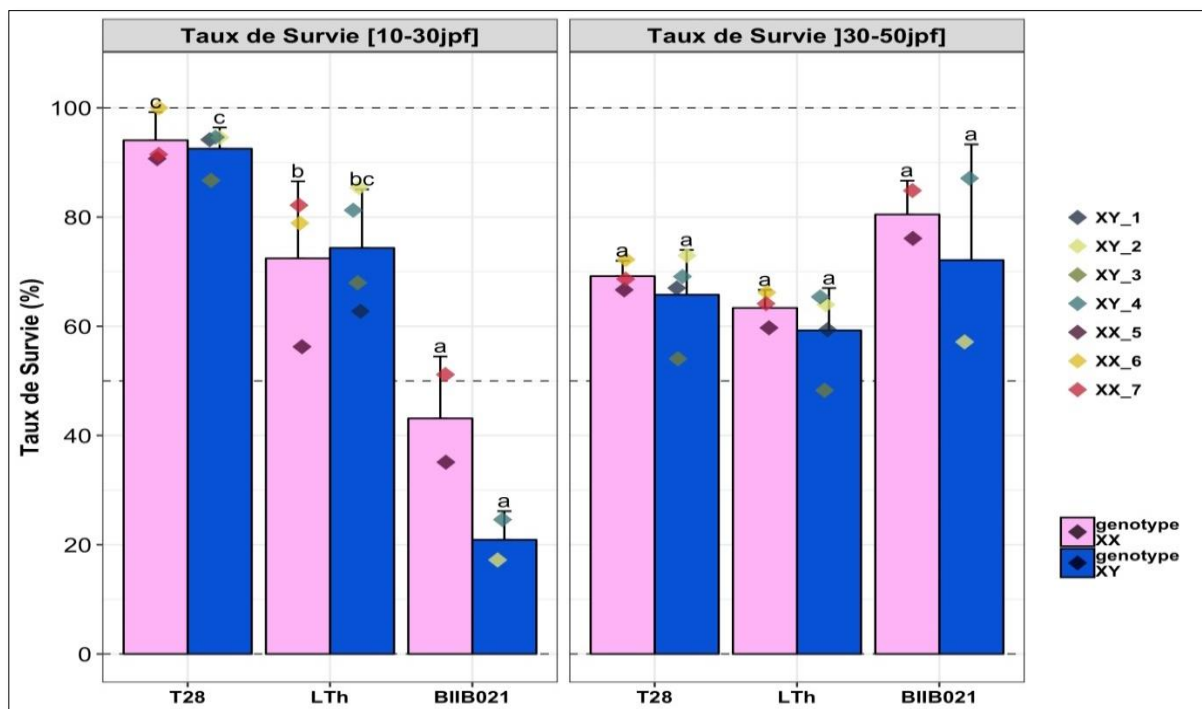


Figure 7 : Comparaison des taux de survie des alevins de tilapia du Nil pendant le traitement et post traitement selon les conditions et les génotypes. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative.

III.1.3- Cinétique de survie et de mort

La courbe de survie de Kaplan Meier réalisée sur base du relevé de mort au cours de l'expérience (fig. 8), montre que la mortalité est plus prononcée entre 10 et 30 jpf correspondant à la période de traitement. Pour les différentes conditions étudiées, le log-rank test indique que la cinétique de survie est significativement différente ($p < 0,05$). Cependant, les lots traités à l'inhibiteur de HSP90 présentent un taux de survie de moins de 50%. Dans tous les cas, c'est la survie des individus à génotype XY qui est la plus affectée par le traitement à l'inhibiteur. En effet, seulement de $20,9 \pm 5,2$ à $43,1 \pm 11,3$ % de survie est observée entre 10 et 30 jpf respectivement pour les 2 lots traités (XY et XX) à l'inhibiteur de

HSP90 contre un taux de survie de $74,0 \pm 10,7$ à $72,4 \pm 14,11$ % dans les lots traités (XY et XX) à haute température et environ $92,5 \pm 3,9$ et $94,1 \pm 5,2$ % pour les témoins (XY et XX). La survie reste relativement constante après 30 jpf dans les différentes conditions puis une forte mortalité est observée pour tous les lots à partir de 60 jpf empêchant la réalisation du sexage à 90 jpf comme prévu.

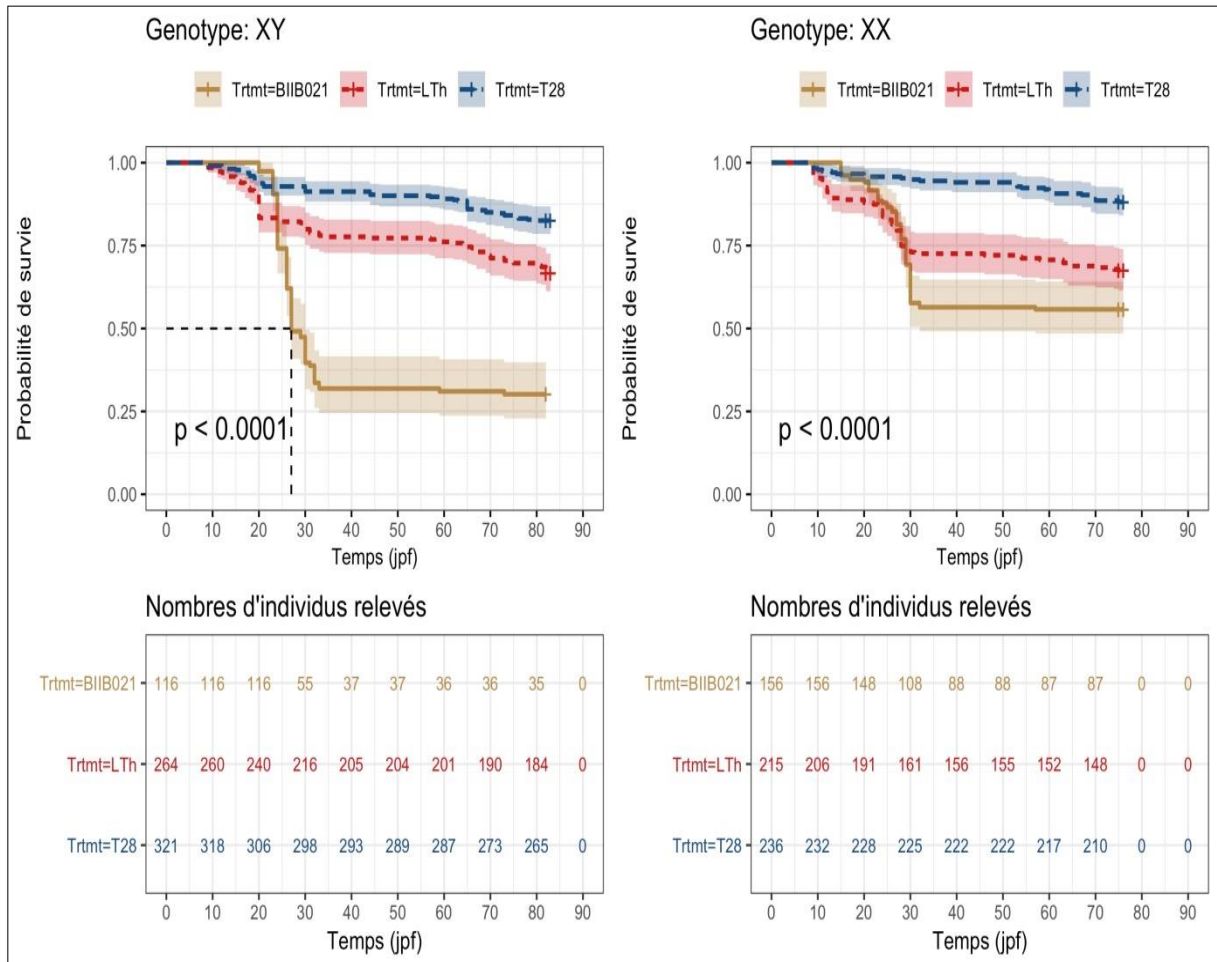


Figure 8 : Cinétique de survie des alevins de tilapia du Nil dans les différents traitements selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. Les lignes en couleurs représentent les traitements : bleu Température normal 28°C (T28), rose = haute température 36,5°C (LTh) et maron= inhibiteur de HSP90 (BIIB021).

III.2- Poids moyen à 30 et 50 jpf

Le poids moyen est comparé pendant 2 périodes (traitement et post-traitement) comme pour le taux de survie. La figure 9 montre que le poids moyen à 30 jours varie entre $0,21 \pm 0,01$ et $0,3 \pm 0,09$ g et n'est pas significativement différente entre les lots traités (Ltherm et BII021) et les lots témoins. A 50 jours, le poids moyen varie entre $1,3 \pm 0,31$ et $1,9 \pm 0,32$ g et n'est pas significativement différent entre les lots traités (Ltherm et BII021) et les lots témoins. Cependant, à 30 jours comme à 50 jours, les témoins paraissent toujours plus lourds que les traités mais, la variation entre familles, n'est pas significative.

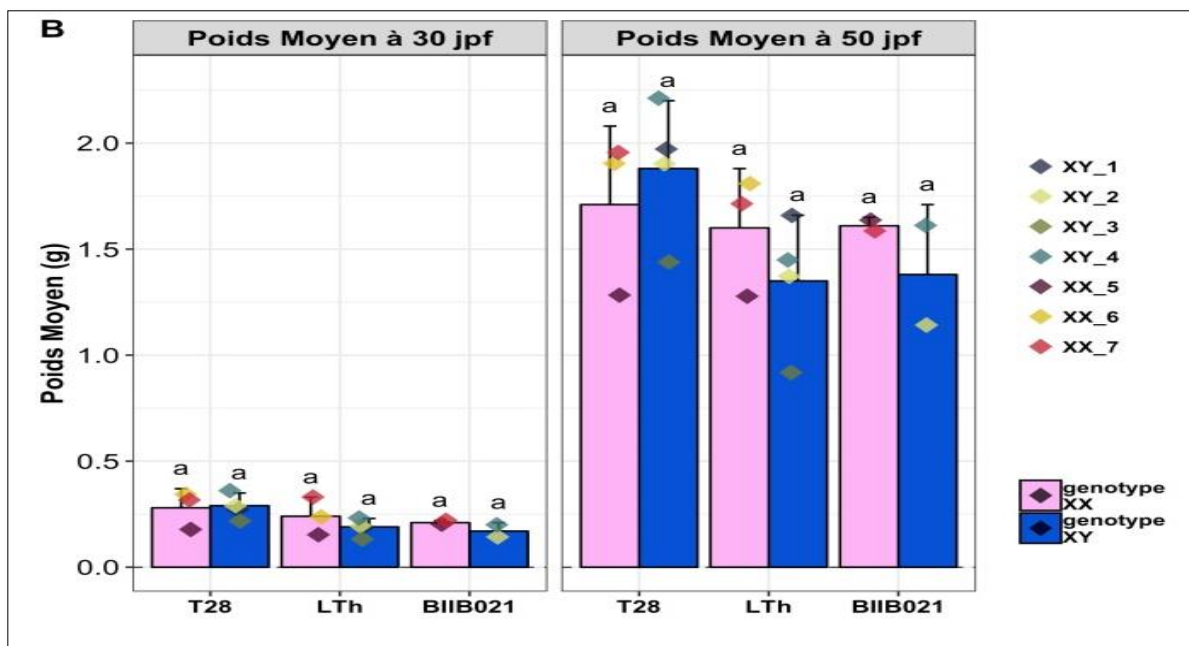


Figure 9 : Poids moyen à 30 et 50 jpf des juvéniles de tilapia du Nil selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative.

III.3- Sex-ratio et taux d'inversion

Le nombre et les stades auxquels les poissons sont sexés sont présentés en annexe 13. La figure 10 présente le sex-ratio en termes de pourcentage de mâle et de femelle pour chacun des lots des différentes descendance. Pour les génotypes XY, la totalité des lots témoins sont des mâles (100%). Les proportions de femelles dans les lots Ltherm varie entre 6% pour la famille XY_2 et 52% pour la famille XY_3, valeur significativement différente au témoin (100% mâles). Aucune féminisation (100% mâle) à haute température n'est observée pour la famille XY_1 et XX_4. Quant au traitement à l'inhibiteur de HSP90, le sex-ratio est de 100% mâle dans les 2 lots (XY_2 et XY_4), il n'y a pas de différence significative. Pour les génotypes XX, la proportion de mâle dans les lots témoins varie de 10 % (familles XX_5) à 11 % (familles XX_6). Les familles XX_6 et XX_7 présentent une thermosensibilité relativement faible (15% et 28% de mâles) par rapport à la famille XX_5 pour laquelle la thermosensibilité est élevée, soit 72% de mâles. Toutefois, la comparaison entre lots traités à la température et lots témoins montre un effet allant de significatif à très hautement significatif ($p < 0,05$ et $p < 0,001$) sur le sex-ratio des lots respectifs : XX_6 ; XX_5 et XX_7. Quant à ceux traités à l'inhibiteur, le sex-ratio est de 100% femelle pour les 2 lots (XX_5 et XX_7).

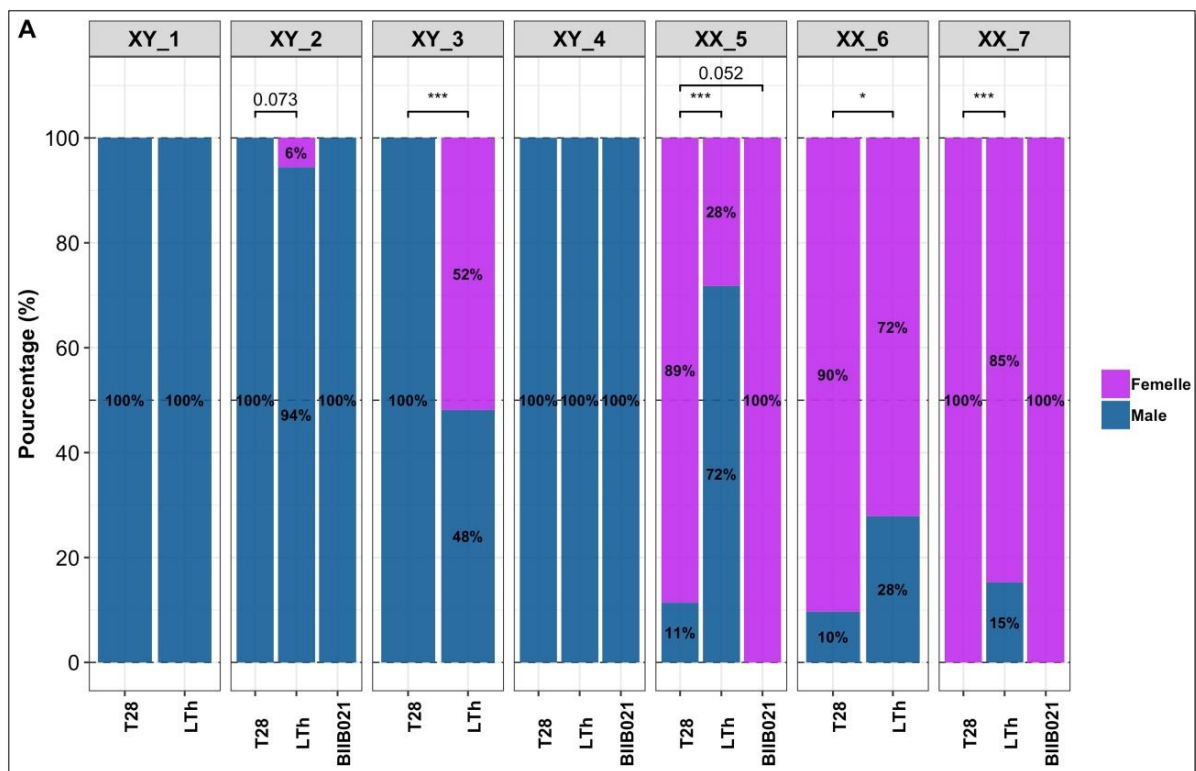


Figure 10 :Sex-ratio dans la descendance de tilapia du Nil en fonction du génotype sexuel XX/XY et du type de traitement. Poids moyen à 30 et 50 jpf des juvéniles de tilapia du Nil selon le type de traitement entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les barres représentent les % de femelles en mauve et le % de mâle en bleu.

Tenant compte du sex-ratio dans le lot témoin, le taux d'inversion (TI) montre le niveau de masculinisation ou de féminisation par rapport au pourcentage respectif de femelles ou de mâles présents dans le lot témoin et susceptibles d'être masculinisés ou féminisés. La valeur de ce taux d'inversion peut être positive ou négative. Lorsqu'elle est positive, elle est comprise entre 0 (pas d'inversion) et 100 (inversion totale). Si le TI est négatif, cela indique un effet contraire à celui attendu (masculinisation au lieu de féminisation ou féminisation au lieu de masculinisation). On observe un facteur d'inversion de 15 à 35 % en moyenne pour les lots traités thermiques (XY et XX), en revanche un taux d'inversion nul voir négatif (-7,5%) est observé pour ceux traités à l'inhibiteur (XY et XX) qui ne sont pas significativement différents entre eux (fig. 11).

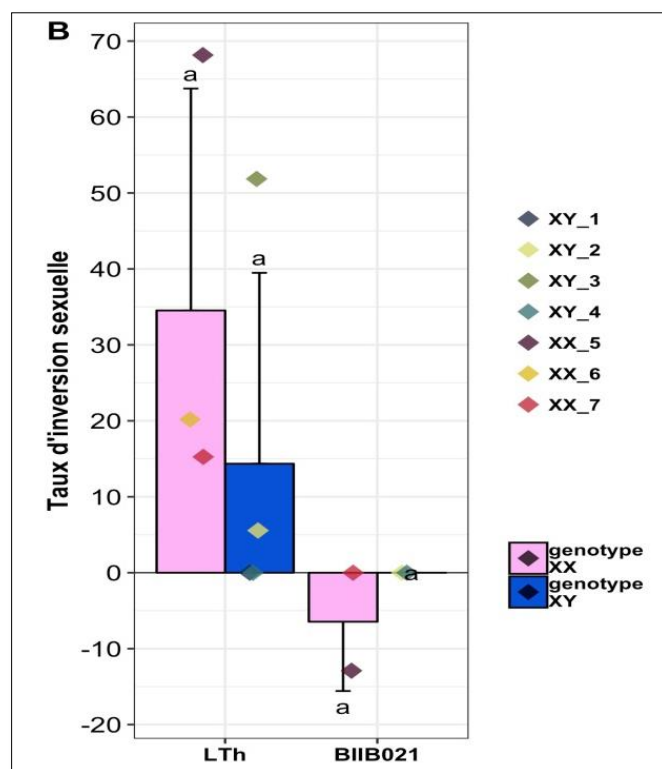


Figure 11 : Taux d'inversion sexuel en fonction du génotype chez le tilapia du Nil selon le type de traitement (LTh : haute température 36,5°C et inhibiteur de HSP90 : BIIB021) entre 10 à 30 jpf. T28 : Température normal 28°C, LTh : haute température 36,5°C et BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu. Les mêmes lettres indiquent une qu'il n'y a pas de différence significative

III.4- Profil d'expression des gènes

III.4.1- Expression des gènes dans le traitement à l'inhibiteur de HSP90

La pureté de l'ARN et sa qualité d'extraction sont présentées en annexe 14. La figure 12 présente le taux d'expression des gènes exprimé en log2 Fold change dans les lots traités à l'inhibiteur par rapport aux lots témoins dans les gonades à 15jpf. On observe chez les descendants XX, une sous expression des gènes de différenciation sexuelle (*dmrt1* et *foxl2*) et une surexpression des gènes HSP (*hsp 90*, *hsp 27*, *bag3*). Il paraît que *dmrt1* est le gène le plus sous exprimé (0,4 fois) parmi les gènes de différenciation sexuelle tandis que, *hsp90* est celui le plus surexprimé (95,8 fois) de manière significative par rapport au témoin parmi les gènes d'HSP. Chez les descendants XY, es gènes *hsp27* et *bag3* sont surexprimés de manière hautement significative (42,4 et 12,2 fois) par contre, la surexpression du gène *hsp90* n'est pas significative. Pour les gènes de différenciation sexuelle, l'expression de *dmrt1* est induit à la hausse (18,4 fois) de manière significative ($p < 0,005$) ; la surexpression de *foxl2* n'est pas significative.

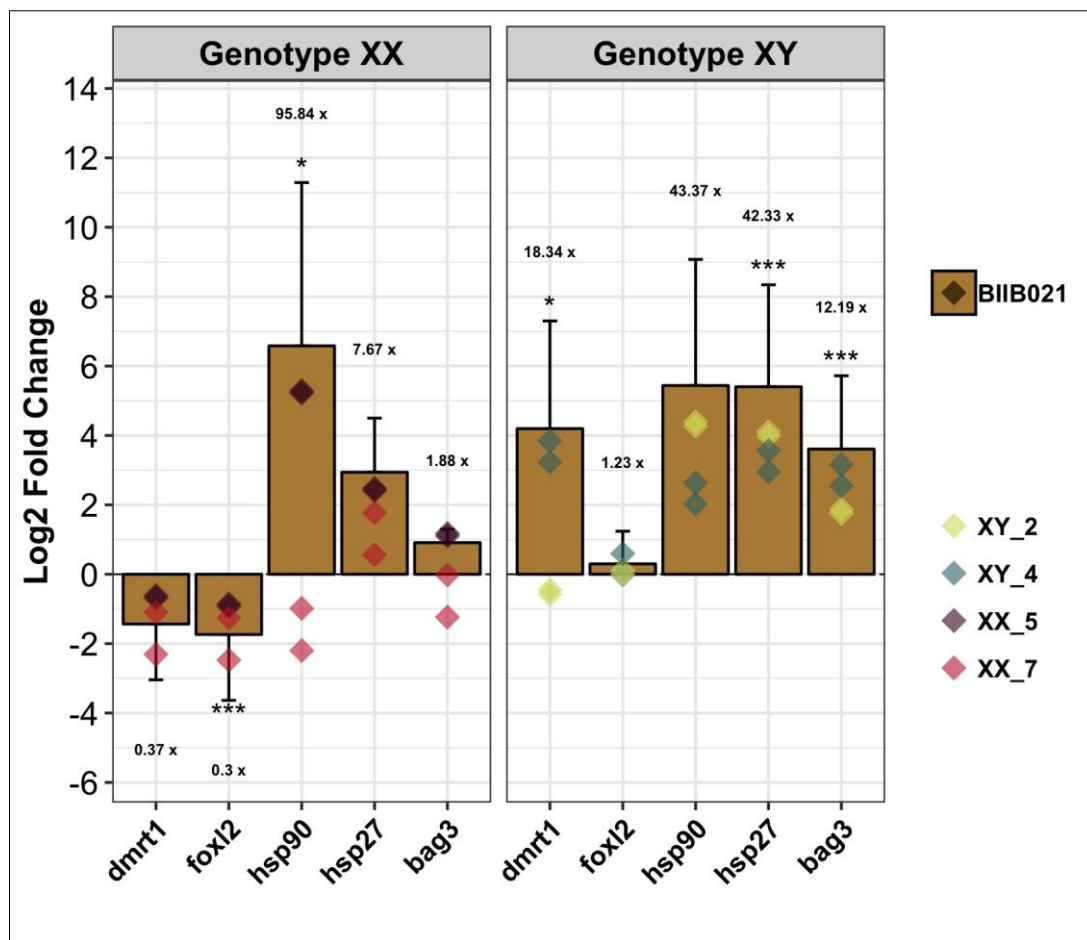


Figure 12 : Expression des différents gènes dans les gonades à 15 jpf chez des individus de tilapia du Nil (2 génotypes différents) traités à un inhibiteur de HSP90 (70mg/kg) entre 10-30 jpf. BIIB021 : inhibiteur de HSP90. Les losanges en couleur représentant chacun une famille dans son lot. Les barres représentant les génotypes, XX en rose et XY en bleu.

III.4.2- Expression des gènes dans le traitement thermique

III.4.2.3- Qualité des échantillons d'ARNm

Les résultats des rapports 260/280 sont présentés en annexe 15 A. La valeur de ce rapport est toujours au-dessus de 2 à la fois pour ARN et ADN/protéines, donc ce rapport est adéquat pour l'extrait d'ARN. Les résultats 260/230 avant purification supplémentaire sont présentés en annexe 15 B. Ce rapport est toujours supérieur à 2 sauf pour les gonades à 40 jpf. Les résultats de RIN sont présentés en annexe 15 D, pour les têtes (15 jpf et 30 jpf), et les gonades à 15 jours, le RIN est toujours supérieur à 7. Les gonades ont un RIN plutôt mauvais due à une dégradation des ARNs, il convient d'en tenir compte dans analyse du séquençage. La qualité d'extraction ainsi que les valeurs de librairies sont présentées en annexe 15 (C et E).

III.4.2.4- Profils d'expression des gènes dans les têtes et gonades

Les volcano-plots (fig. 13) comparent l'expression des gènes chez les traités LTh et les témoins. Les comparaisons sont effectuées sur des gonades et têtes à 15jpf (A et B), gonades a et têtes à 40 jpf (C et D). Les gènes dans les lots traités sont considérés comme différentiellement exprimés quand leur expression est 4 fois supérieure ou inférieure par

rapport aux lots témoins et que cette différence est significative. ($p < 0,005$). Le volcanoplot montre dans les gonades à 15 jpf une surexpression significative de *cyp19a1a*, *foxl2* et les *hsp* 90, *hsp70*, *hsp27* et dans les têtes à 15 jpf une surexpression de *hsp90* et *hsp70*. Dans les gonades à 40 jpf le volcanoplot indique une surexpression de manière significative de *cyp19a1a* et *foxl2*, *hsp* n'est pas surexprimé. Dans les têtes à 40 jpf, aucun des gènes ne sont différentiellement exprimés.

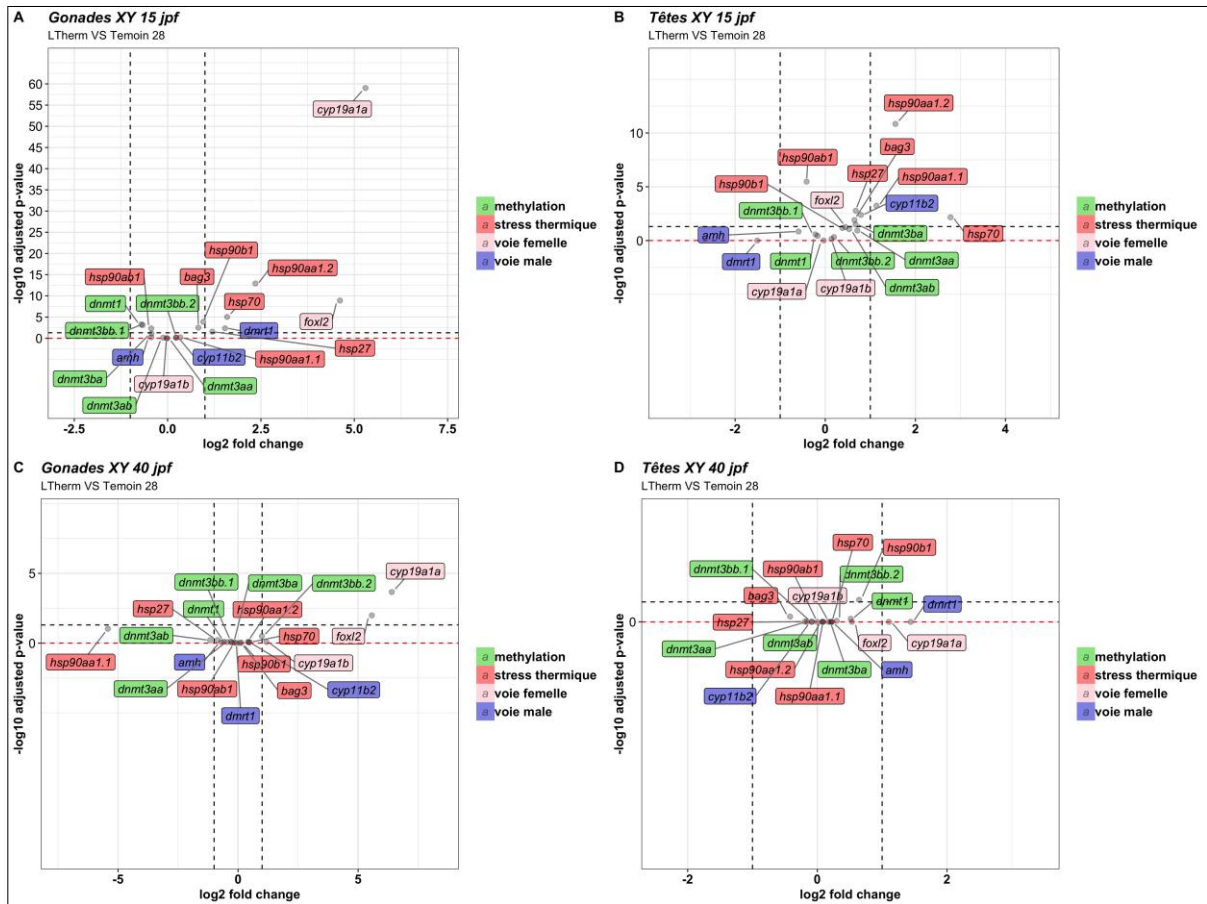


Figure 13 : Volcanoplot permettant de comparer l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle et le stress thermique, dans les des tissus de gonades et de têtes à 15 et 40 jpf chez le tilapia du Nil.

IV- Discussion

IV.1- Taux de survie et cinétique de mortalité

La tendance de la courbe de cinétique de survie indique que le traitement à l'inhibiteur affecte fortement la survie des alevins. Pour les individus à génotype XY, la LT50 est déjà atteint à partir de 27 jours. Cette observation semble être en contradiction avec l'étude de Agirman., (2016) mentionnant un taux de survie non affecté malgré une dose 2 fois plus élevée que celle utilisée dans cette présente étude. Agirman., (2016) dans son étude n'avait utilisé qu'un seul lot de poisson à génotype XX. Considérant l'effet de l'inhibiteur observé dans tous les lots traités, l'hypothèse selon laquelle l'inhibiteur n'a pas d'impact sur la survie peut être remise en question. En outre, la cinétique de survie plus faible (diminution faible du taux de survie) au cours de la période post-traitement (30-50 jpf) indique une récupération des individus après le traitement et conduit à la conclusion que le traitement (BIIB021) a eu un effet néfaste sur la survie du tilapia du Nil.

Pour le traitement à haute température, la diminution du taux de survie est plus importante comparativement au témoin élevé à 28°C. Ces résultats sont conformes à ceux d'autres auteurs indiquant une diminution significative de la survie à des températures de plus de 35°C (Abucay et al., 1999; Kwon et al., 2002). Dans leur étude, ils ont trouvé pour le traitement thermique (36°C.) des taux de survie moyens significativement inférieurs (53,0% et 32,3%) à celui des témoins (90,7% et 96,4%) à 27°C. La tendance de la courbe de cinétique de survie montre que les lots ont mieux survécu après les périodes de traitement tant à haute température qu'à l'inhibiteur jusqu'au 50^{ème} jour.

Nous avons observé une augmentation de la mortalité à partir de 50 jpf, il s'avérait que c'était dû à une pathologie qui a commencé à affecter les poissons dans tout le circuit d'élevage. En raison de cette pathologie, l'expérience de nourrissage a été écartée, les poissons ont été nourris avec un antibiotique et le sexage est réalisé avant les 90 jours comme c'est recommandé dans les autres études mais post 75 jours pour tous les lots.

IV.2- Effet des traitements sur la croissance du tilapia du Nil

IV.2.1- Effet des hautes températures

Il n'y a pas de différence significative en termes de croissance des alevins de tilapia du Nil traités à hautes températures de 36,5°C et leur témoin élevé à 28°C. Pour les différentes familles combinées, que le poids moyen des témoins est toujours supérieur à celui des traités. La croissance plus faible observée pour les individus traités à haute température s'explique par le fait que, ces hautes températures connues pour induire une réversion sexuelle (36,5°C) chez le tilapia du Nil est supérieur à l'optimum thermique de croissance chez cette espèce (Azaza et al., 2008). Elle peut résulter également d'une diminution de l'appétit et de l'ingestion due à l'impact négatif de ces températures proches de la létalité comme le suggère (Jobling, 1997 cité par Ouedraogo, 2014).

En outre, à l'exception du lot témoin à 50 jpf pour lequel la croissance du génotype XY est plus élevée, on observe une croissance plus faible des génotypes XY comparée aux génotypes

XX à la fois dans les lots traités et les lots témoins. La croissance plus faible des génotypes XY pourrait découler d'un effet parental (paternel). En effet, Toguyeni et al., (2008) ont mis en évidence une vitesse de croissance plus faible des descendances YY par rapport aux mâles XY et XX (femelles inversées). Les génotypes XY étant issus du croisement de femelle XX et de mâle YY, on peut supposer que cette faible croissance est en relation avec la faible croissance des géniteurs mâles YY utilisés pour la génération des descendances XY.

IV.2.2- Effet de l'inhibiteur de HSP90

Dans cette étude, l'effet de l'inhibiteur sur la croissance des juvéniles de tilapia du Nil a été testé sur deux lots XX d'individus et deux lots d'individus XY. Malgré le fait que la croissance semble plus faible dans les lots traités, cette différence s'avère non significative après analyse statistique. Agirman., (2016) a étudié l'effet de l'inhibiteur sur une seule descendance XX de tilapia du Nil et a observé des individus en moyenne 3 fois plus légers que le témoin (durant la période de traitement). En combinant ces résultats obtenus dans des expériences indépendantes, il apparaît que la diminution de la croissance induite par l'inhibiteur de HSP90 est bien significative, du moins pour les lots XX. Comme l'a mentionné Agirman.,(2016)le poids plus faible des individus nourris à l'inhibiteur peut être expliqué d'une part par l'effet répulsif de l'inhibiteur qui réduirait l'attractivité de la nourriture pour les poissons, il en découlerait un sous nourrissage des poissons de ce traitement et donc un poids plus faible comparé à ceux des lots témoins. D'autre part, l'absorption de l'inhibiteur peut avoir une interaction directe avec le métabolisme du poisson, ralentissant sa croissance. Seule la mesure de la dose d'inhibiteur ingérée pourrait confirmer cette hypothèse.

Comme pour les lots traités aux hautes températures, la faible croissance des individus de génotypes XY (0,17 g) traités à l'inhibiteur de HSP90 comparée à son témoin (0,29 g) pourrait résulter soit d'un effet parental dû à la faible croissance des géniteurs YY utilisés, soit d'un effet plus prononcé de l'inhibiteur sur les génotypes XY.

IV.3- Sex-ratio et facteur d'inversion

IV.3.1- Effet du traitement thermique sur le sexe-ratio

Bien que les descendances XX soient issues des géniteurs mâles et femelles de génotypes XX, les lots témoins présentaient 10 à 11 % de mâles au lieu des 100% femelles attendues. Le même effet a été observé dans les lots témoins des études de Degrange., (2019) avec seulement 75,0 et 83,3 % de femelles, Wikondi, (2016) avec 0 à 40% de femelles et Mukasekuru., (2016) avec 0 à 14% de femelles. Cependant ces résultats diffèrent de ceux observés par Rougeot et al., (2008) et Bezault et al., (2007) ayant obtenu une descendance de 100% femelle. Dans les lots à génotypes XX traités, on a observé des cas de famille à faible thermosensibilité (15% et 28% de mâles) et des familles à forte sensibilité thermique (72% de mâles). Malgré la faible thermosensibilité de certaines descendances, ces résultats sont semblables aux études de Baroiller et al., (1995) pionniers de l'inversion thermique des alevins, de Tessema et al., (2006), de Bezault et al., (2007) et Ouedraogo., (2014) ayant mis en évidence une proportion de mâles plus importante dans les lots XX traités aux hautes températures entre 10 et 30 jpf comparativement au témoin.

Baroiller et D’Cotta., (2001) et Tessema et al., (2006), ayant décrit la complexité du déterminisme du sexe chez le tilapia du Nil ont montré que la thermosensibilité fluctue d’une descendance à une autre et, même entre les individus d’une même descendance il existe une certaine variabilité de la thermosensibilité (Baroiller et al., 1996; Baroiller et al., 2009). Le trait thermosensible est un caractère héritable à la fois des deux parents. En effet, la faible thermosensibilité obtenue dans les descendance de cette étude peut résulter d’un caractère héritable lié à la faible thermosensibilité d’un des parents ou des deux à la fois. Toutefois, la thermosensibilité des géniteurs utilisés devrait être vérifiée en réalisant d’autres croisements avec les mêmes géniteurs, ce qui n’était pas l’objectif de ce travail, on ne peut pas confirmer cette hypothèse pour le moment.

De nombreux auteurs (Baroiller et al., 1999; Devlin et Nagahama, 2002; Ospina-Alvarez et Piferrer., 2008) ont étudié le rôle de la température dans l’inversion du sexe en particulier dans la masculinisation de certains téléostéens dont le tilapia. Ils mentionnent que les hautes températures appliquées au cours de la phase différenciation sexuelle inhibent l’expression des gènes de la différenciation gonadique femelle : *foxl2* et *cyp19a1*. Plus récemment, des chercheurs ont observé une sous expression des gènes *foxl2* et *cyp19a1* dans les gonades à 15 jours des individus XX traités à hautes températures par rapport au témoin à 28°C et à 40 jpf, seulement *foxl2* était sous exprimé (Nivelle communication personnelle). Il s’ensuit en conséquence, une haute expression des gènes de la différenciation testiculaire (*dmrt1*, *amh*, *sox9*).

Pour les génotypes XY, sur les 4 descendance utilisées, deux familles ont répondu au traitement à haute température. L’une de manière hautement significative ($p < 0,001$) avec 52% de femelle par rapport à son témoin 100% mâles et l’autre avec une différence proche du seuil de significativité avec 6% de femelles et son témoin 100% mâles. Patino.,(1996) ont déjà démontré l’effet féminisant des hautes températures de 34 °C sur les alevins de *Clarias gariepinus*. Sur le tilapia du Nil, des effets de féminisation à hautes températures ont été observés tant sur des descendance YY que sur des descendance XY (tab. 5).

Table 5 : Synthèse des résultats des études précédentes ayant soumis des juvéniles (XY et YY) de tilapia du Nil à haute température.

Génotype	Température	Durée traitement	% femelle	Références
YY	36	30	13,0	Kwon et al., (2002)
YY	36	21	32,0	Karayücel et al., (2003)
YY	36,5	21-30	92,3	Abucay et al., (1999)
YY	36	-	35,5	Kitano et al, 1999
XY	36,5	21-30	13,7	Abucay et al., (1999)

IV.3.2- Effet de l’inhibiteur de HSP90 sur le sexe-ratio

Dans les 2 lots XY traités à l’inhibiteur, le sex-ratio est de 100% comme pour le témoin. Cela indique qu’il n’y a pas d’effet masculinisant ni d’effet féminisant de l’inhibiteur de HSP90 sur ce génotype. Cependant, dans les génotypes XX, une famille sur les deux étudiées montre une

diminution de la proportion de mâle par rapport au témoin avec un seuil proche de la significativité ($p=0,052$), pour l'autre famille le sex-ratio était de 100% mâles. Avec un facteur d'inversion équivalant à -6,4% ces résultats permettent de corroborer les résultats de Agirman., (2016) qui avait observé une diminution de la proportion de mâles dans les lots traités à l'inhibiteur au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en inhibiteur. L'effet de féminisation observé pourrait être dû à l'apparition de phénotypes non exprimés dû à l'inhibition de HSP90 comme tel est le cas d'après Rutherford et Lindquist., (1998) chez la drosophile. En effet, l'inhibition de protéine HSP90 semble avoir un effet d'interruption de son rôle de stabilisateur des récepteurs d'hormones stéroïdiennes et en conséquence ces récepteurs peuvent être soit dégradés ou se lier à d'autres hormones non spécifiques et donc entraîner une modification du phénotype.

IV.4- Profils d'expression des gènes

IV.4.1- Expression des gènes dans le traitement à l'inhibiteur

Chez le poisson mexicain (*Astyanax mexicanus*), l'inhibition de HSP90 mène à la surexpression des 3 gènes de la voie du choc thermique (*hsp90*, *hsp27* et *bag 3*) (Rohner et al., 2013). Dans les lots XY, qui sont les plus affectés par le traitement en termes de survie, nous observons une hausse significative de l'expression des gènes *hsp27* et *bag3* à 15 jpf confirmant que l'action de l'inhibiteur sur ces gènes a bien eu lieu. Dans les lots XX, cette surexpression par rapport au témoin est aussi observée, mais n'est pas significative. Le gène *hsp90* par contre est surexprimé de manière significative contrairement à ce qui est observé dans les lots XY. Ces observations suggèrent que les individus à génotype XY sont plus sensibles au traitement à l'inhibiteur de HSP90, donc le mécanisme de compensation se met en route plus rapidement que chez les individus XX. Le système HSP90 est donc plus efficace chez les individus XY ce qui implique que le mécanisme soit déjà revenu à la normale et donc pas de surexpression du gène de HSP90. *hsp27* et *bag3* en tant que gènes régulateurs font des boucles de régulation en augmentant puis diminuant leur expression de manière à assurer un mécanisme de compensation génétique des pertes de l'activité de HSP90. (Rohner et al., 2013) ont mis en évidence chez *Astyanax mexicanus* qu'une déplétion de HSP90 par un inhibiteur entraîne une augmentation croissante des gènes *bag3* et *hsp27* avant de diminuer à nouveau très lentement vers la normale à l'approche de la période post traitement. Agirman., (2016) étudiant l'expression de ces gènes en fold change dans les gonades et troncs d'une descendance XX, a observé que *bag 3* n'était pas surexprimé et *hsp27* l'était encore un peu de 2,5 fois. A 30 jpf, l'expression de *bag3* et *hsp27* était déjà diminué. Dans cette étude, effectuée déjà à 15 jpf, nous observons en effet une induction de ces gènes dans les lots XY qui est moins évidente dans les lots XX. Il se pourrait donc aussi que les individus XX arrivent plus rapidement à cette phase de diminution. Une cinétique plus précise permettrait de répondre à cette question.

La famille XX_5 qui a répondu au traitement à l'inhibiteur par une féminisation de 6,4 % à un niveau de surexpression du gène *hsp90* qui est le plus élevé (96 fois). C'est aussi cette famille qui est la plus thermosensible à la masculinisation (72% de mâles). Nous suggérons comme Agirman., (2016) que le phénomène observé en cas d'inhibition de HSP90 est le même qu'en cas de traitement thermique. Il s'agit d'une interruption du rôle de stabilisateur de HSP90.

Dans le cas du choc thermique, HSP90 va protéger les protéines sensibles au stress thermique et donc n'est plus disponible pour stabiliser les protéines impliquées dans le déterminisme sexuel. Vu les résultats convergents obtenus pour le sexe-ratio des lots traités thermiques et des lots traités à l'inhibiteur pour cette famille, HSP90 semble jouer un rôle dans le déterminisme environnemental du sexe, mais cet effet est différent suivant le génotype des individus (XX ou XY).

Selon, Cutting et al., (2013) le gène *dmrt1* est impliqué dans la différenciation testiculaire chez les mammifères oiseaux et poissons et *foxl2* dans la différenciation ovarienne. L'homologue de *dmrt1*, le *dmy* lorsqu'il est inhibé induit une inversion sexuelle des mâles en femelles. Selon le profil d'expression des gènes, il paraît que l'inhibition de HSP90 induit pour les lots XX une diminution dans l'expression des gènes de différenciation sexuelle qui est plus importante dans le gène mâle (*dmrt1*) que dans le gène femelle (*foxl2*). Ça pourrait conduire à un déséquilibre dans le ratio androgène/œstrogène et entraîner la féminisation des descendants XX. Nos résultats sont toutefois peu concluants pour affirmer ou infirmer cette hypothèse, en effet, les lots XX étudiées n'étaient pas identiques quant à leur témoin dont l'un présente une certaine proportion de mâle et l'autre pas.

IV.4.2- Expression des gènes dans le traitement thermique

Malgré que seulement 2 sur les 4 des familles XY utilisées ont répondu au traitement thermique, et que pour l'une de ces familles qui ont répondu la féminisation n'était que de 6%, on observe une surexpression de l'aromatase qui est très significative. La surexpression de gènes de la voie femelle (*cyp19a1a* et *foxl2*) dans les gonades à 15 jours comme à 40 jpf confirment la féminisation à haute température que nous avons observé par sexage des individus et corrobore les résultats de Abucay et al., (1999) concernant l'effet féminisant de la température sur les descendances de génotypes XY observé uniquement par sexage des individus. Dans une étude précédente, les résultats de traitement à hautes températures sur des individus XY ont montré un profil d'expression des gènes similaires (annexe 16) mais orienté vers la voie mâle en raison de la masculinisation à hautes températures. En effet, ces études montrent dans les gonades à 15 jpf et 40jpf une surexpression de *dmrt1* et une sous expression de *cyp19a* dans les gonades et les têtes à 15 jpf (*Nivelle, communication personnelle*). Nos résultats complètent en effet ceux de cette précédente étude et ensemble ils s'alignent aux résultats de Tao et al., (2018) ayant indiqué une augmentation de l'expression des gènes *dmrt1* dans les testicules et de *foxl2* dans les ovaires déjà à partir de 7jpf.

Li et al., (2014) ont montré une hausse de l'expression de *hsp70* dans le cadre de l'inversion thermique du tilapia. La surexpression dont nous avons observé pour les gènes de choc thermique (*hsp90* et *hsp7*) dans les gonades et dans les têtes à 15 jpf, pourrait traduire une réponse de HSP90 au stress thermique. Par contre, à 40 jpf le stress étant arrêté, *hsp90* et *hsp70* ne sont pas surexprimés dans quel que soit le tissus. Nos résultats sont cohérents à ceux d'une étude précédente sur le tilapia du Nil ayant montré une surexpression des gènes HSP dans les gonades et les têtes à 15 jpf. Les résultats de cette étude ont également montré que *hsp90* n'était pas non plus surexprimé dans aucun des tissus à 40 jpf (*Nivelle communication personnelle*).

V- Conclusions

L'étude de l'expression des gènes durant la différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil confirme que l'inhibition de HSP90 a un effet de féminisation des individus XX et qu'il n'aurait aucun effet masculinisant des génotypes XX ou XY. Cette étude confirme en outre à travers la surexpression des gènes de différenciation sexuelle (*cyp19a1* et *foxl2*) la féminisation des descendance XY de tilapia du Nil par traitement à hautes températures de 36,6°C généralement évoqué sur base de sexage des individus. En effet, le traitement thermique, appliqué au stade sensible de la différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil peut induire un sex-ratio asymétrique mâle ou femelle selon le génotype de la descendance (XX ou XY). Cette étude permet également de corroborer le rôle de HSP90 dans le stress thermique et comme l'un des facteurs affectant la différenciation sexuelle. Toutefois, la question du mécanisme d'intervention de HSP90 dans le déterminisme du sexe est encore à explorer.

VI- Perspectives

La féminisation des individus XY à haute température serait une bonne découverte qui permettrait d'avoir 100% mâle YY pour la phase commerciale, sans passer par la première étape de féminisation des XY à l'éthynyl œstradiol connue pour avoir des impacts négatifs sur l'environnement. Pour vérifier l'effet féminisant du traitement thermique, il convient d'utiliser des croisements femelles phénotypiques (XY) obtenues avec soit des mâles XX (neomâles) de manière à avoir un sexe-ratio attendu de 50% XX et 50% XY soit des mâles YY (supermâle) pour avoir un sexe ratio attendu de 100 % mâle dont 50% XY et 50% YY.

Pour vérifier le rôle de HSP90 dans le déterminisme du sexe, il serait nécessaire d'étudier le profil d'expression des gènes *hsp* par RNAseq à la fois sur des familles traitées à l'inhibiteur et à haute température. On pourrait également essayer de coupler le traitement inhibition de HSP90 au traitement à haute température sur des descendance XX et XY afin de mettre en évidence l'effet des hautes températures dans le déterminisme et la différenciation sexuelle en absence de cette protéine de choc thermique (HSP90): masculinisation (XX), féminisation (XY), ou mortalité. Les résultats permettraient de mieux comprendre le mécanisme d'action de HSP90 dans le choc thermique.

BIBLIOGRAPHIE

Abucay, J. S., Mair, G. C., Skibinski, D. O. F., & Beardmore, J. A. (1999). Environmental sex determination: The effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 173(1–4), 219–234.

Agirman Ferman 2016. (2016). “*Implication potentielle de la protéine HSP90 dans le déterminisme du sexe chez Oreochromis niloticus.*”

Aida, T. (1921). On the Inheritance of Color in a Fresh-Water Fish, APLOCHEILUS LATIPES Temmick and Schlegel, with Special Reference to Sex-Linked Inheritance. *Genetics*, 6(6), 554–573. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245975> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1200522>

Azaza, M.S., Dhraïef, M. N., & Kraïem, M. . (2008). Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, 33(33), 98–105.

Baroiller, J. (1998). Le déterminisme environnemental du sexe chez les poissons gonochoriques. *La Pisciculture Française*, 133, 51–59. <https://doi.org/26>

Baroiller, J. F., & D’Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130(4), 399–409. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)

Baroiller, J. F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 153(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>

Baroiller, J. F., D’Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3(2–3), 118–135. <https://doi.org/10.1159/000223077>

Baroiller, J. F., Fostier, A., Cauty, C., Rognon, X., & Jalabert, B. (1996). *Significant effects of high temperatures on sex ratio of progenies from Oreochromis niloticus with sibling sexreversed male broodstock.*

Baroiller, J. F., & Guiguen, Y. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(1999), 910–931.

Baroiller J.F., Chourrout, D., Fostier, A., & Jalabert B. (1995). *Temperature and sex chromosomes govern sex ratio of the mouthbrooding cichlid fish Oreochromis niloticus* Baroiller. 273, 216–223.

Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Le Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J. H., ... Guiguen, Y. (2016). Foxl2 and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, 10(3), 111–129. <https://doi.org/10.1159/000447611>

Bezault, 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, 272(SUPPL. 1), S3–S16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.227>

Blazquez, M., Zanuri, S., Carrillo, M., Piferrer, F. (1998). Effects of Rearing Temperature on Sex Differentiation in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Blazquez, *Journal of Experimental Zoology*, 281, 207–216.

Brock, H. W., & Fisher, C. L. (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Developmental Dynamics*, 232(3), 633–655. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20298>

Brown, E. E., Baumann, H., & Conover, D. O. (2014). Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish ☆. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.07.009>

Chourrout, D. (1998). Revue sur le déterminisme génétique du sexe des poissons téléostéens. *Bulletin de La Société Zoologique de France*, 113, 123–144.

Cnaani, A., Lee, B. Y., Zilberman, N., Ozouf-Costaz, C., Hulata, G., Ron, M., ... Kocher, T. D. (2008). Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sexual Development*, 2(1), 43–54. <https://doi.org/10.1159/000117718>

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

Corona-Herrera, G. A., Arranz, S. E., Martínez-Palacios, C. A., Navarrete-Ramírez, P., Toledo-Cuevas, E. M., Valdez-Alarcón, J. J., & Martínez-Chávez, C. C. (2018). Experimental evidence of masculinization by continuous illumination in a temperature sex determination teleost (Atherinopsidae) model: is oxidative stress involved? *Journal of Fish Biology*, 93, 229–237. <https://doi.org/10.1111/jfb.13651>

Crespo, B., Gómez, A., Mazón, M. J., Carrillo, M., & Zanuy, S. (2013). Isolation and characterization of Ff1 and Gsdf family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males. *General and Comparative Endocrinology*, 191, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.010>

Cutting, A., Chue, J., & Smith, C. (2013). Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*, 242, 380–387. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199909\)216:1<1::AID-DVDY1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<1::AID-DVDY1>3.0.CO;2-T)

D’Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., & Baroiller, J. F. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59, 265–276. <https://doi.org/10.1002/mrd.1031>

Davey, A. J. H., & Jellyman, D. J. (2005). Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1–2), 37–52. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7431-x>

Degrange, E. (2019). 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*).

Dept., J. J. B. (1985). Sex determining mechanisms: An evolutionary perspective. 41, 1285–1296.

Despopoulos, A., & Silbernagl, S. (2003). Color Atlas of Physiology. In *Color Atlas of Physiology*. <https://doi.org/10.1055/b-005-148942>

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish : an overview of genetic , physiological , and environmental influences. *Aquaculture*, 208(1), 191–364.

Gennotte, V., Mafwila Kinkela, P., Ulysse, B., Akian Djétouan, D., Bere Sompagnimdi, F., Tomson, T., ... Rougeot, C. (2015). Brief exposure of embryos to steroids or aromatase inhibitor induces sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/jez.1893>

Guan, G., Kobayashi, T., & Nagahama, Y. (2000). Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(3), 662–666. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2840>

Guerrero-Estévez, S., & Norma, M. M. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101–121. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9123-4>

Guerrero III, R. D., & Shelton, W. L. (1974). An Aceto - Carmine Squash Method for Sexing Juvenile Fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1), 56–56.

Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>

Guo, Y., Cheng, H., Huang, X., Gao, S., Yu, H., & Zhou, R. (2005). Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.066>

Hake, L., & O'Connor, C. (2008). Genetic Mechanisms of Sex Determination. *Encyclopedia of Reproduction*, 1(1), 25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64460-4>

Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., ... Strußmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2955–2959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018392109>

Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 373–399. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L)

Heule, C., Salzburger, W., & Böhne, A. (2014). Genetics of sexual development: An evolutionary playground for fish. *Genetics*, 196(3), 579–591. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161158>

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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>

Karayücel, I., Penman, D., Karayücel, S., & McAndrew, B. (2003). Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 55(2), 114–122.

Kwon, Joon Yeong, McAndrew, Brendan, Penman, D. (2002). genetic sex determination temperature-dependent sex determination sexual differentiation *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 60(3), 625–636.

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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.006>

Lundgren, K., Zhang, H., Brekken, J., Huser, N., Powell, R. E., Timple, N., ... Burrows, F. J. (2009). BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 921–929. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0758>

Marchand, O., Govoroun, M., D’Cotta, H. D., McMeel, O. M., Lareyre, J.-J., Bernot, A., ... Guiguen, Y. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493, 180–187.

Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., ... Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>

Matsuda, M., & Sakaizumi, M. (2016). Evolution of the sex-determining gene in the teleostean genus *Oryzias*. *General and Comparative Endocrinology*, 239(December), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.10.004>

Mei, J., & Gui, J. (2015). Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Fish Biology and Biotechnology*, 58(2), 124–136. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4797-9>

Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N., & Cotto, J. J. (1997). The heat-shock response Regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 32, 17–29. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(98\)00029-8](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(98)00029-8)

Mukasekuru, M. (2016). Etude de l’effet parental des males xx obtenus par inversion sexuelle hormonale sur le sexe-ratio de leur descendance et leur potentiel d’inversion sexuelle a haute temperature.

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(88), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-88>

Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., ...

- Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, *191*(1), 163–170. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137497>
- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates-are sex steroids the key-factor? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *313* A(7), 381–398. <https://doi.org/10.1002/jez.616>
- Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., & Scharl, M. (2003). *Common Spontaneous Sex-Reversed XX males of the Medaka Oryzias latipes*. *251*(January), 245–251.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., ... Scharl, M. (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18), 11778–11783. <https://doi.org/10.1073/pnas.182314699>
- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447>
- Ospina-ALvarez, N., & Piferrer, F. (2008). Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLOSOne*, *3*(7), 8477–8477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>
- Otto, S. P., & Lenormand, T. (2002). Resolving the paradox of sex and recombination. *Nature Reviews Genetics*, *3*, 252–261. <https://doi.org/10.1038/nrg761>
- Ouedraogo, Christian, R. . (2014). Analyse comparative , physiologique et moléculaire des effets de trois traitements masculinisants chez le tilapia du Nil , *Oreochromis niloticus* , et recherche de marqueurs de traçabilité liés à ces approches To cite this version : HAL Id : tel-01334575.
- Patino, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strüssmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A., Goudie, C. A. 1996. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads : normal development end effects of temperature. *Journal of the Experimental Zoology*, *276* :, 209–218.
- Pavlidis, M., Koumoundouros, G., Steriotti, A., Somarakis, S., & Divanach, P. (2000). Evidence of Temperature-Dependent Sex Determination in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L .). *Journal of the Experimental Zoology*, *287*, 225–232.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, *197*, 229–281.
- Piferrer, F. (2013). Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Developmental Dynamics*, *242*(4), 360–370. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23924>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9445-4>

- Poonlaphdecha, S., Pepey, E., Canonne, M., de Verdal, H., Baroiller, J. F., & D’Cotta, H. (2013). Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and Comparative Endocrinology*, *193*, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.007>
- Pratt, W.B., Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, *18*, 306–360.
- Rhen, T., & Schroeder, A. (2010). Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sexual Development*, *4*(1–2), 16–28. <https://doi.org/10.1159/000282495>
- Rohner, N., Jarosz, D. F., Kowalko, J. E., Yoshizawa, M., William, R., Borowsky, R. L., ... Tabin, C. J. (2013). NIH Public Access. *Science*, *342*(6164), 1372–1375. <https://doi.org/10.1126/science.1240276>. Cryptic
- Romer, U., & Beisenherz, W. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, *48*(4), 714–725. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01467.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.001>
- Rubin, D. A. (1985). Effect of pH on Sex Ratio in Cichlids and a Poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 233–235. <https://doi.org/10.2307/1444818>
- Rutherford, S. L., & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, *396*(6709), 336–342. <https://doi.org/10.1038/24550>
- Santi, S. (2017). Analyse de l’effet de la température et du préférendum thermique sur les mécanismes du déterminisme sexuel et de la différenciation gonadique chez le poisson-chat Africain, *Clarias gariepinus*.
- Schmidt, J. (1919). Racial investigations. 3. Experiments with *Lebistes reticulatus* (Peters). *Laboratoire Carlsberg*, *14*, 1–8.
- Schneider, C., Sepp-Lorenzino, L., Nimmegern, E., Ouerfelli, O., Danishefsky, S., Rosen, N., & Hartl, F. U. (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*, 14536–14541. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14536>
- Tachibana, M. (2016). Epigenetics of sex determination in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, *15*, 59–67. <https://doi.org/10.1007/s12522-015-0223-7>
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin-I, T., ... Naruse, K. (2014). Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications*, *5*, 41–57. <https://doi.org/10.1038/ncomms5157>
- 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), 1–12.

- Tessema, M., Mueller-Belecke, A., & Hoerstgen-Schwark, G. (2006). Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, 258, 270–277.
- Toguyeni, A., * B. F., Fostier, A., Abucay, J., Mair, G., & Baroiller, J.-F. (2008). Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 207, 249–261. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Valdivia, K. (2013). Caractérisation du phénotype associé à la mutation masculinisante mal chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus*.
- Wang, Ya, Y., Sun, Xue, L., Zhu, Jie, J., Zhao, Y., Wang, H., Liu, Jun, H., & Ji, X. S. (2017). Epigenetic control of *cyp19a1a* expression is critical for high temperature induced Nile tilapia masculinization. *Journal of Thermal Biology*, 69, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.006>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). Nihms229948. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq>
- Webster, K. A., Schach, U., Ordaz, A., Steinfeld, J. S., Draper, B. W., & Siegfried, K. R. (2017). HHS Public Access. *Developmental Biology*, 422(1), 33–46. <https://doi.org/10.1038/nbt.3301.Mammalian>
- Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A. M., & Sinclair, A. H. (1999). Temperature-dependent sex determination in the american alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Developmental Dynamics*, 216, 411–419. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0177\(199912\)216:4/5<411::aid-dvdy9>3.3.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0177(199912)216:4/5<411::aid-dvdy9>3.3.co;2-p)
- Whitesell, L., Bagatell, R., & Falsey, R. (2003). The Stress Response: Implications for the Clinical Development of Hsp90 Inhibitors. *Current Cancer Drug Targets*, 3(5), 349–358. <https://doi.org/10.2174/1568009033481787>
- Wikondi, J. (2016). Effet parental des males xx obtenus par inversion thermique a haute temperature sur le sexe ratio de la descendance et leur potentiel d ' inversion.
- Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y. L., Titus, T. A., ... Postlethwait, J. H. (2014). Wild sex in zebrafish: Loss of the natural sex determinant in domesticated strains. In *Genetics* (Vol. 198).
- Wirth, D., Christians, E. S., Drion, P. V., Dessy-Doize, C., & Gustin, P. (2003). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70: Biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Annales de Medecine Veterinaire*, 147(2), 127–144.
- Yamamoto, T. O. (1969). 3 Sex Differentiation. *Fish Physiology*, 3(C), 117–175. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60113-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60113-2)
- Yamamoto Toki-O. (1954). Progeny of artificially induced sex-reversals of male genotype (xu) in the medaka (*oryzias latipes*) with special reference to yy-male. *Genetic*, 40, 406–419.
- Zhou, R., Cheng, H., Zhang, Q., Guo, Y., Cooper, R. K., & Tiersch, T. R. (2002). A review on SNPs and other types of molecular markers. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 34, 129–137. <https://doi.org/10.1051/gse>

Annexe

Annexe 1 : Description des familles des géniteurs utilisées pour produire les différentes descendance.

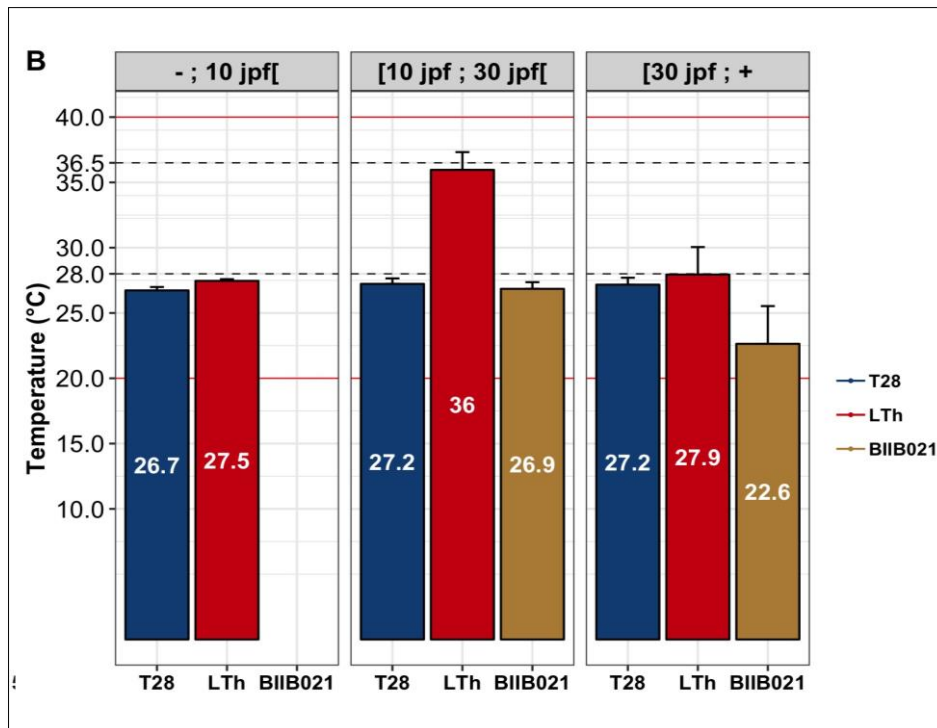
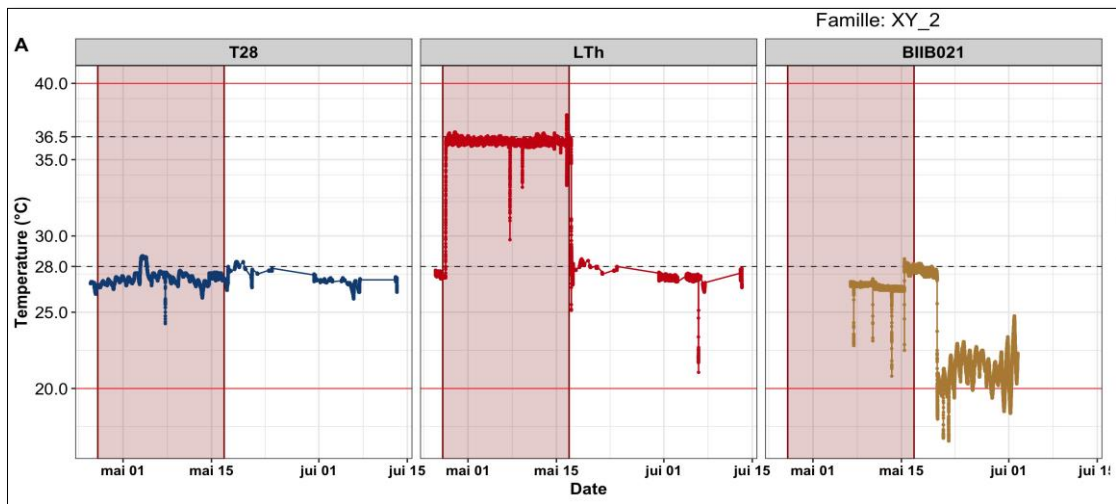
ID_Fam	ID_Mâle	Génotype Mâle	ID_Fam Mâle	ID_Lot Mâle	Traitement Mâle	Génération Mâle	ID_Femelle	Génotype Femelle	ID_Fam Femelle	ID_Lot Femelle	Génération Femelle
XY_1	6700000955 2570	YY	NA	NA	NA	2016	967000009843 926	XX	18-160915	18- 160915_Te moin 28	2015
XY_2	9670000099 26422	YY	NA	NA	NA	2016	967000009847 888	XX	18-160915	18- 160915_Te moin 28	2015
XY_3	9670000099 26336	YY	NA	NA	NA	2016	967000009798 695	XX	7-130815	7- 130815_Te moin 28	2015
XY_4	9670000099 26279	YY	NA	NA	NA	2016	967000009451 951	XX	9-210815	9- 210815_Te moin 28	2015
XX_5	9670000098 48135	XX	18- 160915	18- 160915_ mTesto	mTesto	2015	967000009843 977	XX	4-010815	4- 010815_Lth erm	2015
XX_6	9670000098 47910	XX	4-010815	4- 010815_ mTesto	mTesto	2015	967000009798 352	XX	17-160915	17- 160915_Te moin 28	2015
XX_7	9670000097 98294	XX	7-130815	7- 130815_ mTesto	mTesto	2015	967000009847 935	XX	18-160915	18- 160915_Te moin 28	2015

Annexe 2 : Identification des lots et devenir des descendance obtenues

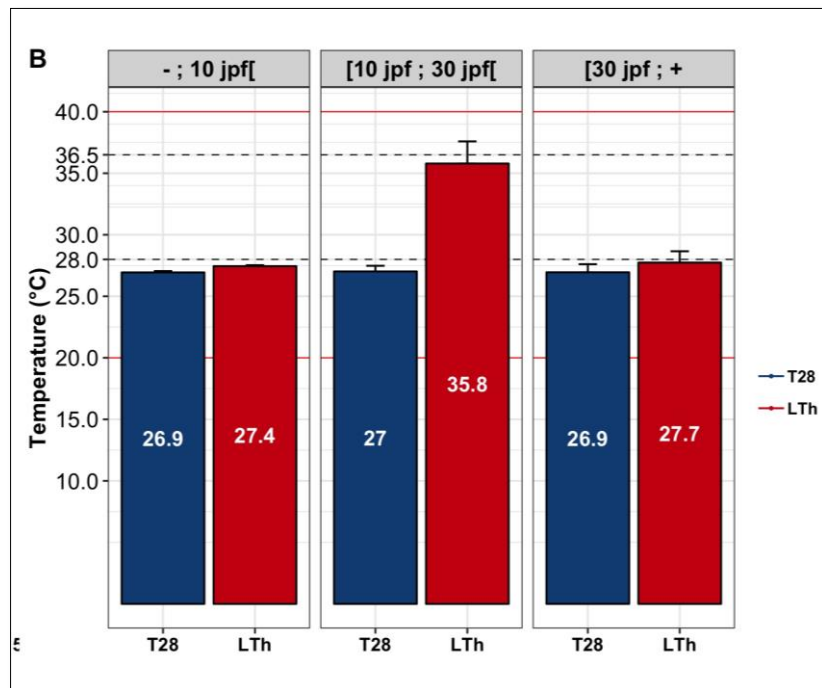
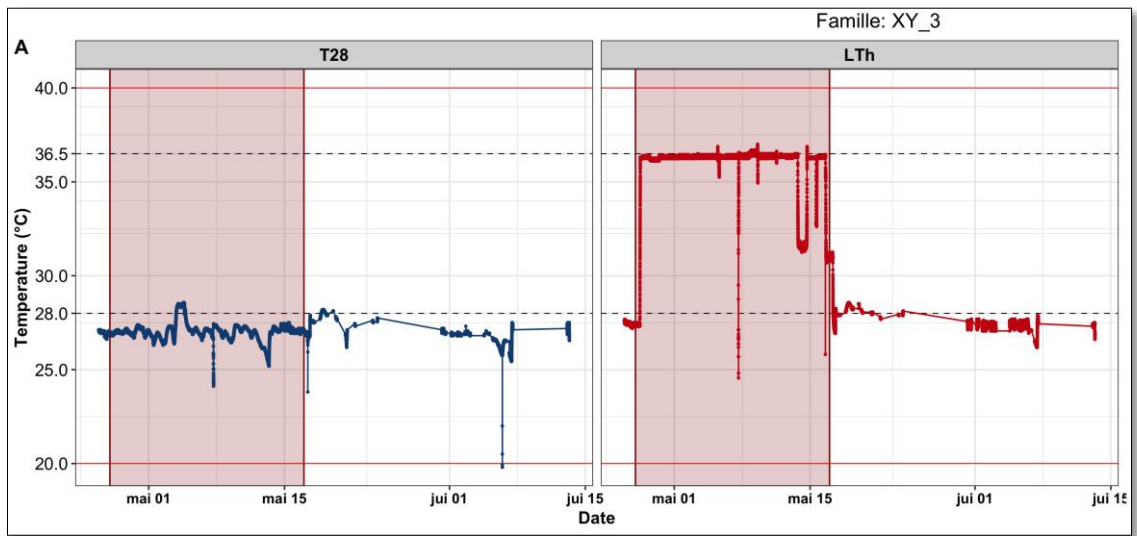
Id_lot	No reproduction	Génotype Mâle	Génotype Femelle	Génotype Descendance	Traitement
XY_1_T28	1	YY	XX	XY	Témoïn 28
XY_1_Ltherm	1	YY	XX	XY	Ltherm
XY_2_T28	2	YY	XX	XY	Témoïn 28
XY_2_Ltherm	2	YY	XX	XY	Ltherm
XY_2_BIIB021 (70 mg/kg)	2	YY	XX	XY	BIIB021 (70 mg/kg)
XY_3_T28	3	YY	XX	XY	Témoïn 28
XY_3_Ltherm	3	YY	XX	XY	Ltherm
XY_4_T28	4	YY	XX	XY	Témoïn 28
XY_4_Ltherm	4	YY	XX	XY	Ltherm
XY_4_BIIB021 (70 mg/kg)	4	YY	XX	XY	BIIB021 (70 mg/kg)
XX_5_T28	5	XX	XX	XX	Témoïn 28
XX_5_Ltherm	5	XX	XX	XX	Ltherm
XX_5_BIIB021 (70 mg/kg)	5	XX	XX	XX	BIIB021 (70 mg/kg)
XX_6_T28	6	XX	XX	XX	Témoïn 28
XX_6_Ltherm	6	XX	XX	XX	Ltherm
XX_7_T28	7	XX	XX	XX	Témoïn 28
XX_7_Ltherm	7	XX	XX	XX	Ltherm
XX_7_BIIB021 (70 mg/kg)	7	XX	XX	XX	BIIB021 (70 mg/kg)

Annexe 3 A et B : Courbe de variations saisonnières des températures de l'eau d'élevage par famille et selon le traitement

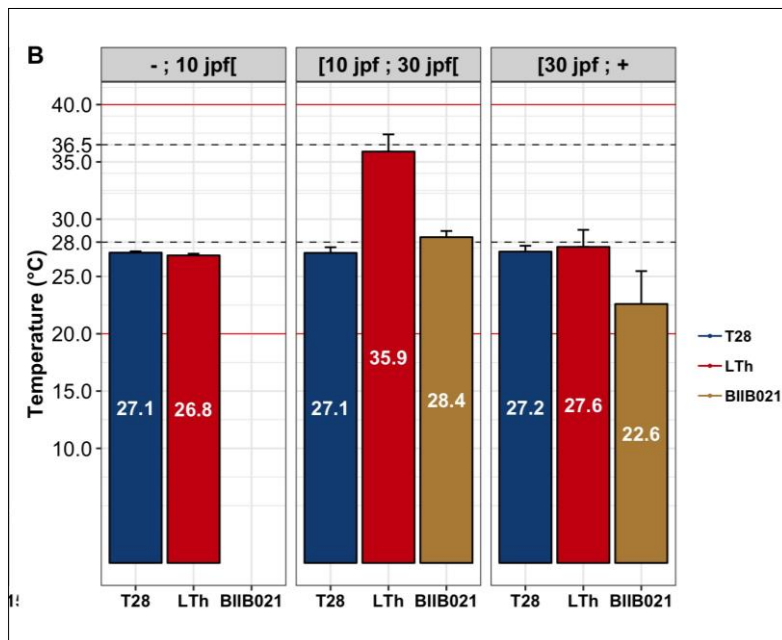
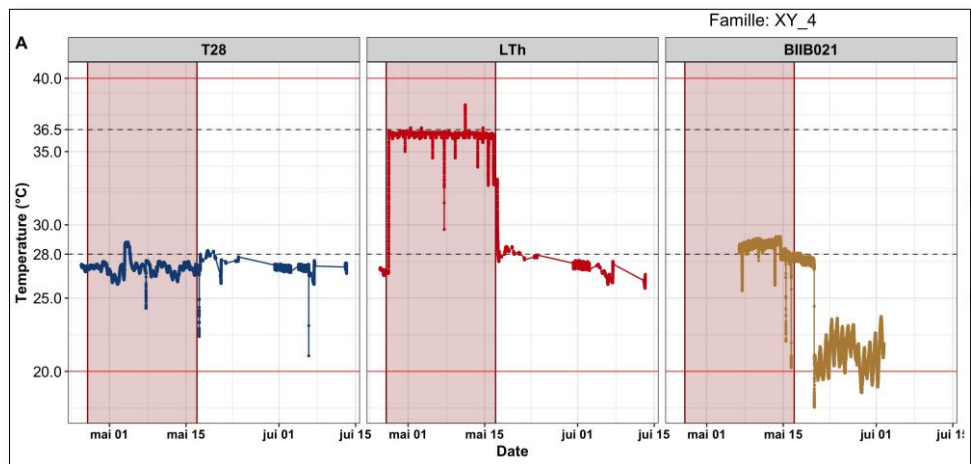
Annexe 3.1



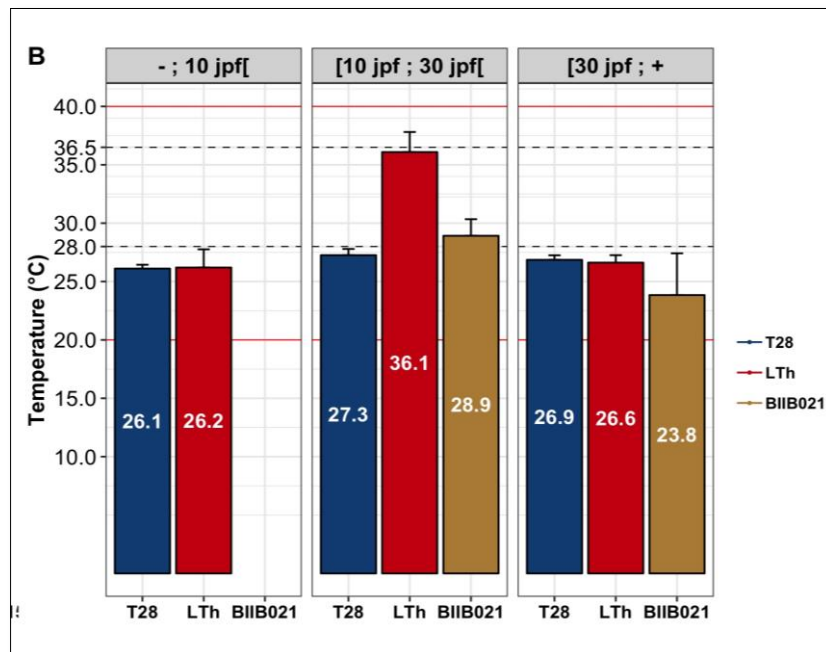
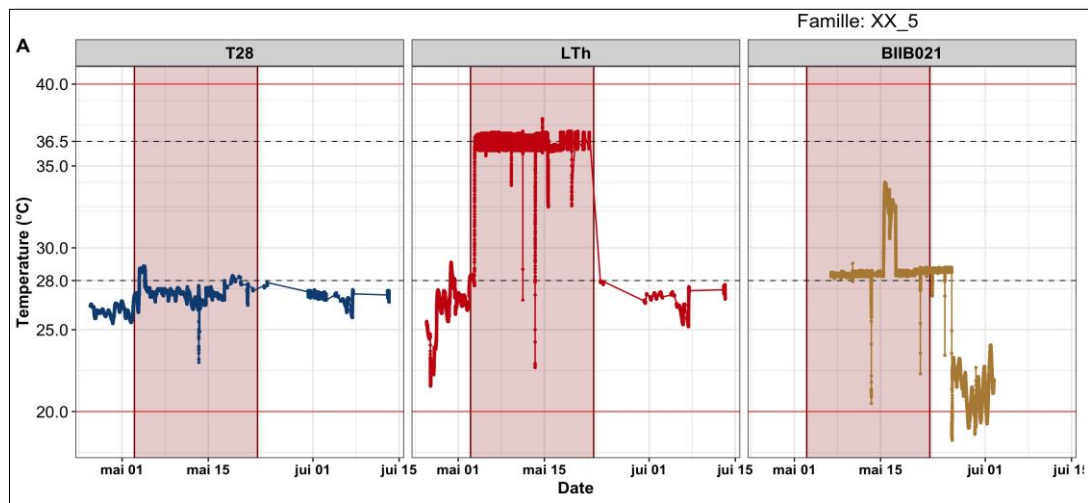
Annexe 3.2



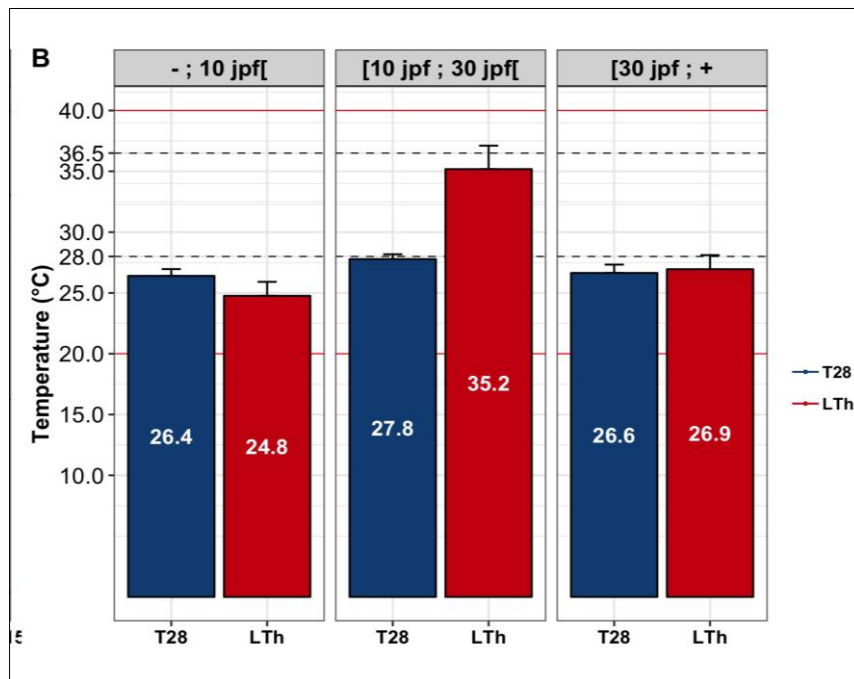
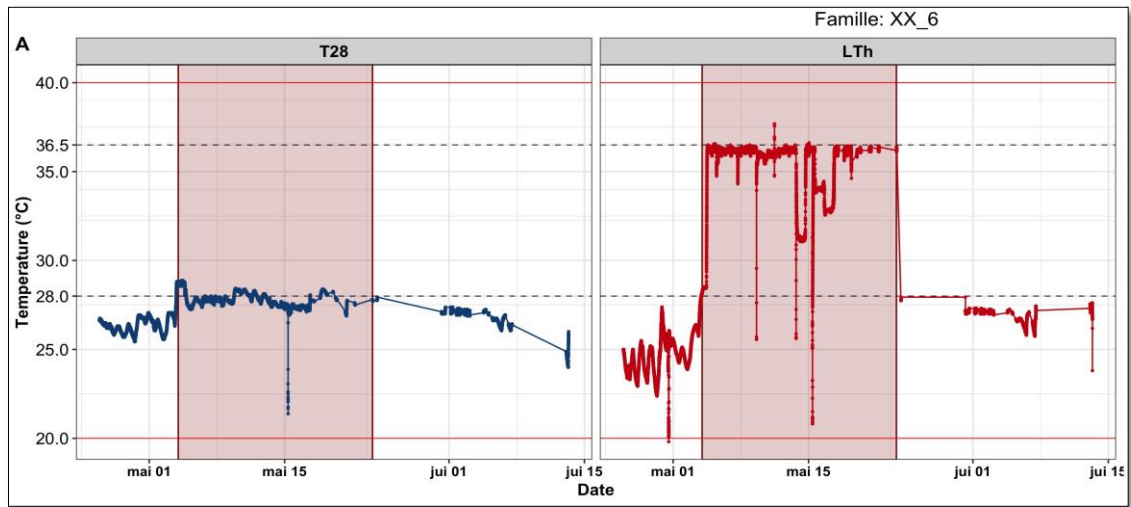
Annexe 3.3



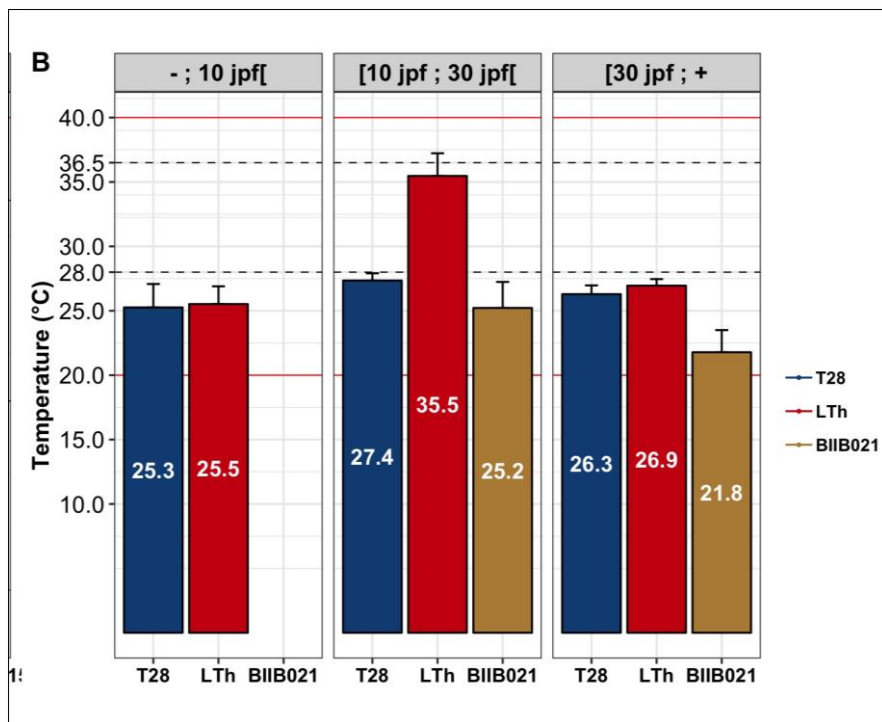
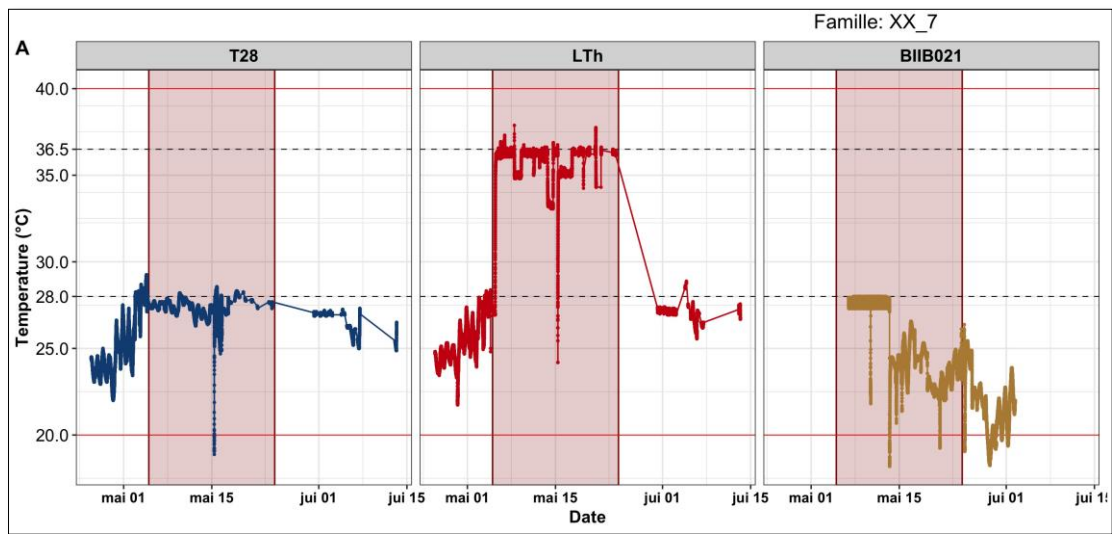
Annexe 3.4



Annexe 3.5



Annexe 3.6



Annexe 4 : Paramètres physico-chimique de l'eau d'élevage des alevins de tilapia du Nil en aquarium de 50l

Paramètres	Moyenne	Ecart-type	Unités
Oxygène	7.35	± 1.14	mg/l
NH ₄ ⁺	0.49	± 0.19	mg/l
NO ₂ ⁻	0.15	± 0.09	mg/l

Annexe 5 : Evolution du coefficient d'ajustement en fonction des jours post fécondation

Jpf	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Coefficient	15	15	15	15	20	25	30	35	45	55	65	75	85	85	85	85	105	115

Annexe 6: Valeur nutritives des aliments utilisés en fonction de l'âge des alevins.

Age	10-30 jpf	30-40jpf	40-90 jpf
Aliment	Nutra HP	Coppens	Coppens
Granulométrie (mm)	0.5 - 0.7	0.8 - 1.2	1.2 - 1.5
Proteines (%)	57	46	46
Lipides (%)	17	10	10
Glucides (%)	10	9.2	9.5

Annexe 7: Protocole purification des ARN par précipitation au chlorure de Lithium

1	Redilution des échantillons avec de l'eau nuclease free (+ 80 µl pour les échantillons de gonades et + 70 µl pour les échantillons de têtes)
2	Ajout de 33,3 µl d'une solution de chlorure de lithium (LiCl) nuclease free concentrée à 7,5M pour obtenir une concentration finale de 2,5M
3	Homogénéisation au vortex
4	Incubation 30 minutes à -20°C
5	Centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à vitesse maximal (> 13 000 rpm)
6	Aspirer et jeter le surnageant
7	Ajout de 250 µl d'éthanol 70% nuclease free pour nettoyer le culot d'ARN
8	Incubation 2 minutes à RT

Annexe 8 : Liste des gènes d'intérêt étudiés

Gene	Fonction	Taille amplicon	Forward	Reverse
<i>ef1-a</i>	Gene Normalisateur	276	GATTGGCGGTATCGG AACTG	AGGATGATGACCTGAGC GTTG
<i>gadp h</i>	Gene Normalisateur	205	GATAATGGCAAACCTT GTCGTCG	ACATTGGAGCATCGGGT GAG
<i>dmrt 1</i>	Voie mâle	104	CTGACCTCCTGCTGGA AACC	ATGAGGCATCTGGTACT GCG
<i>foxl2</i>	Voie Femelle	110	CACGACCAAGGAGAA AGAGC	TGGCAATGAGAGCGAC ATAG
<i>hsp9 0</i>	Voie HSPs	394	TTCCTCAAGGACTAT GTCTCTCG	CCATCCATAGGTGCTGG TGACAAT
<i>hsp2 7</i>	Voie HSPs	178	AATCTCGGGTAAGCA CGAGG	TTCTGAGTGCTCGATGG CTG
<i>bag3</i>	Voie HSPs	135	ACACGACACGAAAAA GGTTCG	ATGGGAACATAACCTGG GCG

Annexe 9 : Protocole de préparation de tube pour la synthèse d'ADNc à partir d'ARN

Composants	Volume par réaction (µl)	Témoin négatif (µl)
Pour 1000 ng de RNA, 5x script mix de réaction	4	4
Transcriptase inverse script	1	0
Eau RNase-free	Variable	Variable
ARN	Variable	Variable
Volume total par tube	20	20

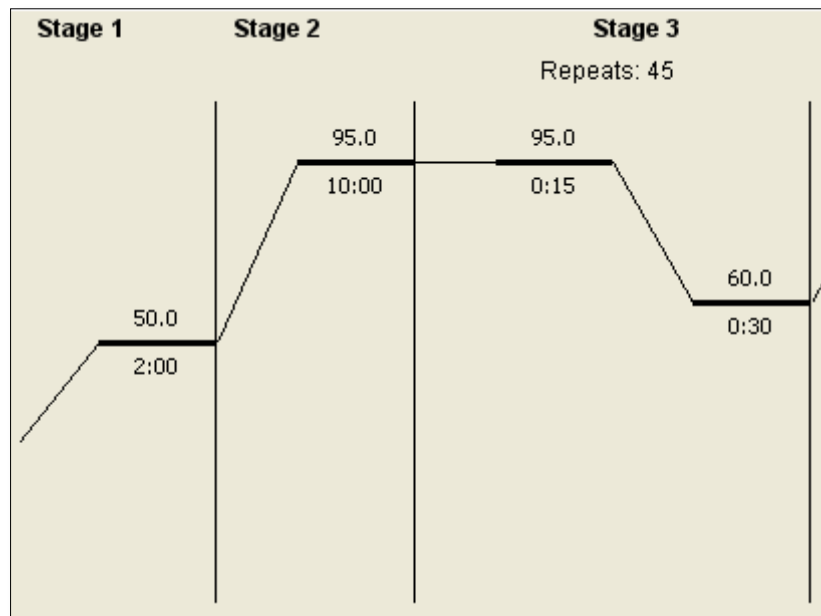
Annexe 10: Mix primers qPCR

Reactifs	Volume (µl) pour une concentration finale dans les puits de 150 nM
H ₂ O bidistillée	495
Reverse	2,5
Forward	2,5
Volume total	495
Volume par puit	4,5

Annexe 11: Mix cDNA qPCR

Réactifs	Volume (µl) pour 28 puits
H ₂ O bidistillée	64
cDNA	20
FastStart Universal SYBR Green Master	210
Volume total	294
Volume par puit	10,5

Annexe 12: Programme suivi par le thermocycleur pour la réalisation du RT-qPCR



Annexe 13: Stade de sexage des différentes descendance et nombre de poissons sexés par lot.

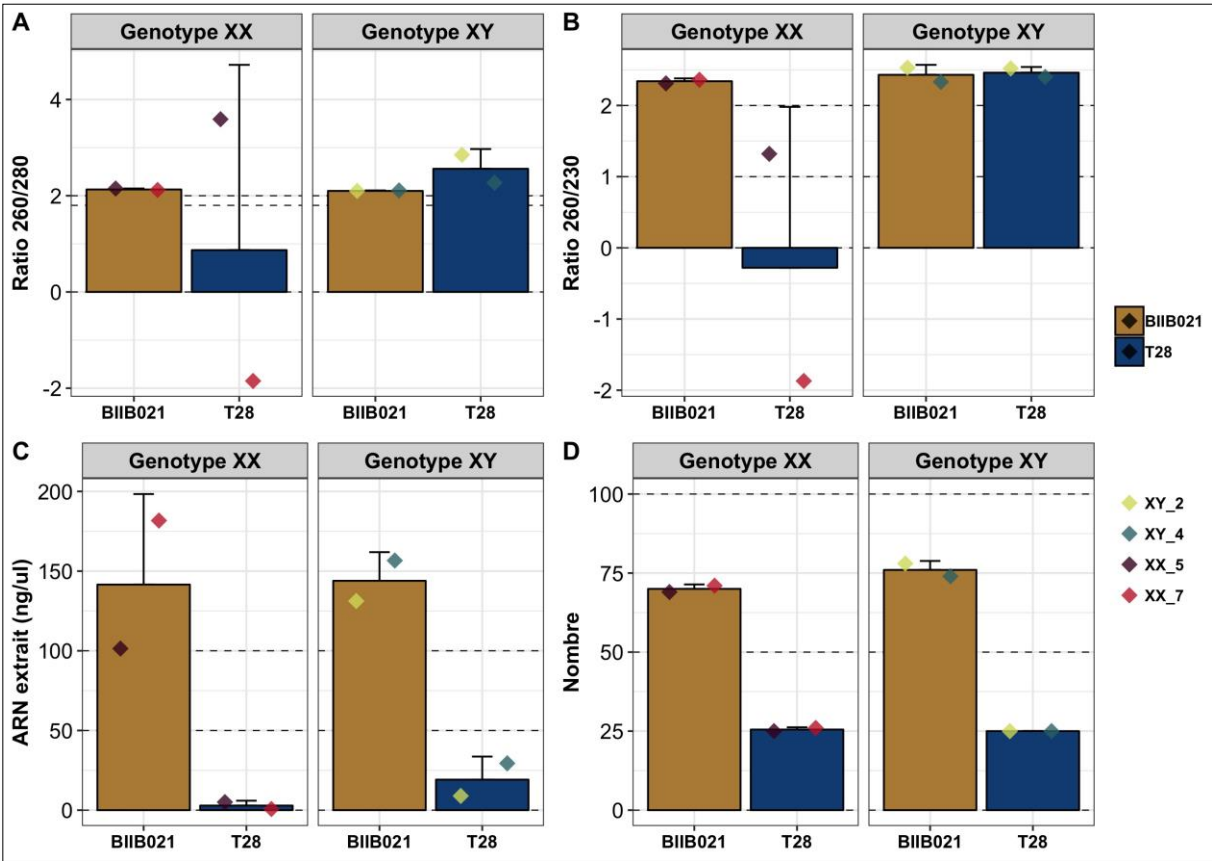
Lth=Traitement thermique tardif (Température 36,5°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

T28=Témoin 28 (Température normal 28°C appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

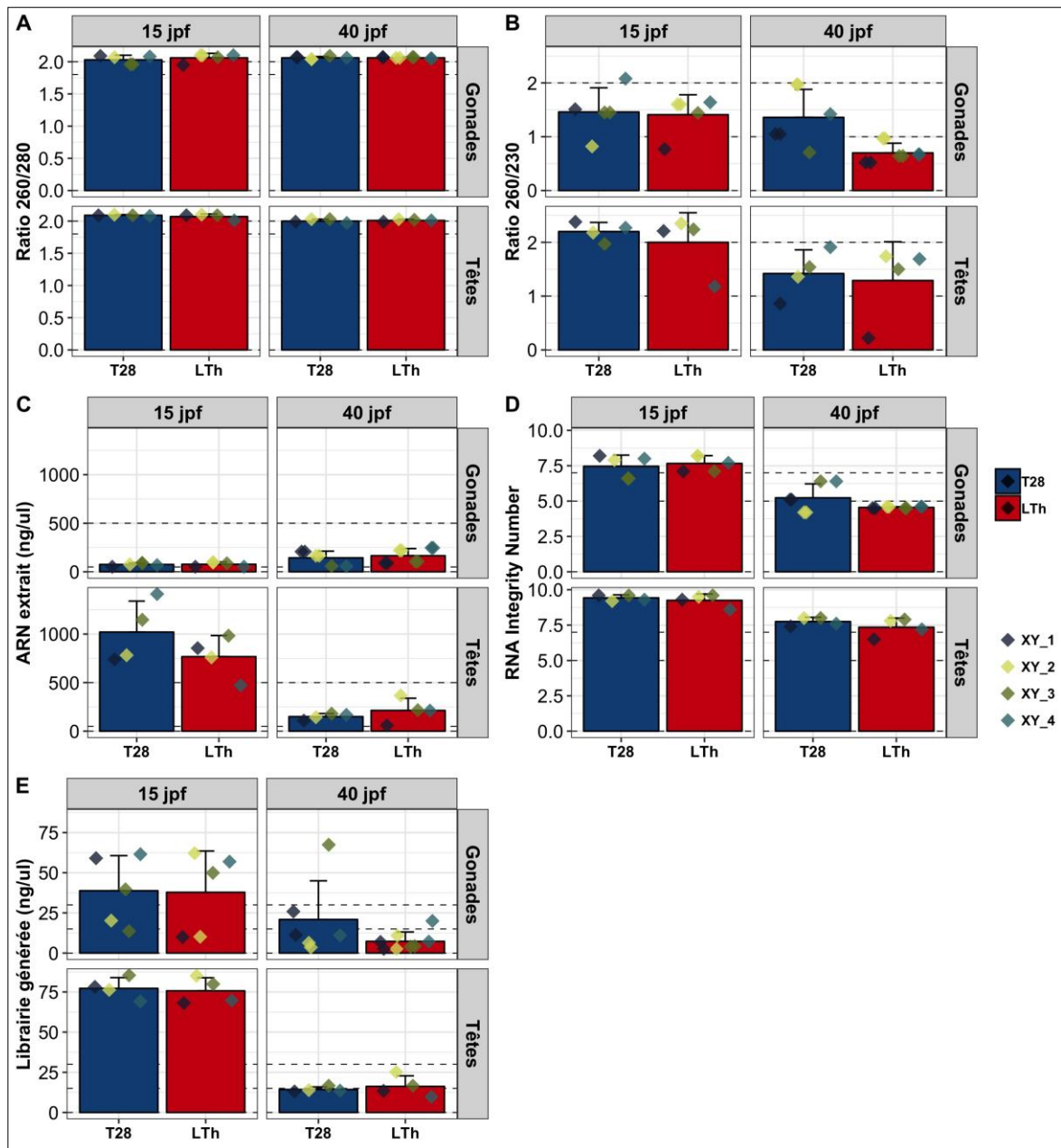
BIIB021= Traitement à l'inhibiteur de HSP90 (BIIB021) appliquée aux alevins entre 10 à 30 jpf

Descendance	Lot	Nombre poissons	Stade (jpf)
XY_1	LTh	33	84
XY_1	T28	62	84
XY_2	BIIB021	10	83
XY_2	LTh	54	83
XY_2	T28	74	83
XY_3	LTh	27	83
XY_3	T28	48	83
XY_4	BIIB021	24	83
XY_4	LTh	56	83
XY_4	T28	74	83
XX_5	BIIB021	33	78
XX_5	LTh	39	78
XX_5	T28	70	78
XX_6	LTh	43	77
XX_6	T28	62	77
XX_7	BIIB021	54	76
XX_7	LTh	59	76
XX_7	T28	72	76

Annexe 14 : Pureté de l'ARN et sa qualité d'extraction pour la réalisation de la qPCR



Annexe 15 : Qualité des échantillons d'ARNm pour la réalisation du RNAseq



Annexe 16 : Volcanoplot permettant de comparer l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle et le stress thermique, dans les des tissus de gonades et de têtes à 15 et 40 jpf chez le tilapia du Nil (résultat étude réalisé par Nivelles Renaud).

