



UNIVERSITÉ DE LA POLYNÉSIE FRANÇAISE

École doctorale du Pacifique (ED469)

Ifremer- UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Vaihiti TEANINIURAITEMOANA

Pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de la Polynésie française

Discipline : Biologie des populations et écologie

Spécialité : Génomique des organismes marins

Reproduction de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* : Étude des déterminants du sexe femelle chez l'adulte

Soutenue le **8 Décembre 2014** à l'Université de la Polynésie française

MEMBRES DU JURY



Anne-Sophie MARTINEZ, Maître de Conférences, Université de Caen Basse-Normandie *Rapporteur*

Yann GUIGUEN, Directeur de Recherche, INRA *Rapporteur*

Jean-Claude GAERTNER, Directeur de Recherche, IRD *Examinateur*

Yannick GUEGUEN, Cadre de Recherche, Ifremer *Examinateur*

Gilles LE MOULLAC, Cadre de Recherche, Ifremer *Co-Directeur*

Nabila GAERTNER-MAZOUNI, Professeur, Université de la Polynésie française *Co-Directrice*

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein de l’École Doctorale du Pacifique (ED469) dans l’Unité Mixte de Recherche Ecosystèmes Insulaires Océaniens (UMR 241 EIO) sous la co-direction du Professeur Nabila GAERTNER-MAZOUNI (UMR 241 EIO, Université de la Polynésie française) et du Docteur Gilles LE MOULLAC (UMR 241 EIO, Ifremer Tahiti); et sous l’encadrement scientifique du Docteur Arnaud HUVET (UMR 6539 LEMAR, Ifremer Brest).

Cette thèse a bénéficié d’un co-financement de la part de l’Institut français de recherche pour l’exploitation de la mer (Ifremer) et de la part de la Délégation à la Recherche de Polynésie française.

À l’Ifremer, ces travaux de recherche s’intègrent au sein du projet PJ0707 « Développement durable de la perliculture » et ont été financés d’une part, par l’ANR-AGROBIOSPHERE dans le cadre du programme de recherche Polyperl (Gestion intégrée et adaptation de la perliculture en Polynésie française dans le contexte du changement global, 2012-2015) et d’autre part, par le contrat de projet État-Pays Biodiperl (Préservation de la biodiversité des stocks d’huîtres perlières *P. margaritifera* en Polynésie française pour une exploitation durable de la ressource en perliculture, 2012-2013).

Les travaux ont été réalisés dans plusieurs laboratoires :

À l’Ifremer :

- Dans le laboratoire Amélioration Génétique, Ecologie et Ecophysiologie (AGEE) et le laboratoire Génomique Marine, Santé Animale (GMSA) au Centre du Pacifique (Tahiti, Polynésie française).
- Dans le laboratoire Physiologie des Invertébrés (LPI) au Centre de Bretagne (Brest, France).

À l’INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) :

- Dans les laboratoires de la plateforme Génome et Transcriptome de GenoToul (GeT ; Toulouse, France).
- Dans les laboratoires de la plateforme Sigenae (Information System for Analysis of Breeding Animals Genome ; Toulouse, France).



Remerciements

Au cours de ces trois années de thèse, nombreuses sont les personnes qui m'ont accompagné dans cette grande aventure que ce soit au plan professionnel et personnel. Ainsi, dans ces quelques lignes qui suivent, je tiens à leur adresser mes remerciements les plus sincères.

Je remercie en premier lieu l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie, avec le plus grand respect, Anne-Sophie Martinez et Yann Guiguen pour avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je les remercie ainsi autant pour leurs conseils que pour leurs critiques très constructives. Je remercie également Jean-Claude Gaertner d'avoir bien voulu intégrer ce jury en tant qu'examinateur.

En second lieu, mes remerciements vont particulièrement à mes encadrants de thèse présents tout au long de ces travaux et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.

Je remercie Nabila Gaertner-Mazouni non seulement pour la co-direction de cette thèse, mais aussi pour m'avoir consacré son temps et son soutien notamment durant la dernière ligne droite.

Je remercie de tout cœur Gilles Le Moullac, pour tout ce qu'il a réalisé pour moi. Merci de m'avoir fait confiance depuis le début et de m'avoir donné la chance de mener ce projet dans les meilleures conditions. Merci pour ton soutien professionnel et moral à chaque instant et ce jusqu'à la fin. Je te remercie aussi pour ta patience qui je pense plus d'une fois a été mise à l'épreuve.

Un immense merci également à Arnaud Huvet. Je te remercie pour ta grande implication dans ces travaux, tes conseils, ton soutien, ta confiance et ta disponibilité qui ont énormément compté pour moi et que tu as su me donner malgré les 20 000 km qui nous séparaient. Cela a été un réel plaisir d'être sous ton encadrement. J'espère que nos chemins se recroiseront, ici à Tahiti ... ou bien ailleurs.

Enfin par la même occasion, je souhaite remercier Yannick Gueguen qui a toute sa place dans l'encadrement de cette thèse. Merci pour tes encouragements, tes conseils et tes critiques qui m'ont fortement aidé à avancer dans la bonne direction. Merci aussi pour tout le temps que tu m'as consacré lors de ces nombreuses réunions d'avancement et merci d'avoir fait en sorte que cette thèse se déroule sans obstacle. J'ai appris qu'effectivement si on le veut « Tout est possible ! ».

Par ailleurs, au-delà de mes encadrants de thèse, j'ai eu l'honneur de travailler ou tout simplement de partager des moments uniques avec des personnes formidables contribuant ainsi d'une façon ou d'une autre à l'accomplissement de cette aventure.

Au Centre Ifremer de Tahiti...

Je remercie tout d'abord, Marc Taquet, directeur du Centre Ifremer de Tahiti durant la majeure partie de cette thèse, pour m'avoir accueilli au COP. Je le remercie aussi avec Patrick Vidal, actuel secrétaire général du Centre, d'avoir accepté de me loger les derniers mois de cette thèse.

Un immense merci à toute l'équipe AGEE : Maya, Nono, Roger, Manaarii, les deux Vincent, Sophie, Alain, Claude, Pierre et Chin pour leur aide dans ces travaux. Je remercie particulièrement Maya, Nono, Roger et Vincent pour toutes ces discussions et ses repas, à base de *uru* et *punu pua'atoro*, organisés au « spot ». Je te remercie également Maya pour toutes les sessions pêche.

Je remercie toute l'équipe GSMA, Denis, Julie, Péva et Corinne, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et d'échanger notamment pour les manips de bio mol. J'adresse un merci particulier à Péva qui a réalisé minutieusement toutes mes coupes histologiques sans jamais rouspéter une seule fois, et pourtant il y en avait à faire.

Je n'oublie pas bien sûr de remercier l'équipe IMA du Centre (Hermann, René « le gentil », Kaly, Alexandre, Johan, Clément, Loic, Pierre et Marcel), l'équipe Crevette (René « le méchant », Robert, Gérard et Jeannot) et ainsi que toute l'équipe UAF (Mathilde, Brigitte, Miri, Heipua, Simone, Destreméau et Rachel). Merci Hermann pour nous avoir initié au Va'a et de nous avoir permis de participer au Heiva, c'était une expérience inoubliable ! Merci Mathilde pour ces petites discussions très sympathiques et de m'avoir accueilli chez toi.

En restant au COP, je pense aussi à tous les gardiens. Un très grand merci à Gérard, Tamu, Jean-Yves, Stephen, Joël et Patrice. Merci de m'avoir tenu compagnie dans ces moments de solitude de travail, le week-end ou encore tard dans la soirée.

Merci à tous pour votre accueil si chaleureux !

Au Centre Ifremer de Brest ...

Certains de ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire des Invertébrés Marins du Centre Ifremer de Brest. Je remercie Pierre Boudry pour m'y avoir accueilli. Je remercie bien évidemment toute l'équipe pour m'avoir reçu si chaleureusement et pour m'avoir fait sentir comme à la maison. Un grand merci à Jean-Yves pour m'avoir aidé dans les extractions et pour m'avoir initié au BioAnalyzer. Je remercie Charlotte pour m'avoir fait découvrir les analyses protéiques. Oui je sais nos blots étaient sublimes ! Et un grand merci à Éric, Joana, Virgile, Katia, Coraline et Florian pour m'avoir fait découvrir la vie nocturne des djeuns de Brest !

Par ailleurs, je souhaite remercier les filles de la cellule bioinformatique, Laure et Fanny, pour leur aide précieuse concernant les données RNAseq. Merci Laure pour ta super formation bioinfo qui a bien enrichi mes domaines de compétence.

A l'INRA de Toulouse...

Je remercie Emeline Lhuillier pour m'avoir accueilli au sein de la plateforme GeT de Toulouse et pour m'avoir formé à la préparation des librairies.

Je remercie également Christophe Klopp et Cédric Cabrau pour leur aide inestimable concernant les analyses bioinformatiques et de ces nombreux échanges par mail plus que très utiles.

Je tiens à remercier Tea Frogier et Jean-Yves Meyer de la délégation à la recherche de Polynésie française, pour leur intérêt porté à cette thèse et pour leur soutien lors des diverses présentations orales que ce soit aux doctoriales ou en congrès.

Bien sûr je ne peux oublier toute la Clic de l'Ifremer, stagiaires, doctorants, VSC, CVD ou autres de passage ou non durant ces trois années. Plus qu'un immense merci à vous tous ! Carole & Jonathan, Bénédicte, Héloïse, Émilie, Oihana, Kévin, Adrien & Hélène, Damien, Yann & Lorraine, Lore, Agnès & Tom, Christophe, Solène & Rémy, Sylvain, Maxime, Juliette, Heitini etc... Les pauses café et les soirées en votre compagnie ont été des moments forts que j'appréciais énormément. Cela va bien me manquer ! Pour ceux qui sont encore là, je compte sur vous pour prendre soin de Coco !

Je souhaite par la même occasion remercier tout particulièrement le trio Carole & Jonathan et Bénédicte. Merci pour cette nouvelle amitié naissante et qui je l'espère grandira au cours de ces longues prochaines années.

J'ai une pensée spéciale pour Gérard, Arnold et Gloria. Merci pour ces bons *ahima'a* que vous nous avez préparé et toujours avec grand plaisir.

À mes amis de toujours qui se reconnaîtront, merci de votre présence parfois même malgré la distance. *Loin des yeux mais toujours près du cœur*. Vous occuperez toujours une place à part dans ma vie.

À toute ma famille, merci pour m'avoir toujours soutenu et encouragé quelque soit mes choix. Merci à mes parents et à mes grands-parents de nous avoir donné tant d'amour. Merci à ma sœur Vaiteani et à mon frère Vaitahi. Je vous aime fort !

À toi Marcel, merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi. Merci pour ton soutien, ton réconfort et surtout pour ta patience durant toutes ces années depuis le début de notre voyage. Merci tout simplement pour l'amour que tu me donnes chaque jour.

Bonne lecture ...

Table des matières

Avant-propos	2
Remerciements	3
Liste des figures & tableaux	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	10
1. Les enjeux du contrôle du sexe en aquaculture	11
2. Le déterminisme du sexe au sein du règne animal	12
2.1. Une diversité de systèmes de déterminisme du sexe	13
2.2. Une diversité de gènes mis en jeux	19
2.3. Le déterminisme du sexe chez les mollusques	23
3. Approches génomiques chez les bivalves marins : contribution à l'étude de la reproduction	25
4. Objectifs et démarche de la thèse	28
Le modèle biologique : L'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i>.....	28
1. Importance du modèle	31
2. Systématique et répartition	32
3. Morphologie et anatomie.....	34
3.1. La coquille	34
3.2. L'animal	34
4. Cycle de développement	36
5. Nutrition	37
6. Reproduction et gaméto-génèse.....	39
PARTIE I De l'analyse transcriptomique de la gonade à l'identification de gènes biomarqueurs du sexe	42
Introduction	43
Chapitre 1: Gonad transcriptome analysis of pearl oyster <i>Pinctada margaritifera</i> : Identification of potential sex differentiation and sex determining genes	45
1. Background	46
2. Methods.....	48
3. Results	53
4. Discussion	64
5. Conclusion.....	71
Chapitre 2: Molecular signatures of the female sexual pathway in the pearl oyster <i>Pinctada margaritifera</i>	73
1. Introduction	74
2. Materials and Methods	75

3. Results	78
4. Discussion	84
5. Conclusion.....	88
Synthèse	90
PARTIE II Contrôle de la différenciation sexuelle de l'huître perlière par des facteurs environnementaux et hormonaux anthropiques. Vers l'expression du potentiel féminin ?	92
Introduction	93
Chapitre 3: Effect of temperature, food availability and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster <i>Pinctada margaritifera</i>	95
1. Introduction	96
2. Materials and Methods	98
3. Results	101
4. Discussion	106
5. Conclusion.....	109
Synthèse	111
SYNTÈSE GÉNÉRALE & PERSPECTIVES.....	113
1. Identification de gènes acteurs dans la différenciation sexuelle.....	115
1.1. Approche candidat.....	115
1.2. Approche différentielle.....	115
2. Facteurs contrôlant la différenciation sexuelle chez <i>P. margaritifera</i>	117
2.1. Facteurs environnementaux.....	117
2.2. Facteurs hormonaux	117
2.3. Facteurs génétiques	118
3. Application à la perliculture	119
3.1. Maturation et synchronisation des géniteurs	119
3.2. Gestion du sex-ratio des géniteurs.....	120
4. Conclusion.....	121
Bibliographie.....	122

Liste des figures & tableaux

Liste des figures

Figure 1 Diversité des systèmes de déterminisme du sexe au sein du règne animal.....	12
Figure 2 Schémas de quelques mécanismes de détermination sexuelle.....	17
Figure 3 Voie du déterminisme du sexe chez 3 organismes modèles : le nématode <i>C. elegans</i> , la drosophile <i>D. melanogaster</i> et la souris <i>M. musculus</i>	20
Figure 4 Distribution des modes de reproduction chez les mollusques.....	24
Figure 5 L'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i>	33
Figure 6 Carte de la répartition mondiale de <i>P. margaritifera</i>	33
Figure 7 Coquille de l'huître perlière <i>P. margaritifera</i>	34
Figure 8 Anatomie de l'huître perlière <i>P. margaritifera</i> (valve droite).....	35
Figure 9 Coupes transversales de la masse viscérale chez <i>P. margaritifera</i>	36
Figure 10 Cycle de développement de l'huître perlière <i>P. margaritifera</i>	37
Figure 11 Nutrition de l'huître perlière <i>P. margaritifera</i>	38
Figure 12 Proportion des huîtres perlières de sexe femelle (<i>Pinctada margaritifera</i>) en fonction de l'âge et de la taille	39
Figure 13 Stades de développement de la gonade de <i>P. margaritifera</i> décrits par Thielley (1993).	40
Figure 14 Histological features of the ten categories of <i>P. margaritifera</i> gonad.....	49
Figure 15 Classification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) including indels from the <i>P. margaritifera</i> gonad transcriptome.	54
Figure 16 Gene Ontology (GO) annotation of <i>P. margaritifera</i> contigs.....	55
Figure 17 Sequence analysis of four sex determination/differentiation-related genes in <i>P. margaritifera</i>	59
Figure 18 Expression pattern analysis in gonad samples of <i>P. margaritifera</i>	60
Figure 19 Heat map of contigs differentially expressed between the ten different gonadic categories of <i>P. margaritifera</i>	64
Figure 20 Highlighted expression profiles of eight reproductive genes in <i>P. margaritifera</i> gonad sample.....	66
Figure 21 Validation of the RNAseq quantification data using q-RT-PCR	67
Figure 22 Hierarchical clustering using Spearman's correlation on RNAseq gonad samples.....	78
Figure 23 The histo-molecular model of the reproduction of <i>P. margaritifera</i>	79
Figure 24 RNAseq expression of the nine selected genes of the female sexual pathway of <i>P. margaritifera</i>	81
Figure 25 Relative expression of the nine selected marker genes of the female pathway of <i>P. margaritifera</i>	82
Figure 26 Hierarchical clustering using Spearman's correlation on gonad samples.....	83
Figure 27 Multivariate regression tree of oyster sexual pathway categories.....	84
Figure 28 Frequency of maturity stages observed by histology in the environmental experiment (Exp1).....	102

Figure 29 Frequency of maturity stages observed by histology in the hormonal experiment (Exp2).	103
Figure 30 Relative expression profiles (real time PCR) of <i>pmarg-foxl2</i> (A), <i>pmarg-c43476</i> (B), <i>pmarg-c45042</i> (C), <i>pmarg-c19309</i> (D), <i>pmarg-c54338</i> (E), <i>vit-6</i> (F), <i>zglp1</i> (G), <i>pmarg-dmrt</i> (H), and <i>pmarg-fem1-like</i> (I) in pearl oysters on male and female sexual pathways.	105
Figure 31 Le déterminisme du sexe de l'huître perlière <i>P. margaritifera</i>	119

Liste des tableaux

Tableau 1 Les gènes déterminants majeurs identifiés chez les vertébrés et invertébrés et leur paralogue.....	21
Table 2 Summary statistics of <i>P. margaritifera</i> gonad transcriptome sequencing, assembly and annotation.....	53
Table 3 Summary of simple sequence repeat (SSR) types in <i>P. margaritifera</i> gonad transcriptome... ..	54
Table 4 List of the candidate marker genes of the female sexual pathway of <i>P. margaritifera</i>	80
Table 5 Results of the predictive MRT model on RNAseq sample (data from Teaniniuraitemoana et al. 2014).....	85
Table 6 Primers used for real time PCR.....	101
Table 7 Numbers of oysters with gonads classed as male, female, undetermined and inversion in each treatment of the two experiments.	103
Table 8 Number of pearl oysters determined as being on the male or female sexual pathway using the predictive 3-gene-pair expression ratio model of the sexual pathway proposed in Teaniniuraitemoana et al. (submitted).....	104

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Les enjeux du contrôle du sexe en aquaculture

En pisciculture, les principaux problèmes auxquels peuvent être confrontés les poissons en conditions de captivité sont : la masculinisation, l'existence d'un dimorphisme sexuel de la croissance, le manque de maturation sexuelle précoce ou des effets secondaires sur la qualité du produit (Piferrer et al. 2012). Par exemple, chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), les conditions d'élevage conduisent à la masculinisation des stocks (Piferrer et al. 2005). Cette masculinisation ne permet pas un rendement optimal de l'exploitation car les mâles grossissent moins que les femelles. Dans d'autres cas, comme chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), les stocks monosexes sont souhaités car la maturation affecte les propriétés organoleptiques des parties comestibles du poisson. Dans ce cas encore ce sont les femelles qui sont recherchées. En outre, chez des espèces comme l'esturgeon, l'avantage d'obtenir uniquement des femelles est la valeur des ovaires comme source de caviar (Piferrer et al. 2012). Ainsi, pour une meilleure exploitation, la gestion des poissons d'élevage passe par un contrôle rigoureux des fécondités, des sexes, et par la maîtrise de l'âge à la puberté.

Chez les mollusques bivalves d'intérêt commercial et particulièrement l'huître creuse *Crassostrea gigas*, les recherches focalisées sur le contrôle du sexe sont portées par des objectifs différents. En effet, le besoin en connaissance de la reproduction se traduit plutôt en termes de maîtrise de la reproduction contrôlée et de gestion des sex-ratios des géniteurs au sein des éclosseries. En effet, l'huître creuse du Pacifique est un hermaphrodite successif irrégulier à tendance protandre, ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors des premières saisons de reproduction puis qu'elle change de sexe de manière irrégulière (Guo et al. 1998). Ces changements de sexe apparaissent donc très aléatoires, ce qui représente une limite à l'optimisation de la gestion du sex-ratio des géniteurs. En effet, certains mâles resteront des mâles et certaines femelles pourront redonner des mâles. Malgré plusieurs études, le mystère des mécanismes qui contrôlent la première différenciation gonadique chez cette espèce et les réversions sexuelles chez l'adulte reste encore irrésolu.

En revanche chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, la problématique s'apparente à celle des poissons : protandrie tardive et sex-ratio déséquilibré en faveur des individus mâles en élevage. L'huître perlière connaît un élevage intensif nécessitant un approvisionnement important en juvéniles issus d'un captage naturel. La sélection génétique en cours est le prélude au développement des éclosseries qui seront en charge de produire du naissain sélectionné. La production en conditions contrôlées nécessite par conséquent une connaissance accrue de la physiologie de la reproduction de cette espèce afin de gérer au mieux le sex-ratio déséquilibré en faveur des mâles. Cet aspect est un véritable frein à l'entretien des cheptels de reproducteurs car le caractère protandre de cette espèce impose d'attendre au moins 2 ans pour voir apparaître les premières femelles et 4-5 ans pour disposer d'une proportion de femelles significative pour réaliser les croisements d'intérêts.

Le contrôle de la reproduction, et notamment le contrôle du sexe, apparaît donc comme un enjeu majeur pour l'aquaculture d'espèces à fort intérêt économique que ce soit chez les poissons ou les bivalves. Or, la maîtrise du contrôle du sexe passe tout d'abord par la compréhension des mécanismes impliqués dans le déterminisme du sexe de l'espèce.

2. Le déterminisme du sexe au sein du règne animal

Le déterminisme du sexe peut être défini comme étant le premier processus par lequel le sexe (genre, mâle ou femelle) d'un organisme est établi. Dans le règne animal, le déterminisme du sexe est soit d'origine génétique (Déterminisme génotypique du sexe, GSD), soit d'origine environnementale (Déterminisme environnemental du sexe, ESD), ou peut également résulter de l'interaction de ces deux sources (GSD + ESD) (Valenzuela et al. 2003). Ainsi, divers systèmes de déterminisme sexuel existent chez les Métazoaires et apparaissent non seulement variables entre les phyla mais aussi au sein du même phylum (Figure 1). Cependant quelque soit le système de déterminisme sexuel, les facteurs génétiques, sous l'action de gènes déterminants, et/ou environnementaux conduisent à la différenciation sexuelle. Ce dernier processus met alors en jeu des cascades moléculaires spécifiques de gènes secondaires permettant la différenciation d'une gonade alors indifférenciée en un testicule ou un ovaire. Ensemble, le déterminisme et la différenciation sexuelle sont à l'origine d'une gonade fonctionnelle et définissent alors le sex-ratio à l'échelle de la population.

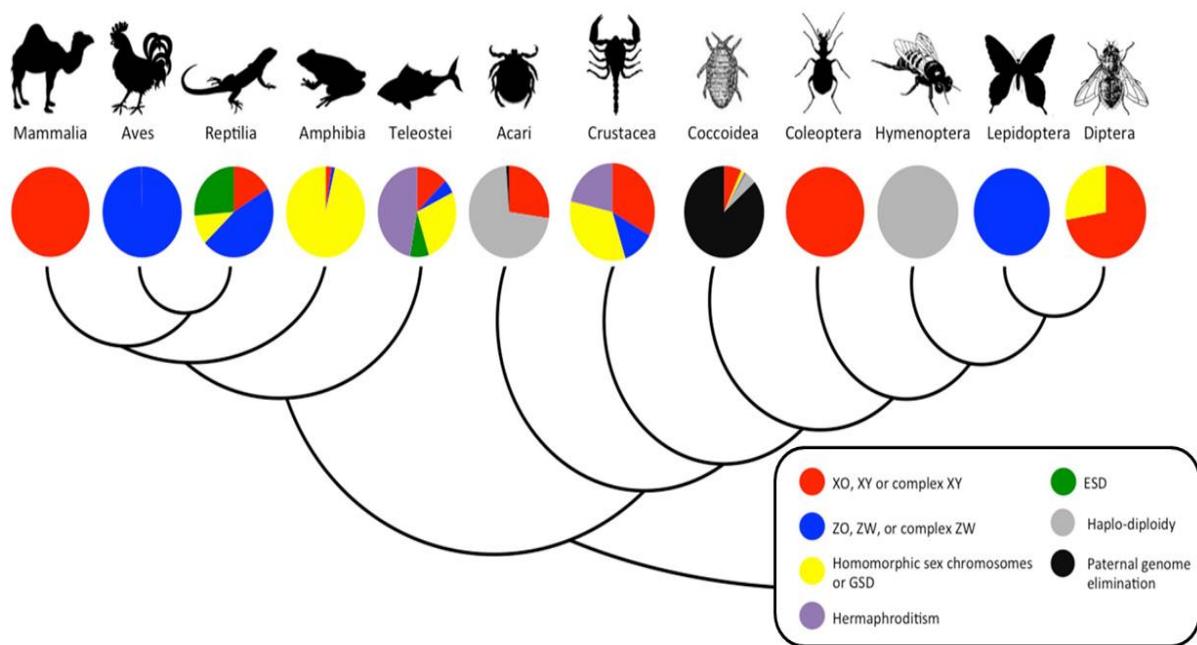


Figure 1 Diversité des systèmes de déterminisme du sexe au sein du règne animal. XO, XY, ZO et ZW : Déterminisme génotypique du sexe. ESD : Déterminisme environnemental du sexe. (Bachtrog et al 2014).

2.1. Une diversité de systèmes de déterminisme du sexe

2.1.1. Le déterminisme génotypique du sexe

Dans le déterminisme génotypique du sexe, c'est la composition chromosomique soit le génotype qui détermine le sexe d'un individu à la fécondation (Figure 2). Il s'effectue dans la majorité des espèces, qu'elles soient vertébrés ou invertébrés (mammifères, oiseaux, amphibiens, la plupart des insectes, certains reptiles et poissons).

Ainsi, chez de nombreuses espèces le sexe est déterminé par la présence de chromosomes sexuels X, Y, Z et/ou W, on parle alors de déterminisme chromosomique du sexe. Les mammifères, autres que les monotrèmes, présentent une homogamétie femelle et une hétérogamétie mâle (femelle XX et mâle XY) alors qu'une homogamétie mâle et une hétérogamétie femelle (mâle ZZ et femelle ZW) est retrouvée chez les oiseaux y compris les ratites (émeus et autruches) (Shetty et al. 2002). Quant aux poissons, amphibiens et reptiles, ils peuvent présenter une hétérogamétie mâle ou femelle. En effet, certains reptiles incluant quelques rares tortues comme *Chelonia longicollis* (Georges 1988; Ezaz et al. 2006) présentent un déterminisme sexuel de type XX/XY alors que le serpent *Elaphe quadrivirgata* (Matsubara et al. 2006) et la tortue *Pelodiscus sinensis* (Kawai et al. 2007) possèdent un système de type ZZ/ZW. Chez les amphibiens, où toutes les espèces possèdent un déterminisme sexuel génotypique dominant (Wallace et al. 1999), des exemples d'hétérogamétie mâle et femelle ont été trouvés au niveau des Anoures et des Urodèles. Par exemple, le Xénope africain *Xenopus laevis* (Chang et Witschi 1956) a un déterminisme sexuel de type ZZ/ZW alors que la grenouille verte *Lithobates clamitans* (Elinson 1983) et les tritons *Ichthyosaura alpestris* et *Lissotriton vulgaris* détiennent un système XX/XY (Hillis et Green 1990). Cette diversité est également retrouvée chez les poissons avec parfois un déterminisme sexuel génotypique différent au sein même du genre, et notamment au sein du genre *Oryzias* où les espèces *latipes*, *curvinotus*, *luzonensis*, *mekongensis*, *minutillus* et *dancena* présentent un déterminisme sexuel de type XX/XY, et les espèces *hubbsi* et *javanicus* un déterminisme sexuel de type ZZ/ZW (Kikuchi et Hamaguchi 2013). Certains poissons présentent même un déterminisme sexuel à trois chromosomes sexuels W, X et Y comme pour le platy *Xiphophorus maculatus* (Kallman 1984; Veith et al. 2003).

Dans d'autres cas, et notamment chez les invertébrés, différents mécanismes existent n'impliquant alors pas ou plus uniquement les chromosomes sexuels. Par exemple, la drosophile *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans* présentant des chromosomes sexuels de type XX/XY et XX/XO respectivement, possèdent un déterminisme génotypique dit « dose-dépendant » où le sexe est défini par le rapport du nombre de chromosomes sexuels (X) sur le nombre d'autosomes (A) (Bridges 1921). Ainsi, les individus présentant un rapport X:A < 1 se développent en mâles alors que le développement en hermaphrodites (*C. elegans*) ou femelle (*D. melanogaster*) nécessite un rapport X:A ≥ 1. De plus, dans d'autres mécanismes génotypiques, c'est le génome entier de l'organisme qui intervient. En effet, dans le déterminisme haplo-diploïde, retrouvé chez certains

arthropodes (acariens, hémiptères, coléoptères), et plus particulièrement chez les thysanoptères (thrips) et les hyménoptères (les fourmis, les abeilles et les guêpes) (Evans et al. 2004) ; les mâles se développent à partir d'œufs non fécondés (haploïdes) alors que les femelles se développent à partir d'œufs fécondés (diploïdes). Quant au déterminisme par élimination du génome paternel, retrouvé chez les cochenilles, les chromosomes paternels des mâles se retrouvent inactivés ou perdus après la fécondation, laissant ces mâles fonctionnellement haploïdes. Dans ces deux derniers mécanismes génotypiques, les mâles ne transmettent ainsi que leur lot de gènes maternels (Bull 1983).

Ainsi, dans le déterminisme génotypique du sexe, ce sont les éléments génétiques qui indiquent si un individu est mâle ou femelle. Cependant, chez un nombre conséquent d'organismes, la détermination sexuelle pour un développement mâle ou femelle ne réside pas uniquement dans les gènes.

2.1.2. Le déterminisme environnemental du sexe

Lorsque ce sont les conditions rencontrées au cours du développement qui déterminent le sexe d'un individu, on parle alors de déterminisme environnemental du sexe (ESD). Ce système de déterminisme est également retrouvé chez les invertébrés (insectes, crustacés et mollusques) et les vertébrés incluant notamment de nombreux reptiles et poissons. À l'image du déterminisme sexuel génotypique qui est composé de plusieurs mécanismes distincts, le déterminisme sexuel environnemental peut impliquer une variété de stimuli environnementaux tels que la température, le pH, les interactions sociales ou encore la photopériode.

La température est la variable environnementale qui a été de loin la plus étudiée. Ainsi, lorsqu'elle impacte irréversiblement le sexe phénotypique, on parle alors de déterminisme du sexe dépendant de la température (TSD). Ce système de déterminisme du sexe a été en premier lieu découvert chez les reptiles et est ainsi notamment retrouvé chez les alligators, les crocodiles, les sphénodons et quelques espèces de tortues et de lézards (Shoemaker et Crews 2009; Merchant-Larios et Díaz-Hernández 2012). Chez ces espèces le sexe dépend de la température à laquelle l'embryon en développement a été incubé. Cependant des modes de sensibilité très variables peuvent être retrouvés distinguant 4 types de profils : MF, FM, FMF, FMFM. De nombreuses espèces de tortues telles que *Carrettochelys insculpta* et *Trachemys scripta* (Ewert et Nelson 1991; Young et al. 2004) présentent un profil de type MF où une faible température d'incubation au cours du développement conduit à des embryons mâles, alors qu'une incubation à des températures supérieures provoque la différenciation femelle des embryons. À l'inverse le type FM prend place quand une élévation de la température conduit à une masculinisation de l'embryon tout comme chez le sphénodon *Sphenodon punctatus* (Mitchell et al. 2006). Dans d'autres cas, comme chez l'Alligator d'Amérique *Alligator mississippiensis* (Deeming 2004), un mode TSD de type FMF est relevé, où les températures extrêmes chaudes et froides produisent des femelles alors que les températures intermédiaires permettent une différenciation mâle. Plus récemment Inamdar et al. (2012) ont révélé l'existence d'un quatrième

profile de type FMFM chez le lézard *Calotes versicolor* caractérisé par deux alternances de sexe lorsque la température augmente avec ainsi trois températures de pivot. Charnier (1966) a été le premier à révéler que les espèces présentant un déterminisme sexuel de type TSD, ne sont sensibles à la température qu'au cours d'une fenêtre de temps spécifique du développement alors appelée « la période sensible à la température » ou encore « période thermosensible » (TSP). Cette période est variable selon les espèces mais se situe généralement au tiers du développement de l'embryon (Pieau et Dorizzi 1981; Merchant-Larios et al. 2010).

D'autres facteurs environnementaux peuvent intervenir dans le déterminisme du sexe comme par exemple la photopériode retrouvée chez les amphipodes marins tels que les espèces *Gammarus duebeni* et *Echinogammarus marinus*, où la production des mâles est favorisée sur de longues journées et la production des femelles durant les jours de courte durée (Naylor et al. 1988; Guler et al. 2012). D'autre part, chez de nombreux poissons coralliens le sexe peut être déterminé par des facteurs de type social. Par exemple, Hobbs et al. (2004) ont montré que chez la gobie *Gobiodon erythrosipilus* le sexe est établi en fonction de la proximité des congénères et donc du sexe de leur futur partenaire. En effet, les juvéniles démarrent une différenciation et une maturation sexuelle vers le sexe opposé de leur partenaire rencontré. Ce système de détermination permettrait ainsi aux individus de maximiser leur succès reproducteur dans un environnement où les rencontres et le sexe de leur partenaire sont imprévisibles. Ce même facteur social est également déterminant chez les vers marins échiuriens de la famille Bonellidae, où les larves planctoniques se fixant seules deviennent femelles, tandis que les larves rencontrant une femelle deviennent mâles (Berec et al. 2005).

La majorité des espèces présentes dans le règne animal ont été ainsi classées comme ayant soit un déterminisme génotypique ou soit un déterminisme environnemental du sexe. Cependant chez de nombreuses espèces, ces deux derniers systèmes ne sont pas mutuellement exclusifs mais peuvent interagir.

2.1.3. Le déterminisme mixte du sexe

La conception traditionnelle qui exprime la détermination du sexe comme un processus dichotomique (GSD ou ESD) (Valenzuela et al. 2003) a été récemment remise en question par la démonstration que ces deux modes de déterminisme peuvent coexister au sein d'une même espèce (Gamble et Zarkower 2012). En effet, un déterminisme mixte du sexe (GSD + ESD) est retrouvé chez plusieurs espèces de reptiles, d'amphibiens et de poissons où généralement un déterminisme de type TSD se superpose à un déterminisme chromosomique du sexe. Par exemple chez plusieurs espèces de reptiles, un système de détermination chromosomique de type ZZ/ZW est retrouvé mais le sexe génotypique initial peut être inversé à des températures d'incubation extrêmes entraînant alors une opposition entre le génotype et le phénotype sexuel (ZZ femelle) (Harlow et Taylor 2000; El mouden et al. 2001; Deeming 2004; Harlow 2004; Ewert et al. 2005; Quinn et al. 2007). Ce phénomène peut être aussi retrouvé chez des

espèces présentant des chromosomes sexuels de type XX/XY comme chez le scinque *Bassiana duperreyi* (Radder et al 2008).

Sarre et al. (2004) proposent ainsi une nouvelle conception du déterminisme sexuel qui perçoit alors le déterminisme génotypique et le déterminisme environnemental comme les deux extrémités d'un continuum. Dans les deux modes de déterminisme sexuel, GSD et ESD, il semblerait que les mêmes gènes soient impliqués dans la cascade moléculaire qui aboutit à la différenciation du sexe (Sarre et al. 2004). Ainsi, à chaque étape, la température peut affecter les processus moléculaires, et de ce fait le résultat final (Grossen et al. 2010). La température est, par exemple, connue pour affecter 1) l'activité des enzymes tels que l'aromatase qui transforme la testostérone en œstradiol ; ou 2) l'expression de gènes impliqués tel que *Dmrt1* dans la cascade de détermination du sexe. Cette nouvelle conception peut être illustrée par le cas du poisson médaka (*Oryzias latipes*) où de nouveaux chromosomes sexuels ont récemment évolué dans cette lignée par la duplication du gène *Dmrt1* (Matsuda et al. 2002; Nanda et al. 2002). À des températures normales (25°C), l'expression de la copie autosomale de *Dmrt1* est trop faible pour atteindre le seuil nécessaire pour induire le développement mâle, ce qui fait que les individus XX se développent en femelles. En revanche les individus XY se développent en mâle en raison de l'expression supplémentaire de la copie dupliquée du chromosome Y (*Dmrt1bY*). Cependant à des températures plus élevées (32°C) la copie autosomale *Dmrt1*, est régulée positivement ce qui induit le développement du sexe mâle des individus XX, qui sont alors parfaitement fonctionnels et phénotypiquement similaires aux individus mâles XY (Sato et al. 2005; Hattori et al. 2007). Ainsi, chez cette espèce de poisson, le sexe est déterminé par la quantité du facteur de transcription *Dmrt1* qui dépend elle-même d'une combinaison d'effets génétiques et environnementaux. De plus, il apparaît que le gène *Dmrt1bY* s'exprime aux premiers stades de neurula (stade 17 à 18, Nanda et al. 2002) correspondant à la période thermosensible de masculinisation (Hattori et al. 2007). Par conséquent il semblerait que le moment de la détermination du sexe ne diffère pas nécessairement entre les modes GSD et TSD comme proposé par Valenzuela et al. (2003).

D'après Bull (1983), l'ESD serait favorisé lorsqu'un environnement spécifique serait plus bénéfique à un sexe, sélectionnant les mécanismes de détermination sexuelle qui associerait chaque sexe à son meilleur environnement. A l'inverse, le GSD serait plutôt favorisé dans un environnement imprévisible ou pas assez variable, en quel cas un ESD pourrait produire de forts sex-ratios biaisés en faveur d'un sexe ou encore des individus intersexués (mâle et femelle). Par exemple, chez une même espèce de scinques *Niveoscincus ocellatus*, différents systèmes de déterminisme du sexe sont retrouvés en fonction de l'environnement (Pen et al. 2010). En effet, un ESD prend place à basses altitudes où les naissances précoces sont avantageuses pour le sexe femelle et où la variance interannuelle de température est faible. Quant au GSD, il est prédominant à hautes altitudes où il n'y a plus d'avantage pour le sexe femelle et où la variance interannuelle de température est forte. Dans ce cas particulier, l'ESD produit des sex-ratios optimaux à faible altitude alors que le GSD prévient le résultat de sex-ratios extrêmes à haute altitude.

Ainsi dans la plupart des cas, quel que soit le système de déterminisme du sexe (GSD, ESD ou mixte), le sexe est déterminé à un stade de développement précoce de l'organisme et notamment chez les espèces gonochoriques (sexe séparé). Cependant chez les espèces dites hermaphrodites (pouvant avoir les deux sexes durant leur vie), des changements de sexe peuvent survenir beaucoup plus tard chez l'adulte.

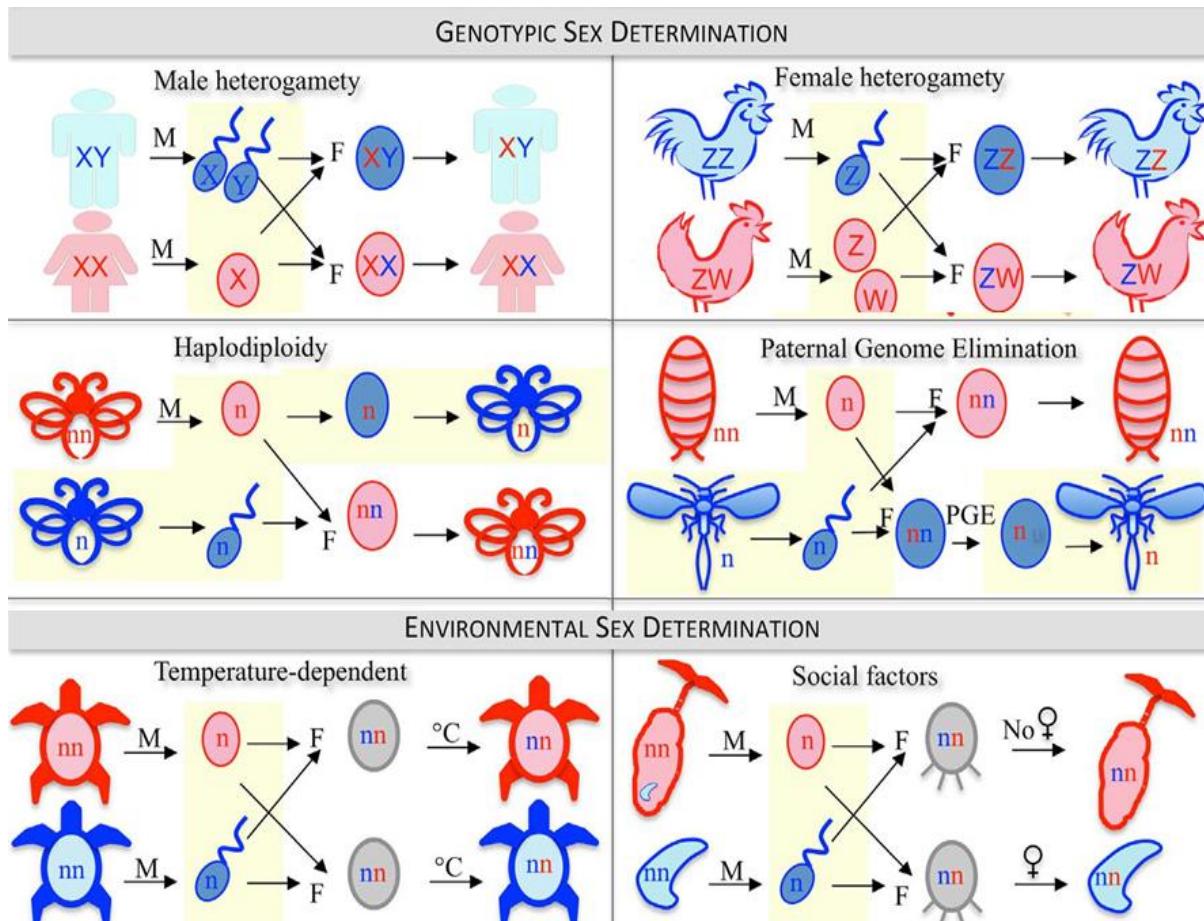


Figure 2 Schémas de quelques mécanismes de détermination sexuelle. M : méiose, F : fécondation. Les stades haploïdes (n) sont surlignés en jaune et les stades diploïdes (2n) ne le sont pas. **Déterminisme génotypique du sexe :** Hétérogamétie mâle XY (mammifères, coléoptères, mouches et poissons, ...), hétérogamétie femelle ZW (oiseaux, serpents, papillons, poissons, ...), haplodiploïdie (abeilles, fourmis et guêpes), et élimination du génome paternel (cochenilles). **Déterminisme environnemental du sexe :** Déterminisme du sexe dépendant de la température (tortues et autres reptiles), et déterminisme par des facteurs sociaux (ver « cuillère » marin *Bonellia sp.*). (modifié d'après Bachtrog et al. 2014).

2.1.4. L'hermaphrodisme

On parle d'hermaphrodisme quand un même individu est capable de se reproduire en tant que mâle et femelle au cours de sa vie. Dans le règne animal, les hermaphrodites représentent une part non négligeable soit 5% des espèces animales ou encore 30% en excluant les Arthropodes, et se retrouvent phylogénétiquement très largement distribués : des vertébrés (poissons) aux invertébrés (mollusques, crustacés, cnidaires, spongiaires, plathelminthes, échinodermes, ...) (Jarne et Auld 2006). Dans ce

mode de reproduction, deux types d'hermaphrodisme se distinguent: l'hermaphrodisme simultané et l'hermaphrodisme successif.

L'hermaphrodisme simultané est caractérisé par la production de gamètes mâles et femelles simultanément chez un même individu. Cette stratégie est par exemple retrouvée chez les crevettes du genre *Lysmata* (Bauer et Holt 1998), les poissons du genre *Serranus* (Petersen 1990) ou encore chez quelques mollusques bivalves du genre *Pecten* (Heller 1993). Quant à l'hermaphrodisme successif ou encore appelé séquentiel, il se rapporte aux espèces qui subissent au moins une fois un changement de sexe au cours de leur vie. Ce changement de sexe peut se faire de femelle à mâle comme chez les poissons perroquets (Hawkins et Roberts 2004), ou bien de mâle à femelle comme chez les poissons clown (Moyer et Nakazono 1978); on parle alors de protogynie et de protandrie respectivement. Ainsi la particularité des espèces hermaphrodites successives est que le sexe est déterminé plusieurs fois au cours du développement de l'organisme. En effet le premier sexe est déterminé lors de la différentiation gonadique initiale (déterminisme du sexe primaire) puis un second sexe est déterminé plus tard lors d'une phase de maintenance à l'âge adulte (déterminisme du sexe secondaire) (Wu et Chang 2013).

Les poissons apparaissent comme étant de bons modèles pour l'étude de l'inversion sexuelle et donc de la différentiation gonadique secondaire. En effet, 2% de toutes les espèces existantes présentent un mode de reproduction de type hermaphrodite (Avise et Mank 2009). Parmi celles-ci, les espèces hermaphrodites séquentielles, ont été enregistrées dans 27 familles réparties dans 7 ordres. De nombreuses études portées sur l'inversion sexuelle ont montré que deux types de facteurs, exogènes et endogènes, contribuent dans la différenciation secondaire. Les facteurs exogènes se rapportent à l'environnement social des individus. Par exemple, chez le protogyne *Cephalopholis boenak*, la présence ou l'absence d'un mâle dominant de plus grande taille joue un rôle important dans le changement de sexe des femelles ; les femelles ne changeant pas de sexe en la présence d'un mâle dominant mais quand celui-ci est retiré du groupe (Liu et Sadovy 2004). Bien qu'il ait été critiqué et redéfini plusieurs fois, le modèle de Ghiselin (1969) de l'hermaphrodisme séquentiel basé sur l'avantage de la taille des individus reste l'explication évolutionniste la plus acceptée de l'adaptation du changement de sexe (Godwin et al. 2003). En bref, ce modèle postule que si un individu se reproduit plus efficacement en un sexe quand il est petit ou jeune et en l'autre sexe lorsqu'il est de plus grande taille ou plus âgé, il devrait changer de sexe à un moment donné au cours de sa vie. D'autre part, les hormones stéroïdiennes (facteurs endogènes), et notamment l'oestrogène, ont été démontrées comme étant les régulateurs clés du changement de sexe (Godwin et Thomas 1993; Bhandari et al. 2005; Guiguen et al. 2010; Wu et Chang 2013). Par exemple chez les espèces protandres telles que le barramundi *Lates calcarifer* (Guiguen et al. 1993) et le pagre à tête noire *Acanthopagrus schlegeli* (Chang et al. 1994), une augmentation du niveau d'oestradiol dans le sérum est associée à un changement de sexe de mâle à femelle tandis qu'une diminution est relevée lors d'une inversion sexuelle de femelle à mâle chez les espèces protogynes comme chez le *Sparisoma viride* (Cardwell et

Liley 1991) et le *Pagrus pagrus* (Kokokiris et al. 2006). De plus, une inhibition de la production d'œstrogènes abouti à changement complet du sexe alors qu'un traitement à l'oestradiol empêche l'inversion sexuelle chez plusieurs espèces de poissons protogynes y compris les mérous (Higa et al. 2003; Bhandari et al. 2003; Bhandari et al. 2004; Kroon et al. 2005; Alam et al. 2006; Alam et Nakamura 2007). Inversement, les traitements oestrogénique induisent des inversions sexuelles de mâle vers femelle chez les hermaphrodites protandres comme chez le barramundi (Anderson et Forrester 2001). Cependant les mécanismes de contrôle en amont de la production et de l'activité des hormones stéroïdiennes lors du changement de sexe demeurent encore inconnus (Kobayashi et al. 2013).

De nombreux systèmes de déterminisme du sexe sont ainsi présents dans le règne animal. Mais quelque soit le système de déterminisme sexuel, une cascade moléculaire d'activation et/ou d'inhibition de gènes est mise en jeux permettant la différenciation sexuelle des cellules germinales dans le sens mâle ou femelle (Piferrer et Guiguen 2008).

2.2. Une diversité de gènes mis en jeux

2.2.1. Les gènes du déterminisme sexuel

Les voies qui contrôlent le développement sexuel ont été bien caractérisées au niveau moléculaire chez les organismes modèles tels que le nématode *C. elegans*, la drosophile *D. melanogaster* et la souris *Mus musculus* (Figure 3). Dans ces trois voies le déterminisme sexuel est sous le contrôle d'un gène maître majeur qui initie la différenciation sexuelle.

Le nématode *C. elegans*, dont le déterminisme du sexe est de type « dose-dépendant », a pour gène maître majeur le gène codant pour la protéine Xol-1 (XO lethal protein 1). Ainsi, lorsque le rapport X:A est égale à 1, une faible production de la protéine Xol-1 est retrouvée entraînant en fin de cascade une inhibition du facteur à domaine DM *mab-3* sous l'action du gène *tra-1* ne se retrouvant plus lui-même inhibé par le complexe des gènes *fem-1*, *fem-2* et *fem-3*. L'animal démarre alors une différenciation hermaphrodite où des gamètes mâles seront produits durant les stades précoces alors que des ovocytes seront retrouvés durant la vie adulte de l'animal. C'est chez la souris, que le premier gène maître a été trouvé au sein des vertébrés: le gène *Sry* (*Sex-determining region on Y chromosome*) porté par le chromosome Y (Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991). Il code pour un facteur de transcription induisant la différenciation testiculaire en régulant positivement l'expression du gène *sox9*. Le gène *dmrt1*, impliqué dans la différenciation mâle et son maintien, est alors à son tour mis en jeu (Eggers and Sinclair 2012).

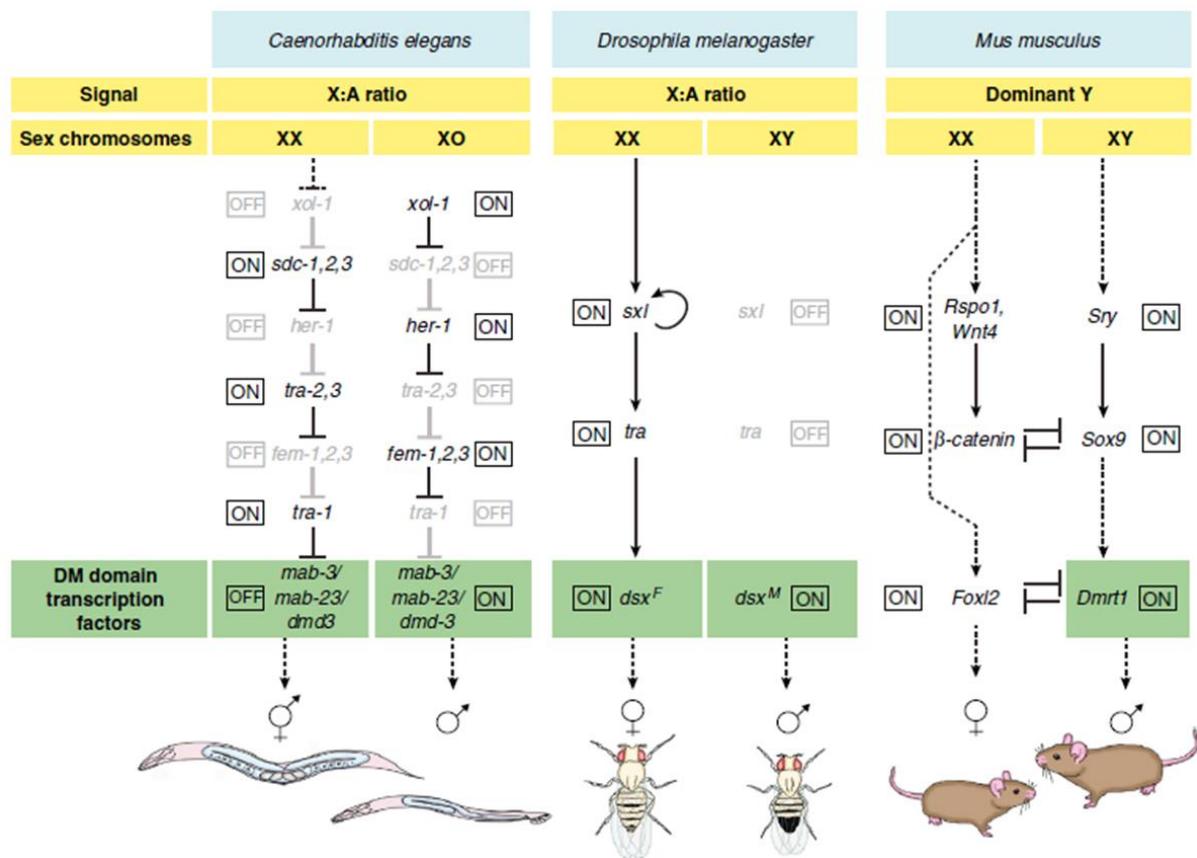


Figure 3 Voie du déterminisme du sexe chez 3 organismes modèles : le nématode *C. elegans*, la drosophile *D. melanogaster* et la souris *M. musculus*. Chez ces organismes modèles, le déterminisme sexuel est sous le contrôle d'un gène maître majeur différent bien que chacune des voies converge en aval vers des gènes conservés de la famille des facteurs à domaine DM, essentiels au développement mâle. (Gamble et Zarkower 2012).

Depuis la découverte de ces gènes, d'autres gènes majeurs du déterminisme sexuel ont été caractérisés chez divers autres organismes (Tableau 1). Ces gènes déterminants majeurs peuvent apparaître très conservés dans certains taxons, comme par exemple le gène *Sry* chez les mammifères ou encore le gène *Dmrt1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) chez les oiseaux (Stiglec et al. 2007; Wallis et al. 2008). Mais dans d'autres lignées, les gènes déterminants majeurs peuvent se retrouver différents même entre des espèces très proches, comme chez les poissons du genre *Oryzias* (Matsuda et al. 2002; Matsuda et al. 2003; Myosho et al. 2012). Par ailleurs, des mêmes gènes maîtres de la détermination peuvent être impliqués de façon répétée chez les animaux. Par exemple, chez les vertébrés autres que les mammifères, le gène *dmrt1* (gène de la famille des facteurs de transcription à domaine DM) et ses paralogues agissent en tant que le signal primaire de la détermination du sexe non seulement chez les oiseaux mais aussi chez le Xénope africain *Xenopus laevis* et les médakas *Oryzias latipes* et *Oryzias curvinotus* (Matsuda et al. 2002; Matsuda et al. 2003; Yoshimoto et al. 2008). De même, chez les insectes, les paralogues du gène *tra* (*female-specific protein transformer*), gène clé dans la cascade de détermination sexuelle chez la drosophile *D. melanogaster*, ont évolué comme les gènes déterminants chez la mouche domestique *Musca*

domestica, la guêpe *Nasonia vitripennis* et ainsi que l'abeille *Apis mellifera* (Beye et al. 2003; Hediger et al. 2010; Verhulst et al. 2010). Ces dernières données suggèrent l'hypothèse que certains types de gènes seraient donc plus aptes à devenir des gènes déterminants majeurs (Marshall Graves et Peichel 2010). Il existe néanmoins des cas de gènes majeurs n'ayant aucun homologue impliqué dans le déterminisme du sexe. Il s'agit notamment du gène majeur *sdY* (*sexually dimorphic on the Y chromosome*), un gène lié à l'immunité, caractérisé en premier lieu chez la truite *Oncorhynchus mykiss* puis identifié comme étant bien conservé chez tout les salmonidés (Yano et al. 2012; Yano et al. 2013).

Tableau 1 Les gènes déterminants majeurs identifiés chez les vertébrés et invertébrés et leur paralogue. (modifié d'après Bachtrog et al. 2014).

Espèce	Gène déterminant majeur	Système de déterminisme	Paralogue	Référence
Mammifères	<i>Sry</i>	Y déterminant	<i>sox3</i>	(Sinclair et al. 1990)
Oiseaux	<i>dmrt1</i>	Z dose-dépendant	-	(Smith et al. 2009)
Xénope africain (<i>X. laevis</i>)	<i>dmW</i>	Z déterminant	<i>dmrt1</i>	(Yoshimoto et al. 2008)
Médaka (<i>O. latipes</i> et <i>O. curvinotus</i>)	<i>dmrt1Y</i>	Y déterminant	<i>dmrt1</i>	(Matsuda et al. 2002; Matsuda et al. 2003)
(<i>O. luzonensis</i>)	<i>gsdfY</i>	Y déterminant	<i>gsdf</i>	(Myosho et al. 2012)
Pejerrey de Patagonie (<i>O. hatcheri</i>)	<i>amhY</i>	Y déterminant	<i>amh</i>	(Hattori et al. 2012)
Tétraodon (<i>T. rubripes</i>)	<i>amhr2</i>	X dose-dépendant	<i>amhr</i>	(Kamiya et al. 2012)
Salmonidés	<i>sdY</i>	Y déterminant	<i>Irf9</i>	(Yano et al. 2013)
Mouche des fruits (<i>D. melanogaster</i>)	<i>sxl</i>	ratio X:A	<i>CG3056</i>	(Maine et al. 1985)
Mouche domestique (<i>M. domestica</i>)	<i>F</i>	W déterminant	<i>tra</i>	(Hediger et al. 2010)
Ver à soie (<i>B. mori</i>)	<i>fem</i>	W déterminant	-	(Kiuchi et al. 2014)
Abeille (<i>A. mellifera</i>)	<i>csd</i>	haplodiploïdie	<i>tra</i>	(Beye et al. 2003)
Guêpe (<i>N. vitripennis</i>)	<i>nvtra</i>	haplodiploïdie	<i>tra</i>	(Verhulst et al. 2010)
Nématode (<i>C. elegans</i>)	<i>xol-1</i>	ratio X:A	-	(Miller et al. 1988)

D'autre part, il apparaît que ce modèle de détermination à un seul gène majeur, retrouvé chez ces espèces, n'est clairement pas universel dans le règne animal. En effet, chez certaines espèces, la détermination du sexe peut être polygénique. Par exemple, chez le poisson zèbre *Danio rerio*, un organisme modèle clé du développement, le sexe n'est pas contrôlé par un gène maître unique mais plutôt par une combinaison de multiples régions génomiques (Liew et al. 2012). Bien que certaines de ces régions contiennent des gènes connus pour jouer un rôle dans la détermination du sexe dans d'autres organismes (Bradley et al. 2011), la façon dont ces loci et l'environnement interagissent pour contrôler la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre, reste un mystère. De manière plus large, la question du comment exactement l'environnement déclenche la différenciation sexuelle reste encore à résoudre, bien qu'une récente étude a démontré que la méthylation de l'ADN était le lien chez le bar européen *Dicentrarchus labrax* (Navarro-Martín et al. 2011).

Cependant, en contraste avec la diversité des signaux primaires de détermination du sexe, certains gènes clés jouent un rôle conservés dans les voies moléculaires conduisant au développement des gonades mâles ou femelles chez les invertébrés et vertébrés.

2.2.2. Exemples de gènes conservés de la différenciation sexuelle

Les gènes de la famille *Dmrt* (*doublesex and mab-3 related transcription factor*) codant pour des facteurs de transcription à doigt de zinc (domaine DM), sont l'exemple parfait de la conservation fonctionnelle des gènes secondaires dans la détermination et la différenciation sexuelle. En effet, malgré de profondes différences dans le système de déterminisme du sexe et de l'identité des gènes déterminants majeurs, les gènes à domaine DM sont exprimés spécifiquement dans les gonades en développement chez quasi la totalité des espèces animales, des vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons) (Raymond et al. 2000; Shoemaker et al. 2007; Valenzuela 2010; Yoshimoto et Ito 2011; Chue et Smith 2011; Herpin et Schartl 2011) aux invertébrés (drodophile, hyménoptères, crustacés et mollusques) (Hempel et Oliver 2007; Cho et al. 2007; Klinbunga et al. 2008; Naimi et al. 2009a; Zhang et Qiu 2010; Kato et al. 2011). Le gène *Mab-3* chez *C. elegans* et le gène *Dmrt1* chez les vertébrés sont exclusivement exprimés au niveau des testicules et induisent un développement spécifiquement mâle (Yi et Zarkower 1999; Smith et al. 2009; Kopp 2012). Chez les mammifères, *Dmrt1* aurait également un rôle dans le maintien du sexe mâle, en empêchant notamment une réversion du testicule post-natal en ovaire (Eggers et Sinclair 2012). Non seulement *Dmrt1* maintiendrait ainsi l'expression de *Sox9* mais inhiberait le gène *Foxl2* (Matson et al. 2011). Chez les invertébrés et particulièrement chez les mollusques, plusieurs orthologues de la famille des facteurs à DM ont été caractérisés chez les bivalves *C. gigas* (*Cg-DM1* et *CgDsx*), *Chlamys farreri* (*Cf-dmrt4-like*) ou *Pinctada martensi* (*pmDmrt2* et *pmDmrt5*) (Naimi et al. 2009a; Yu et al. 2009; Feng et al. 2010; Yu et al. 2011). L'expression testiculaire spécifique de certains de ces derniers orthologues soutient l'idée de la conservation évolutive du rôle des gènes à domaine DM dans le déterminisme et la différenciation sexuelle mâle (Kopp 2012).

Parmi les acteurs de la voie femelle, le gène *Foxl2* (*Forkhead box protein L2*) se présente comme étant un bon candidat illustrant le principe précédent. En effet, ce gène codant pour un facteur de transcription possédant un domaine caractéristique de liaison à l'ADN (domaine Forkhead), apparaît comme étant un gène clé impliqué dans la différenciation de l'ovaire chez les vertébrés (Uhlenhaut et Treier 2006). Chez les mammifères, *Foxl2* est exprimé au niveau de l'ovaire et favorise le développement de celui-ci tout en inhibant le gène *Sox9* (Ottolenghi et al. 2007; Uhlenhaut et al. 2009). De plus *Foxl2* se retrouve être un activateur transcriptionnel principal du gène de l'aromatase (Pannetier et Pailhoux 2010) et agit parallèlement à la voie canonique Wnt-4 mais de manière indépendante pour induire la différenciation sexuel femelle et la maintenir (Garcia-Ortiz et al. 2009). Chez les invertébrés, des orthologues ont été caractérisés mais leur rôle dans la reproduction n'est pas

toujours évident (Adell et Müller 2004; Shimeld et al. 2010). Cependant les orthologues identifiés chez *C. gigas* (*Cg-foxl2*) et *C. farreri* (*Cf-foxl2*) présentent un dimorphisme sexuel d'expression en faveur des femelles (Naimi et al. 2009b; Liu et al. 2012).

Ainsi, l'évolution des voies moléculaires du déterminisme du sexe chez les animaux, semble se produire par le recrutement de nouveaux gènes déterminants majeurs, tandis que les voies, situées en aval, régulant la différenciation gonadique sont conservés, bien que la fonction de certains de ces derniers élément peut diverger entre les lignées du règne animal (Valenzuela et al. 2013).

2.3. Le déterminisme du sexe chez les mollusques

Chez les mollusques de nombreux modes de reproduction sont retrouvés allant du gonochorisme à l'hermaphrodisme qu'il soit simultané ou séquentiel. Le gonochorisme semble être le mode de reproduction ancestral des mollusques et se présente dans 7 des 8 classes (Figure 4). Les solénogastres apparaissent être exclusivement des hermaphrodites simultanés alors que ce mode de reproduction est complètement absent chez les scaphopodes et les caudofovéates où le gonochorisme y prédomine (Lamprell et Scheltema 2001). Au sein des monoplacophores, qui sont généralement gonochoriques, une espèce hermaphrodite simultanée y est retrouvée, *Micropilina arntzi* (Haszprunar et Schaefer 1996). De même, chez les chitons (polyplacophores), qui sont également le plus souvent gonochoriques, deux espèces du genre *Lepidochitona* montrent un hermaphrodisme simultané (Eernisse 1988). Parmi les divers mollusques bien étudiés, l'hermaphrodisme simultané et séquentiel sont communs et bien documentés à la fois chez les gastéropodes et les bivalves (Coe 1943; Ghiselin 1969; Policansky 1982; Wright 1988; Heller 1993). Quant aux céphalopodes, ils sont exclusivement gonochoriques à l'exception d'une seule espèce de calamar, *Ancistrocheirus lesueuri*, pour laquelle il existe des preuves de protandrie (Hoving et al. 2006).

Chez les mollusques, les systèmes de détermination du sexe, bien que très peu étudiés, seraient tout aussi variés. L'augmentation des études sur les chromosomes a permis de montrer l'existence d'un déterminisme génotypique dans cet embranchement (Thiriot-Quiévreux 2003). Ainsi, la majorité des mollusques gonochoriques, y compris certains bivalves, possèdent un GSD de type XX/XY (Guo et Allen 1994). D'autres types de GSD peuvent être retrouvés tels que les types ZZ/ZW et XX/XO chez les Viviparidés et les Néritidés, respectivement (Nakamura 1986; Huang 1997; Baršienė et al. 2000b; Baršienė et al. 2000a). Chez les espèces présentant une double transmission uniparentale des mitochondries (doubly uniparental inheritance ou DUI) telles que *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* et *Mytilus galloprovincialis* chez les mytilidés ou encore *Ruditapes philippinarum* chez les Vénéridés ; il a été supposé que le sexe serait déterminé par le génome mitochondrial (ADNmt) transmis par la mère. En effet, chez ces espèces, deux lignées mitochondrielles, présentant deux génomes différents (52% de divergence, Doucet-Beaupré et al. 2010), sont présentes : l'une transmise par les œufs (appelée F) et l'autre transmise par les spermatozoïdes (appelée M). Les deux sexes héritent des

mitochondries F de la mère alors que les mitochondries M sont transmises de père en fils uniquement (Breton et al. 2007; Passamonti et Ghiselli 2009). Cependant, une forte variabilité du sex-ratio au niveau de la descendance a été observé chez les espèces de moules présentant un système DUI, suggérant alors que le contrôle du sex-ratio serait exercé par le génome nucléaire de la mère (Saavedra et al. 1997; Kenchington et al. 2002; Cogswell et al. 2006). Les facteurs génétiques impliqués sont encore inconnus, mais la détermination du sexe chez ces bivalves serait probablement polygénique (Kenchington et al. 2002). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, espèce hermaphrodite protandre irrégulière, deux modèles génétiques du déterminisme sexuel ont été proposés. Le premier proposé par Guo et al. (1998) est basé sur l'existence d'un locus et de 2 génotypes. Ce dernier semble être applicable à l'huître perlière *P. margaritifera* suggérant un allèle mâle dominant (M) et un allèle protandrique récessif (F). Ainsi, les huîtres dont le génotype est MF seraient de vrais mâles (qui ne changent pas de sexe) alors que les huîtres présentant un génotype FF seraient de faux mâles protandriques pouvant devenir femelles sous le contrôle d'autres facteurs génétiques ou environnementaux. Le second modèle proposé par Hedrick et Hedgecock (2010) est quant à lui basé sur l'existence de 3 génotypes : les huîtres FF et MM seraient respectivement de « vraies femelles » et « vrais mâles » et les huîtres FM seraient des mâles pouvant devenir femelles sous l'action de l'environnement ou de facteurs inhibant un développement mâle et/ou activant un développement femelle. Quelque soit le modèle, les auteurs supposent que le déterminisme génétique de l'inversion sexuelle chez *C. gigas* serait contrôlé par un gène majeur qui est à l'heure actuelle encore inconnu. Cependant de nombreux gènes secondaires impliqués dans la cascade de la différenciation sexuelle ont été depuis identifiés (Naimi et al. 2009a; Naimi et al. 2009b; Santerre et al. 2012; Santerre et al. 2013; Santerre et al. 2014).

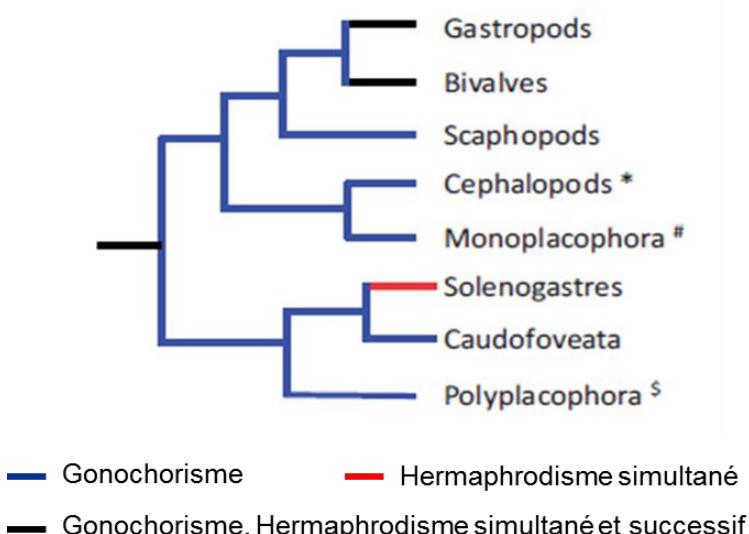


Figure 4 Distribution des modes de reproduction chez les mollusques. *un cas connu d'hermaphrodisme successif, #un cas connu d'hermaphrodisme simultané, et \$un genre présentant certain cas d'hermaphrodisme simultané. (modifié d'après Collin 2013).

Comme suggéré par les deux modèles évoqués précédemment, chez les mollusques le déterminisme du sexe pourrait aussi être sous le contrôle de facteurs environnementaux (ESD). En effet, chez la plupart des bivalves, la reproduction et probablement le sexe peuvent être affectés par la température de l'eau, la ressource trophique et dans une moindre mesure la photopériode (Chávez-Villalba et al. 2011). Par exemple, chez *C. gigas*, un conditionnement des huîtres adultes à faible température (8°C) conduit à un sex-ratio biaisé en faveur des mâles (Fabioux et al. 2005) alors qu'un tel sex-ratio est obtenu après un conditionnement des naissains à température élevée (25°C) (Santerre et al. 2013). La disponibilité de la nourriture peut aussi influencer le sex-ratio en induisant le changement de sexe (différenciation secondaire) comme démontré chez la moule *Mytella charruana* par Stenyakina et al. (2010). Parmi les moules conditionnées en absence de nourriture, certaines ont subi une inversion sexuelle de femelle vers mâle, créant ainsi un sex-ratio biaisé en faveur des mâles. Cette expérience a pu mettre en évidence l'hermaphrodisme alternatif de cette espèce qui depuis était admise comme étant gonochorique. D'autre part, les facteurs sociaux peuvent aussi modifier le sex-ratio chez les mollusques. En effet, chez la crépidule *Crepidula fornicata*, il semblerait que la densité de population interviendrait dans le changement de sexe, où un effet de compétition entre les mâles serait en jeu. En effet, les mâles qui souffriraient d'une diminution de leur succès de reproduction changerait de sexe (Proestou et al. 2008). Par ailleurs, bien que ce soit un sujet de débat au sein de la communauté scientifique (Scott 2012; Scott 2013), il a aussi été montré qu'un apport anthropique d'hormones stéroïdiennes pouvait avoir un effet sur le sex-ratio des mollusques. Par exemple il semblerait que l'oestradiol ait un effet féminisant sur les bivalves (Mori et al. 1969; Varaksina et Varaksin 1991) comme chez d'autres invertébrés et vertébrés (Schoenmakers et al. 1981). Mori et al. (1969) ont ainsi montré que l'injection d'oestradiol à des stades précoce de maturation de la gonade chez *C. gigas* induisait un changement de sexe mâle vers femelle. Chez les palourdes *M. lateralis* nourries avec de la méthyltestostérone avant la ponte, Moss (1989) a observé une augmentation du sex-ratio (mâle/femelle) de 0,8 à 1,6.

Les systèmes de déterminisme du sexe sont ainsi très divers chez les mollusques et impliqueraient de nombreux facteurs notamment chez les bivalves. Cependant ces études ont été principalement basées sur des analyses de sex-ratio qui ne permettent pas d'aborder les mécanismes moléculaires qui pourraient être impliqués dans le déterminisme du sexe.

3. Approches génomiques chez les bivalves marins : contribution à l'étude de la reproduction

Depuis l'émergence des technologies de séquençages de seconde génération (Next-Generation-Sequencing, NGS) et la réduction des coûts associés, de nombreuses études génomiques ont été menées chez les bivalves d'intérêt économique majeur ces dix dernières années (Suárez-Ulloa et al. 2013). L'engouement soudain pour les approches de type « omique » chez les bivalves se reflète par

les récentes publications de deux génomes : celui de l’huître perlière *Pinctada fucata* (Takeuchi et al. 2012) et celui de l’huître creuse *Crassostrea gigas* (Zhang et al. 2012). Cependant, la caractérisation de ces génomes est encore en cours et reste difficile en raison de i) l’absence d’assemblages de référence, ii) la présence de séquences spécifiques particulières telles que les nombreuses régions répétitives, et iii) le niveau élevé de polymorphisme. Par conséquent, d’autres approches et notamment des approches transcriptomiques ont été mises en œuvre pour étudier de nombreux processus physiologiques complexes des bivalves marins (Joubert et al. 2010; Fleury et al. 2010; Rosa et al. 2012; Li et al. 2013; Meng et al. 2013; Shi et He 2014). En effet, l’étude du transcriptome permet l’étude des gènes spécifiquement exprimés dans les tissus ou cellules d’un individu d’une espèce donnée à un temps donné et soumis ou pas à une condition donnée. L’utilisation des méthodes NGS pour le séquençage *de novo* de transcriptome s’avère ainsi très efficace pour l’identification des gènes mis en jeux et des voies associées en réponse à une question biologique précise. Parmi ces méthodes NGS, la méthode RNAseq apparaît adaptée aux organismes non-modèles dont les informations génomiques sont absentes, peu nombreuses ou non-pertinentes pour la question posée. Le RNAseq permet non seulement d’avoir les séquences des gènes exprimés mais permet aussi d’avoir une quantification de l’expression de chaque gène avec un niveau de précision élevé.

La génomique s’est clairement révélée comme un outil puissant pour l’étude de fonctions physiologiques complexes telle que la reproduction. Par exemple, le séquençage du transcriptome chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* a permis avec succès l’identification du gène maître majeur du déterminisme sexuel, *sdY* (Yano et al. 2012).

Chez les bivalves marins, c’est chez le pétoncle *Argopecten purpuratus* qu’a été décrit pour la première fois l’expression spécifique de plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de reproduction (Boutet et al 2008). Une banque d’ADNc a été réalisée à partir de tissus gonadiques et 7 gènes impliqués dans la reproduction ont été identifiés après l’analyse des séquences. Certains de ces gènes ont présenté des expressions spécifiques en fonction du sexe et des stades de maturation ce qui a permis d’étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans la maturation des gonades de cette espèce présentant un fort intérêt commercial.

Ensuite Banni et al. (2011), ont proposé l’utilisation d’une puce à ADN, pour décrire la variation temporelle des profils d’expressions de gènes au niveau des gonades de sexe et de stades de développement différents chez la moule *M. galloprovincialis*. Les données d’expression obtenues ont montré des profils transcriptomiques différents au sein des moules échantillonnées lors d’un cycle annuel tout en suivant un schéma temporel clair.

Chez *C. gigas*, un hermaphrodite successif alternatif, plusieurs études basées sur le transcriptome de la gonade ont été menées. Une première étude réalisée par Dheilly et al. (2012) a permis de proposer une liste de gènes d’intérêt, spécifiques du sexe et des stades de la gamétopénèse. Cette étude a également permis l’identification de gènes marqueurs précoce de la différenciation

sexuelle et la mise en lumière des gènes exprimés spécifiquement au niveau des spermatozoïdes et des ovocytes matures grâce à l'analyse de l'expression différentielle entre les tissus somatiques et les cellules germinales. La deuxième étude réalisée par Zhang et al. (2014) a, quant à elle, permis d'identifier chez l'huître de nouveaux homologues de gènes clés de la différenciation sexuelle (*SoxH*, *Sry-like*) qui apparaissaient jusqu'à présent spécifiques des vertébrés suggérant ainsi que le déterminisme du sexe serait encore plus conservé au sein du règne animal.

La récente publication du génome de *P. fucata* (Takeuchi et al. 2012) a permis la mise à disposition d'une nouvelle et puissante plateforme de données fournissant des informations sur la structure des gènes et des protéines. Dans ce contexte, une analyse spécifique de ce génome a été réalisée dans le but d'identifier les gènes jouant un rôle dans la reproduction (Matsumoto et al. 2013). Ainsi, plus de 40 modèles de gènes ont pu être identifiés incluant les gènes *vasa*, *nanos*, *vitellogenin*, *estrogen receptor* et autres.

De plus, les gènes exprimés pendant la spermatogénèse chez l'hermaphrodite fonctionnel *Nodipecten subnodosus*, ont été identifiés et annotés, incluant les gènes de points de contrôle tels que *rad1* et *hormad1* (Llera-Herrera et al. 2013). Ces derniers semblent importants pour la compréhension du blocage de la méiose associé à une stérilité totale des *N. subnodosus* triploïdes. Cette étude a aussi permis chez cette espèce de Pectinidés l'identification du gène *Dmrt1*, gène secondaire de la cascade de la différenciation sexuelle.

Le transcriptome réalisé chez *R. philippinarum* a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le système DUI et la détermination du sexe en comparant deux familles, l'une produisant une majorité de femelles et l'autre une majorité de mâles (Ghiselli et al. 2012). En effet, cette approche a permis l'identification de gènes candidats impliqués dans la régulation de la double transmission uniparentale des mitochondries et la mise en évidence d'une relation entre le sexe et l'expression différentielle de plusieurs gènes d'ubiquitination. Chez une autre espèce du genre *Ruditapes*, *Ruditapes decussatus*, une approche transcriptomique a été récemment mise en place pour apporter plus de connaissances sur les mécanismes moléculaires de la reproduction afin de mieux comprendre la régulation de la reproduction de cette espèce dont les enjeux aquacoles sont importants (Sousa et al. 2014). L'analyse a été réalisée à partir de tissus gonadiques de sexe et de stade différents de deux populations différentes présentant des réponses différentes à l'induction de la ponte quand elles sont utilisées en tant que géniteurs d'écloserie. La comparaison transcriptomique de ces deux populations a permis de révéler l'implication d'une voie spécifique de reconnaissance des signaux entre les ovocytes et les composants de la membrane plasmique des spermatozoïdes. L'analyse de l'expression différentielle entre les sexes et les stades a montré que le sexe à lui seul expliquait la plus grande partie de la variance de l'expression des gènes de la gonade.

Ainsi, toutes ces analyses transcriptomiques ont permis l'identification de nombreux gènes candidats impliqués dans divers processus intervenant dans la reproduction tels que la gamétogénèse. Les gènes

candidats obtenus sont maintenant disponibles pour de futures recherches fonctionnelles. Toutefois, malgré l'augmentation de ces études de génomique, les données sur la détermination et la différenciation sexuelle incluant les cascades moléculaires du déterminisme sexuel chez les bivalves hermaphrodites restent encore très peu connues.

4. Objectifs et démarche de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'apporter et d'approfondir les connaissances sur les facteurs contrôlant le déterminisme et la différenciation sexuelle de l'huître perlière *P. margaritifera*, qu'ils soient génétiques ou environnementaux, en passant par les voies moléculaires. L'ensemble de ce travail s'intègre dans une problématique de développement durable de la perliculture. Ainsi, d'un point de vue appliqué, les résultats de ces recherches devraient permettre de proposer des perspectives quant à la maîtrise de la reproduction en laboratoire et à la gestion des géniteurs pour la préservation (cheptel sauvage de référence) et l'exploitation (lignées d'huîtres donneuses de greffons sélectionnées) pérenne de la ressource perlicole.

Ainsi, pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle chez cette espèce à sexualité particulière, deux approches complémentaires ont été mises en œuvre : une approche transcriptomique et une approche expérimentale.

L'approche transcriptomique a pour objectif d'étudier les mécanismes moléculaires du déterminisme et de la différenciation sexuelle et d'identifier des gènes biomarqueurs qui pourront alors être utilisés en tant qu'outils pour l'étude de la différenciation sexuelle et notamment du sexe femelle chez *P. margaritifera*. Dans cette approche la question posée est la suivante : Quels sont les gènes codant pour des protéines impliquées dans la détermination ou la différenciation sexuelle et exprimés de manière différente au niveau des tissus gonadiques de stade et de sexe différents ? Pour répondre à cette question une analyse du transcriptome de la gonade par méthode RNAseq a été réalisée. Le séquençage RNAseq nous a permis de sélectionner des gènes candidats qui après validation ont été identifiés en tant que biomarqueurs de la différenciation sexuelle et potentiellement du déterminisme du sexe.

L'approche expérimentale quant à elle vise à étudier le phénomène de la sexualisation par des forçages anthropiques environnementaux ou hormonaux en se focalisant plus particulièrement sur l'inversion sexuelle de mâle à femelle. Dans cette approche la question posée est : Quels sont les facteurs favorisant l'inversion sexuelle vers le sexe femelle ? Ainsi, pour répondre à cette question, des huîtres perlières ont été soumises à différentes conditions environnementales ou hormonales pour voir l'effet de ces facteurs sur la sexualisation. Les réponses ont été étudiées tant au niveau cellulaire qu'au niveau moléculaire par la mesure de l'expression des gènes biomarqueurs identifiés lors de l'approche transcriptomique.

Afin de répondre à ces interrogations, ce manuscrit débute par une présentation du modèle biologique étudié puis s'organise en 3 chapitres qui abordent chacun un objectif spécifique. Ces chapitres sont présentés sous forme de publications en anglais (acceptée, soumise ou en préparation) et sont agencés autour de 2 parties correspondant aux approches transcriptomique et expérimentale. Pour une optimisation de la lecture, ces parties sont précédées d'une introduction générale en français permettant de décrire les problématiques abordées et les objectifs proposés, et se terminent par une synthèse, également en français, permettant de restituer les résultats et éléments clés de discussion exposés.

La **Partie I** est constituée de 2 chapitres. Le **Chapitre 1** présente l'étude du transcriptome de la gonade de *P. margaritifera* permettant une exploration globale des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la reproduction et notamment dans la différenciation et la détermination sexuelle. Ce chapitre a été publié dans le journal *BMC genomics* (Facteur d'impact = 4,04). Le **Chapitre 2** propose une analyse plus ciblée des données quantitatives du transcriptome de la gonade dans le but de rechercher des gènes biomarqueurs de la voie de sexualisation chez *P. margaritifera*. La publication dont fait l'objet ce chapitre a été soumise au journal *PLOS One* (Facteur d'impact = 3,73).

La **Partie II** aborde, sous la forme d'un seul chapitre (**Chapitre 3**), l'effet de forçages anthropiques (de type environnemental et hormonal) sur la reproduction de l'huître perlière en se focalisant plus particulièrement sur l'inversion sexuelle vers le sexe femelle tant sur le plan cellulaire que moléculaire avec l'expression des gènes biomarqueurs identifiés dans le chapitre précédent. Cette dernière publication est en préparation pour être proposée au journal *Aquaculture* (Facteur d'impact = 1,828).

Enfin, la **Synthèse générale** expose l'apport de ces travaux de recherche à la compréhension des mécanismes impliqués dans le déterminisme du sexe et la différenciation sexuelle de l'huître perlière et propose des **perspectives** de recherche.

Le modèle biologique : L’huître perlière *Pinctada margaritifera*

1. Importance du modèle

En Polynésie française, la perliculture est basée sur l'exploitation de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, naturellement abondante en ces eaux notamment dans les archipels des Tuamotu et Gambier. L'activité perlicole joue un rôle économique majeur et représente la plus grande industrie d'exportation de la région. En effet, le marché des perles est passé de 86 Kg en 1980 à 16 Tonnes en 2012 (7,7 millions de perles de culture), soit près de 7,8 milliards de Francs pacifique en valeur d'exportation (statistiques douanières, Wane 2013). L'industrie de la perle de culture implique actuellement près de 5 000 emplois « locaux », distribués dans 487 fermes perlicoles, réparties dans 25 atolls et îles de la Polynésie française (données 2013, Direction des Ressources Marines et Minières, DRMM, Tahiti). Cependant, après 20 ans d'expansion elle connaît depuis 2001 une crise économique due essentiellement à la concurrence mondiale qui a favorisé la surproduction et qui elle-même a engendré la hausse de la quantité de perle de moindre qualité sur le marché entraînant alors la baisse des prix des perles de culture. De ce fait les exportations et les ventes d'ouvrage en perles sont en chute libre, le prix au gramme de la perle est passé de 1 800 Francs pacifique en 2000 à moins de 500 Francs pacifique en 2012 (Institut de la Statistique de Polynésie française, ISPF, www.ispf.pf). Malgré cette crise économique, la Polynésie française reste le premier exportateur de perles noires avec une production annuelle moyenne de 9 tonnes de perles de culture labélisées « Perles de Tahiti », ce qui représente 16,4% de la production mondiale des perles de culture marines (Coeroli 2010). Ainsi, la perliculture reste, après le tourisme, la seconde principale ressource économique pour la Polynésie française et notamment pour les archipels des Tuamotu et Gambier, où l'activité y est principalement localisée.

Conscients du poids économique de l'activité perlicole, les services du Territoire de la Polynésie française ont encouragé et se sont mobilisés pour participer à la gestion de programmes de recherche et de développement. En 1990, le « PGRN » (Programme général de recherche sur la nacre) a été mis en place suite à des mortalités massives de *P. margaritifera* observées en 1985. Pérenniser la ressource, améliorer la rentabilité des entreprises et sécuriser la production ont été les trois principaux axes de recherche issus des recommandations de ce programme. Depuis, des recherches s'articulant autour de ces priorités ont été réalisées tels que le programme de « Pérennisation et de professionnalisation de la perliculture » (2008-2010), financé par le fond européen de développement (9^{ème} FED), visant à mieux connaître les sources de nourriture et analyser le déterminisme environnemental de la croissance et de la reproduction des huîtres perlières. Le groupement de recherche « ADEQUA » (Amélioration de la qualité des perles de Tahiti) entre 2009 et 2012, avait pour objectif principal de décrire, comprendre, améliorer les processus de greffe et la qualité des perles récoltées. Plus récemment, deux grands projets ont été mis en œuvre : le Contrat de projet « BIODIPERL » (2011-2013) et le projet ANR « POLYPERL » (2011-2014). Ces derniers programmes présentent des axes de recherche orientés vers une exploitation durable de la ressource

pour la perliculture que ce soit à travers la préservation de la biodiversité des stocks d’huîtres perlières et de la gestion intégrée de la perliculture dans le contexte du changement global. Ces différents programmes de recherche ont impliqué et impliquent encore de nombreux organismes d’Etat, Universités et autres laboratoires Français ou étrangers; et notamment sur le territoire, l’Université de la Polynésie française (UPF), l’Ecole pratique des hautes études (EPHE) avec le Centre national de la recherche scientifique (CNRS), l’Institut de recherche pour le développement (IRD) et ainsi que l’Institut français de recherche pour l’exploitation de la mer (Ifremer).

Aujourd’hui, les travaux actuels engagés par l’Ifremer, en soutien au développement durable de la perliculture, ont pour objectif d’améliorer la production de perles de qualité (Gueguen et al. 2013). Depuis qu’il a été démontré que la qualité de la perle dépendait génétiquement de l’huître donneuse de greffons (Tayalé et al. 2012), les programmes de sélection génétique ont été fortement encouragés. Ainsi, le principal objectif de ces programmes est la génération et l’élevage de familles d’huîtres donneuses de greffons sélectionnées pour leur capacité à produire des perles de qualité et/ou de couleur particulière et/ou de croissance rapide (Ky et al. 2013; Blay et al. 2013; Ky et al. 2014). La production réussie de naissains sélectionnés dépend de la production de gamètes et d’embryons de reproducteurs synchrones, eux-mêmes, sélectionnés et élevés en laboratoire. Chez l’huître perlière *P. margaritifera*, la reproduction artificielle en laboratoire implique non seulement le contrôle de la gamétopénie et de la synchronisation des stades de maturité de la gonade mais implique aussi, et en majeure partie, la gestion du sex-ratio pour les géniteurs d’élevage. En effet, la reproduction de l’huître perlière en conditions contrôlées dépend de la disponibilité en femelles, qui malheureusement apparaissent peu abondantes chez les jeunes huîtres d’élevage due à l’hermaphrodisme protandre de cette espèce (Tranter 1958a). Cette sexualité particulière pose le problème du temps de génération pour le renouvellement des lignées d’huîtres en écloserie car en moyenne il faut attendre 4 à 5 ans avant de disposer d’un nombre significatif de femelles pour produire une descendance (Chávez-Villalba et al. 2011). Ce rythme ne permet pas d’atteindre rapidement les objectifs et repousse d’autant un programme de sélection raisonné.

2. Systématique et répartition

L’huître perlière *Pinctada margaritifera* (Linné, 1758) variété *cumingii* (Jameson, 1901), appelée communément « huître perlière à lèvres noires » ou « nacre » en Polynésie française, est un mollusque bivalve appartenant à la famille des Pteriidae et au genre *Pinctada* (Figure 5). La systématique des espèces et sous espèces du genre *Pinctada* est complexe et suscite depuis longtemps des révisions successives. Au total ce n’est pas moins de 100 espèces qui ont été décrites, mais aujourd’hui elles sont regroupées en 17 espèces (World register of Marine Species 2014).

Règne : Metazoa
Enbranchement : Mollusca
Classe : Bivalvia
Sous-classe : Pteriomorphia
Ordre : Pterioidea
Superfamille : Pterioidea
Famille : Pteriidae
Genre : *Pinctada*
Espèce : *margaritifera* (Linné, 1758)
Variété : *cumingii* (Jameson, 1901)



Figure 5 L'huître perlière *Pinctada margaritifera*. Classification taxonomique de l'espèce *P. margaritifera* var. *cumingii* (gauche) et photo d'une huître perlière adulte (droite, © X. Caisey).

La répartition de *Pinctada margaritifera* est assez large. Elle est présente dans l'écosystème corallien de l'Indo-Pacifique (zone intertropicale) depuis la Mer Rouge jusqu'au Pacifique oriental ou encore depuis le bas du Nord de l'Australie jusqu'au Sud du Japon (Le Pennec et al. 2010) (Figure 6). *Pinctada margaritifera*, var. *cumingii* se retrouve très abondante en Polynésie française et notamment dans les archipels des Tuamotu et des Gambier où elle est exploitée pour la production de perles. Bien que l'espèce apparaisse polyphylétique entre les populations de l'ensemble de son espace de répartition, il semble que les populations de Polynésie française appartiennent à un même groupe monophylétique, malgré la très grande dispersion des lagons (Cunha et al. 2011).

L'huître perlière se rencontre principalement à l'intérieur des lagons entre 0 et 50 m de profondeur fixée par leur byssus sur des substrats rocheux (coraux vivants ou morts). Cependant la majorité des stocks a été décrite au-delà de 30 m de profondeur (Zanini et Salvat 2000). Il est également possible de retrouver quelques spécimens sur la pente externe de l'océan et sur des fonds sablonneux entre les pinacles, fixés alors sur des débris de coraux ou de mollusques.

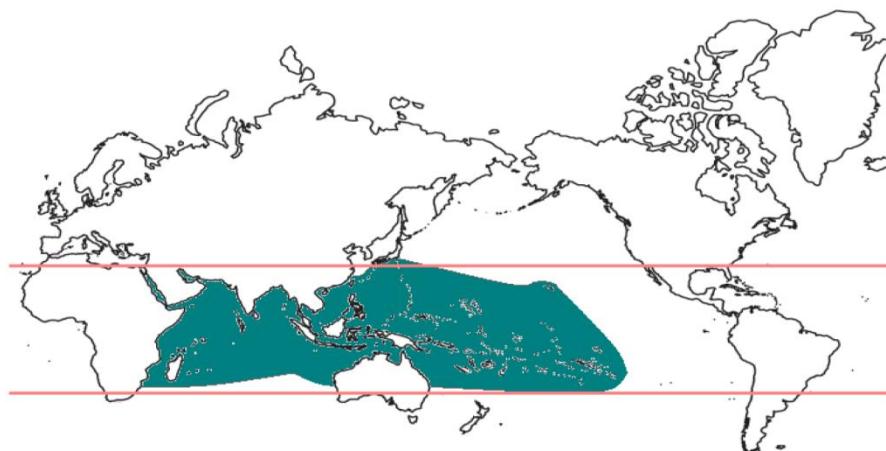


Figure 6 Carte de la répartition mondiale de *P. margaritifera*. Sa distribution s'étend à l'ouest, du nord au sud de la mer Rouge à Madagascar et à l'est, d'Hawaï à la Polynésie française. (Carte : Linard 2010)

3. Morphologie et anatomie

3.1. La coquille

La coquille de *P. margaritifera* est formée de deux valves dissymétriques (la gauche étant plus convexe que la droite) dont la longueur peut atteindre jusqu'à 30 cm. Ces valves sont reliées entre elles par une charnière sans dent.



Figure 7 Coquille de l'huître perlière *P. margaritifera*. Face externe prismatique (gauche) et face interne nacrée (droite) de la valve droite de la coquille.

La face externe de la coquille est généralement de couleur foncée présentant des rayons de couleur blanche divergents de la charnière, et des stries concentriques qui se terminent par des barbes de croissance à la périphérie (Figure 7). Sur la face interne, deux parties peuvent être distinguées : une partie noire à la périphérie de même nature que la face externe et une partie nacrée centrale (Figure 7). La bordure extérieure de la couche nacrée présente des irisations vertes, aubergines, jaunes, bleues ou grises. La coquille, sécrétée par les cellules épithéliales externes du manteau, est ainsi formée successivement de 3 couches (Cuif et al. 1991) : le périostracum (externe), la couche prismatique (médiane) et la couche nacrée (interne).

3.2. L'animal

L'anatomie de *Pinctada margaritifera*, étudiée en détail dans l' « Atlas anatomique de l'huître perlière : *Pinctada margaritifera* » (Fougerouse et Herbaut 1994), est présentée par la figure 8. Les deux valves coquillères renferment l'animal dont la chair représente 20 à 25 % de la masse de la coquille. Les principaux organes sont enveloppés par le manteau ou pallium, jouant ainsi un rôle de protection en plus de celui de la coquille. Ces organes permettent d'assurer les diverses fonctions biologiques essentielles à la vie de l'animal dont la circulation, l'excrétion, la respiration, la nutrition, la reproduction et la minéralisation de la coquille.

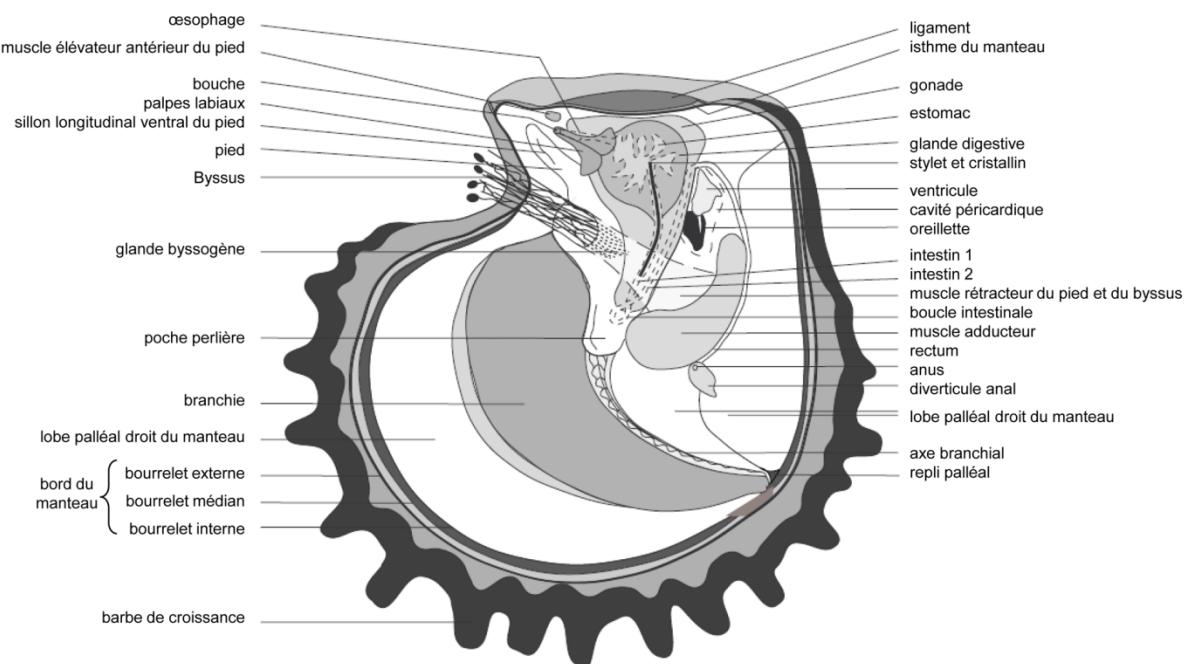


Figure 8 Anatomie de l'huître perlière *P. margaritifera* (valve droite). Vue latérale gauche après élimination du péricarde, du manteau et des branchies gauches (Fougerouse et Herbaut 1994).

Le manteau, dont le rôle est de sécréter la coquille et d'en assurer la croissance, est l'organe le plus externe. Il est constitué de deux lobes palléaux qui tapissent l'intérieur de chaque valve. Soudés à la masse viscérale et au muscle adducteur, les lobes se rejoignent dorsalement le long de la charnière pour former l'isthme. La couleur noire du bourrelet externe a donné à *Pinctada margaritifera* le nom d' « huître perlière à lèvre noire ».

Les branchies pigmentées, ou « cténides », formées chacune d'un axe branchial supportant deux lames branchiales et quatre lamelles branchiales assurent la respiration. Ces branchies jouent aussi un rôle dans la nutrition de l'huître perlière, exerçant une action de filtration et de captage des particules alimentaires.

L'appareil digestif est relativement simple. Il débute par une bouche entourée de quatre palpes labiaux, puis se compose d'une glande digestive, d'un estomac contenant un stylet cristallin suivi de l'intestin et se termine par un anus pourvu d'un diverticule anal.

Le système circulatoire, ouvert et constitué d'un cœur, présentant un ventricule et deux oreillettes, et de lacunes hémolymphatiques, assure la circulation de l'hémolymphé dans tout l'organisme à travers les tissus conjonctifs.

Le muscle adducteur, les muscles rétracteurs du pied et du byssus, et le pied et ses muscles élévateurs sont les éléments musculaires principaux chez *P. margaritifera*. Les déplacements limités sont liés essentiellement à l'activité du pied. Cependant, l'animal reste le plus souvent fixé au substrat par le byssus sécrété par la glande byssogène.

L'appareil rénal est constitué d'une paire de néphridies située en position latérale de chaque côté de la masse viscérale. Les produits d'excrétion sont rejetés au niveau des orifices uro-génitaux.

Le système nerveux, peu apparent à l'examen macroscopique, est simple et présente 3 paires de ganglions reliés entre eux par des connectifs : une paire de ganglions cérébroïdes, une paire de ganglions pédieux et une paire de ganglions viscéraux.

Enfin, la gonade qui assure la fonction de reproduction, apparaît comme un organe blanchâtre et diffus autour de la masse viscérale (Figure 9). La gonade enveloppe partiellement l'œsophage et l'estomac, totalement la glande digestive et les deux parties de l'intestin. À maturité sexuelle, la gonade peut s'étendre jusqu'à envahir la poche perlière, extension translucide qui recevra le nucléus et le greffon lors de la greffe.

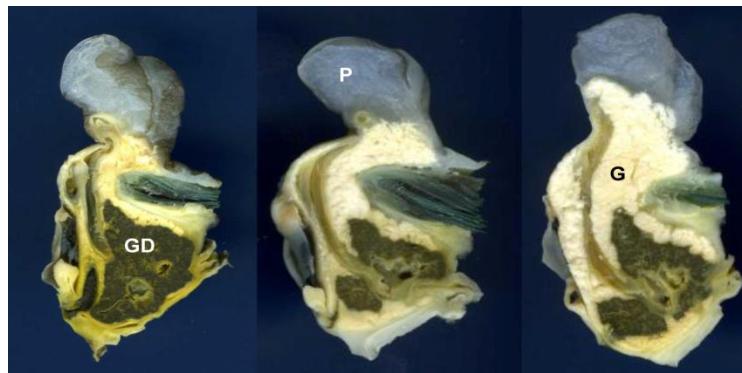


Figure 9 Coupes transversales de la masse viscérale chez *P. margaritifera*. La gonade blanchâtre enveloppe la glande digestive et envahit la poche perlière lors de la maturation. GD : Glande digestive, P : Poche perlière, G : Gonade.

4. Cycle de développement

Le cycle de développement de *P. margaritifera* est divisé en trois phases : la phase larvaire pélagique, la phase juvénile et la phase adulte benthique (Figure 10).

Une fois la fécondation externe effectuée, les divisions embryonnaires débutent donnant des larves trophophores puis véligères qui mènent une vie planctonique. Le premier stade de vie larvaire, larve-D, est atteint au bout de 20-24h. La larve a alors développé une pré-coquille (prodissocoquille) d'une taille moyenne de 80 µm (Doroudi et Southgate 2003). La larve véligère se caractérise par la présence d'un organe bilobé cilié, le vélum, qui lui permet de nager et de se nourrir par filtration. Douze jours après la fécondation, la larve est dite umbonée et mesure 140 µm. À la fin du cycle larvaire pélagique, les larves font en moyenne 230 µm et développent un pied et un organe sensoriel sous la forme d'une tâche pigmentaire appelé « œil » qui marque l'entrée dans le stade pédivéligère ou oeillé. À ce stade, la larve alterne alors des phases de nage et de reptation sur différents substrats grâce au pied. La durée de la phase larvaire en éclosé est d'en moyenne 21 jours avant fixation (Doroudi et Southgate 2003). Cependant elle varie en milieu naturel entre 15 et 30 jours en fonction des conditions environnementales (Thomas et al. 2011).

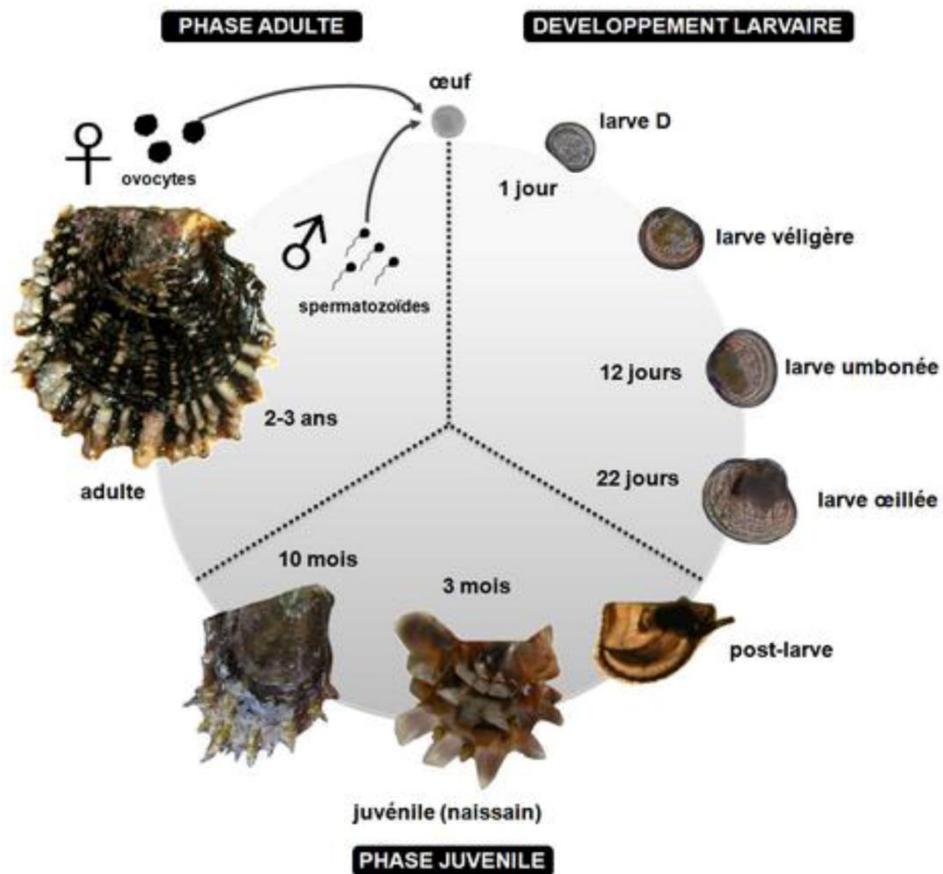


Figure 10 Cycle de développement de l'huître perlière *P. margaritifera*. Après une fécondation externe, le développement de *P. margaritifera* se divise en 3 phases : la phase larvaire pélagique durant 3 semaines, la phase juvénile marquée par la métamorphose et la fixation au substrat, et la phase adulte benthique. (Schéma : Linard 2010, d'après Thomas 2009)

Après la métamorphose, la larve qui s'est transformée en « post-larve » (250 µm) va se fixer au substrat par des filaments du byssus eux même guidés par le pied. Le vélum a disparu au profit des branchies et une nouvelle coquille se forme : la dissoconque. À ce moment les post-larves sont appelées « juvéniles » ou « naissains ». La croissance des nacres est ensuite très rapide se caractérisant par une première phase active au cours des 3 premières années (10-12 cm), suivie d'un ralentissement, jusqu'à atteindre une taille maximale (en moyenne 15-18 cm selon les atolls) (Pouvreau et Prasil 2001). La longévité ou l'espérance de vie d'une huître perlière du stock naturel est encore peu connue, cependant Gervis et Sims (1992) estiment que *P. margaritifera* peut vivre jusqu'à 30 ans.

5. Nutrition

L'huître perlière *P. margaritifera* est un organisme filtreur suspensivore. Le mouvement synchronisé des cils vibratiles situés sur les filaments branchiaux crée un courant d'eau dans la cavité palléale permettant la capture des particules, présentes dans la colonne d'eau, par les branchies. Ces particules planctoniques sont alors enrobées de mucus avant d'être acheminées par les cils vers les palpes

labiaux qui effectuent un tri pré-ingestif en fonction de leur tailles. Les particules non ingérées ($>200 \mu\text{m}$) sont rejetées sous forme de pseudo-fèces tandis que les particules ingérées par la bouche sont digérées, et les résidus non assimilés sont alors rejetés sous formes de fèces (Figure 11).

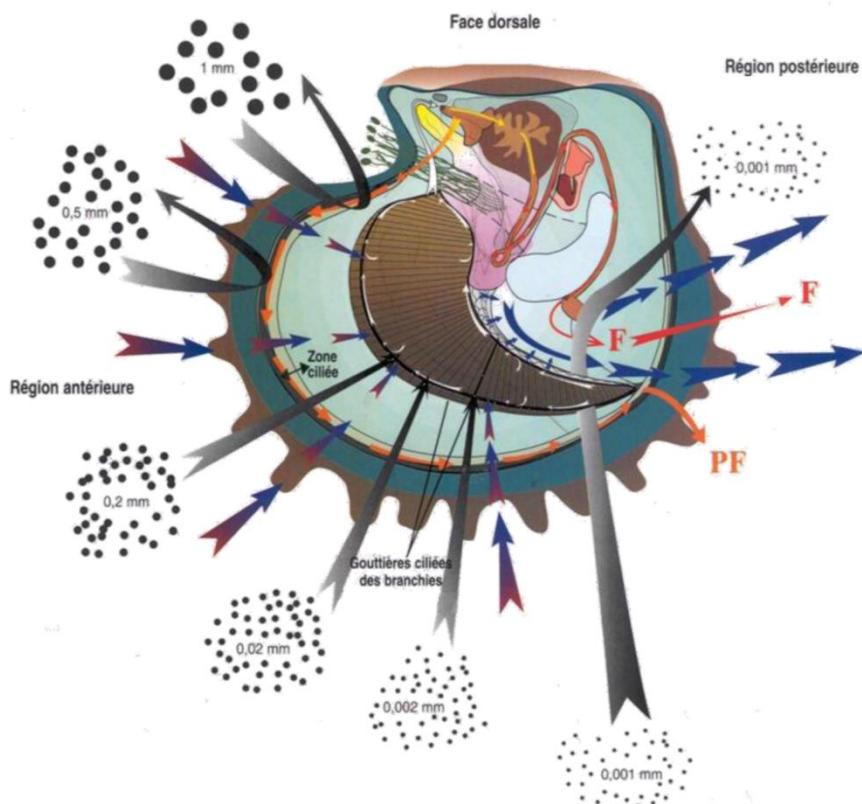


Figure 11 Nutrition de l'huître perlière *P. margaritifera*. Les particules alimentaires comprises entre 2 et 200 μm sont retenues puis triées par l'animal. PF : pseudo-fèces ; F : fèces ; flèche rouge-bleue : courant d'eau entrant ; flèche bleue : courant d'eau sortant ; flèche noire : trajet des particules ; flèche blanche : trajet des particules captées ; flèche jaune : trajet des particules ingérées ; flèche orange : trajet des pseudo-fèces ; flèche rouge : trajet des fèces. (Schéma: EVAAM-Service de la Perliculture).

Bien que l'huître perlière puisse se nourrir d'une large gamme de tailles de particules (4 à 160 μm), il apparaît que le taux de rétention de *P. margaritifera* varie en fonction de la taille des particules. Le taux de rétention des particules d'1 μm est d'environ 10% et augmente de façon linéaire jusqu'à atteindre près de 100% pour les particules d'une taille supérieure à 5 μm (Pouvreau et al. 1999). L'étude des contenus stomachaux a permis de mettre en évidence la diversité du régime alimentaire des huîtres perlées, alors principalement composé de petits flagellés autotrophes (Cryptophyte, Prymnesiophycées et Chlorophycées) et de dinoflagellés (Loret et al. 2000). Bien que le plancton d'une taille $>2 \mu\text{m}$ semble constituer la ressource principale des huîtres perlées, les travaux de Fournier et al. (2012a) ont montré la part importante du picoplancton ($<2 \mu\text{m}$) dans l'alimentation de *P. margaritifera*, les nanoflagellés étant la principale source de carbone des huîtres perlées. L'oligotrophie et la dominance du picoplancton dans les lagons polynésiens (Charpy et Charpy-Roubaud 1990; Buestel et Pouvreau 2000) seraient compensées chez *P. margaritifera* par des taux de filtration particulièrement élevés compris entre 13 et 26 $\text{L h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de poids sec (Yukihira et al. 2000;

Pouvreau et al. 2000a) soit deux fois supérieur par rapport à l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Dupuy et al. 2000).

6. Reproduction et gamétogenèse

L'huître perlière *P. margaritifera* est une espèce hermaphrodite protandre (Tranter 1958a). Comme d'autres espèces d'huîtres perlées, elle montre un changement consécutif du sexe. En effet, à la première maturité toutes les huîtres sont de sexe mâle puis le sexe femelle apparaît progressivement à partir d'environ 2 ans pour atteindre un équilibre avec un sex-ratio près de 1:1 pour les populations d'individus âgés de plus de 8 ans (Figure 12) (Chávez-Villalba et al. 2011).

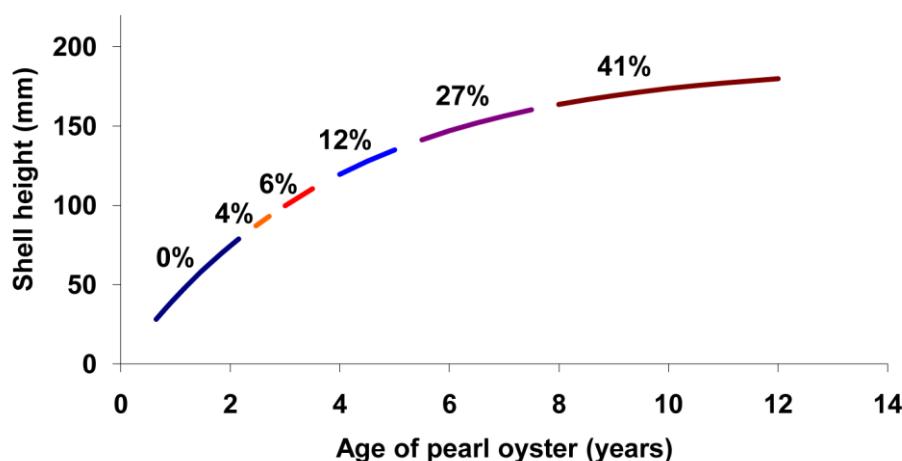


Figure 12 Proportion des huîtres perlées de sexe femelle (*Pinctada margaritifera*) en fonction de l'âge et de la taille. Données obtenues à partir de différentes populations naturelles et d'élevage en Polynésie française. (Chávez-Villalba et al. 2011).

Cependant, bien que ces observations conviennent à l'hermaphrodisme séquentiel, Thielley (1993) a montré que des changements de sexe de femelle à mâle peuvent se produire lorsque les conditions, qu'elles soient naturelles (température et nourriture) ou artificielles (manipulation et nettoyage), étaient stressantes, ce qui correspondrait plutôt à de l'hermaphrodisme alternatif. Ainsi, un déséquilibre du sex-ratio en faveur des mâles est retrouvé pour les populations en élevage (Pouvreau et al. 2000b; Le Moullac et al. 2012). Des individus bisexués (en cours d'inversion sexuelle) ou encore indifférenciés, sont rarement rencontrés, ce qui suggère que ces processus de changement de sexe ou d'arrêt de production de gamètes surviennent très rapidement.

P. margaritifera est une espèce qui se reproduit tardivement par rapport aux autres Ptériidés. La maturité sexuelle est atteinte à la fin de sa première année (pour une hauteur d'environ 40 mm) avec un développement gonadique plus important lors de la deuxième année (Thielley 1993; Pouvreau et al. 2000b). La gamétogénèse est rapide et dure environ 1 mois. Thielley (1993) propose 3 phases dans sa

description du développement de la gonade : la phase immature, la phase de développement et la phase de régression (Figure 13).

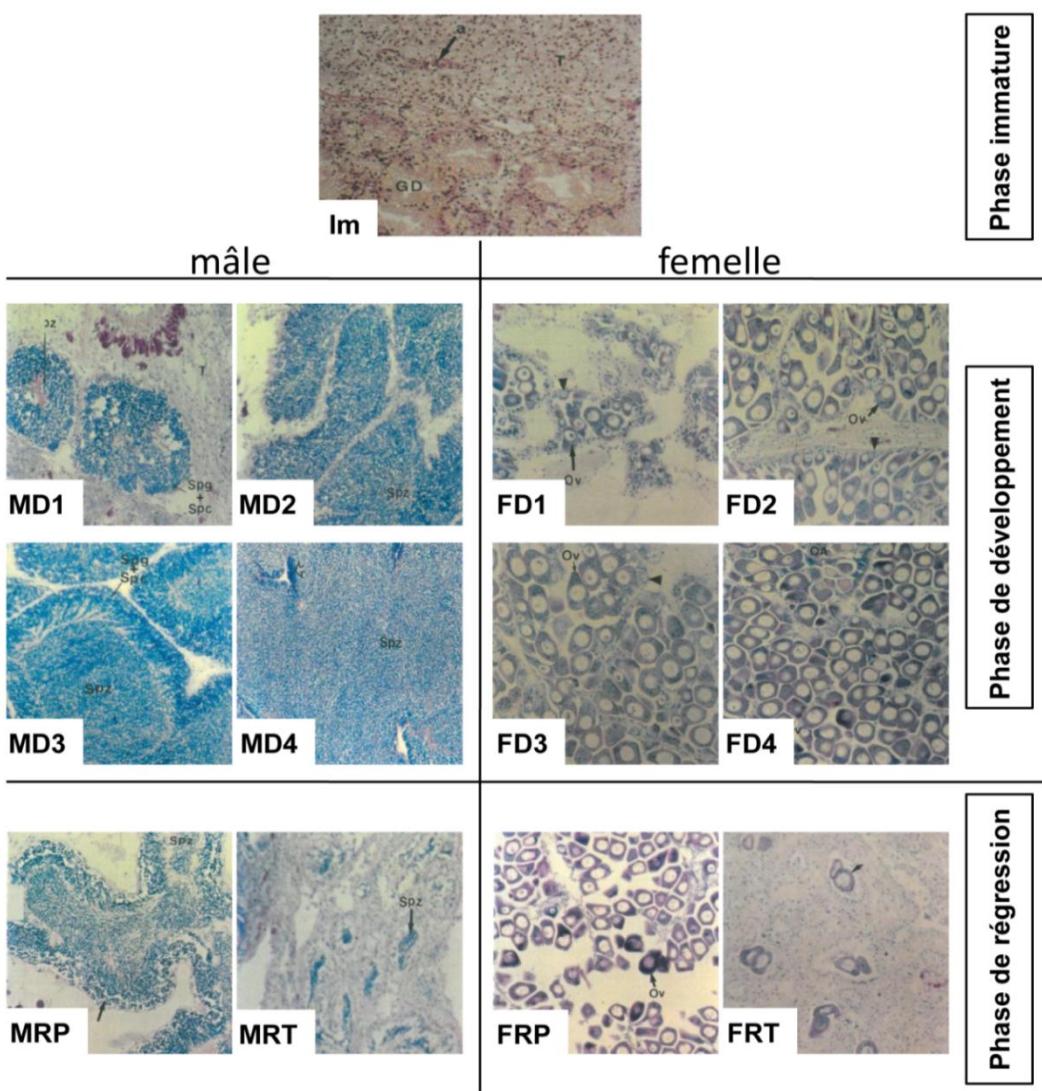


Figure 13 Stades de développement de la gonade de *P. margaritifera* décris par Thielley (1993). La gaméto-génèse est divisée en 3 phases : la phase immature ou indifférenciée (stade « Im »), la phase de développement de la gonade (4 stades « D ») et la phase de régression (stades « R »). Spg : Spermatogonies, Spc : Spermatocytes, Spz : Spermatozoïdes, Ov : Ovocytes, OA : Ovocytes atrétiques, ► : Ovocytes en début de développement, a : acini, GD : Glande digestive. (Schéma élaboré à partir des planches de Thielley).

La phase immature « Im » est caractérisée par une gonade indifférenciée, les tubules gonadiques rarement discernables ne contenant que des cellules souches germinales.

La phase de développement de la gonade comprend 4 stades, D1, D2, D3, et D4 que ce soit chez les mâles ou les femelles. Durant le stade D1, les tubules alors observables sont de petites dimensions et dispersés dans le tissu conjonctif. À l'intérieur des tubules on observe une prédominance des spermatogonies ou des ovogonies. Lors du stade D2, les tubules sont plus volumineux qu'au stade précédent, d'où une réduction du tissu conjonctif inter-gonadique. Ils renferment alors des spermatogonies et des spermatocytes formant une large couronne chez les mâles, et principalement des

ovocytes pré-vitellogéniques ou en début de vitellogenèse chez les femelles. Le stade D3 est quant à lui caractérisé par la présence de tubules bien volumineux et un tissu conjonctif très réduit. Chez les mâles, les spermatozoïdes sont très nombreux et occupent la majeure partie de la lumière alors que chez les femelles, les ovocytes en fin de vitellogenèse apparaissent très nombreux. Enfin le stade D4 correspond à la gonade mature. Les tubules sont turgescents et le tissu conjonctif est pratiquement inexistant. Les spermatozoïdes et les ovocytes matures ou proches de la maturité occupent totalement la lumière des tubules.

Deux stades peuvent être observés durant la phase de régression qui marque généralement la fin d'un cycle. La régression est partielle « RP » quand la gonade ne s'est pas totalement vidée. Les tubules légèrement rétractés prennent une forme irrégulière laissant entre eux des espaces dans lesquels le tissu conjonctif pourra se développer. On observe alors un décollement des spermatogonies ou d'ovogonies de la périphérie des tubules. Par contre quand la gonade s'est entièrement vidée, l'huître est au stade de régression totale « RT ». Les tubules sont alors bien rétractés et il ne reste plus que quelques spermatozoïdes résiduels ou ovocytes en dégénérescence.

Les nombreux travaux sur le déterminisme environnemental de la reproduction des bivalves en milieu tempéré ont montré que la température avait une influence majeure sur le déclenchement des différentes phases du cycle de reproduction : repos sexuel, maturation et ponte (Sastry 1979; Bayne et Newell 1983; Gervis et Sims 1992; Fabioux et al. 2005) et que la disponibilité trophique avait une influence sur l'effort de reproduction et sur la qualité des gamètes (MacDonald et Thompson 1986; Ruiz et al. 1992; Saucedo et al. 2002; Enríquez-Díaz et al. 2009). Dans les lagons polynésiens, et plus largement en zone tropicale, le cycle saisonnier est beaucoup moins marqué en raison des faibles variations de températures (26–32°C). En conséquence, comme chez d'autres bivalves tropicaux, *P. margaritifera* présente un fort asynchronisme des stades de maturité non seulement entre les individus à l'échelle de la population mais aussi au sein même de la gonade à l'échelle de l'individu. Cette caractéristique rend difficile l'établissement d'un diagnostic précis du stade de maturité sexuelle d'un individu. En effet, un nouveau cycle de gamétopénie s'initie avant même que le précédent ne se termine (Thielley 1993). Chez cette espèce, la gamétopénie serait continue avec des pontes pouvant donc survenir durant toute l'année. Toutefois, de récents travaux ont mis en évidence une relation étroite entre la gamétopénie et la richesse trophique du milieu (Fournier et al. 2012b). Ainsi, de fortes concentrations de phytoplancton favoriseraient la maturation et la synchronisation des émissions de gamètes. Au contraire, une sous-alimentation semble diminuer voir même arrêter totalement l'activité germinale empêchant alors toute reprise de la gamétopénie de façon temporaire (Le Moullac et al. 2013). Le cycle de maturation de la nacre semble ainsi lié aux conditions trophiques du milieu avec une possibilité de compenser les périodes de diminution de la nourriture par une régression des produits génitaux ou atrésie, sous l'action de nombreuses cellules macrophagiques (Thielley 1993). Cet opportunisme se caractérise aussi par une faible mise en réserve.

PARTIE I

**De l'analyse transcriptomique de la gonade à l'identification de
gènes biomarqueurs du sexe**

Introduction

L'hermaphrodisme protandre de *Pinctada margaritifera* apparaît comme une limite pour la production de familles d'intérêt en écloserie dans un contexte d'amélioration génétique. En effet, cette sexualité particulière pose le problème du temps de génération pour le renouvellement des lignées d'huîtres car en moyenne il faut attendre 4 à 5 ans avant de disposer d'un nombre significatif de femelles pour produire une descendance (Chávez-Villalba et al. 2011). Il devient donc nécessaire de maîtriser le sex-ratio pour la gestion des géniteurs. Cette maîtrise passe par la connaissance et la compréhension des mécanismes contrôlant le sex-ratio et en particulier le sexe femelle.

Au sein du règne animal, quelque soit le mode de déterminisme sexuel, une cascade moléculaire d'activation et/ou d'inhibition de gènes est mise en jeux permettant la différenciation sexuelle des cellules germinales dans le sens mâle ou femelle (Piferrer et Guiguen 2008). Ainsi, la compréhension du déterminisme sexuel d'un organisme passe tout d'abord par la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeux.

Depuis la découverte de *Sry* chez les mammifères (Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991), d'autres gènes majeurs du déterminisme du sexe ont été décelés chez divers vertébrés. Ces gènes majeurs, se trouvant au sommet des cascades moléculaires, orientent la différenciation gonadique pour une voie mâle ou femelle. Au sein de ces cascades de nombreux gènes clés secondaires ont été identifiés tels que *Sox9* et *Foxl2*, capitaux pour la différenciation testiculaire et ovarienne, respectivement (Kent et al. 1996; Ottolenghi 2005). Bien que ces cascades et les gènes impliqués soient ainsi bien connus chez les vertébrés et invertébrés modèles, les données sur le déterminisme sexuel incluant les voies moléculaires chez les mollusques bivalves, présentant des caractéristiques hermaphrodites, restent rares.

Chez *Pinctada margaritifera* aucune donnée ou étude sur la reproduction au plan moléculaire n'a été répertoriée. Dans ce contexte, une approche transcriptomique globale a été mise en œuvre dans le cadre de ce travail, afin d'étudier les mécanismes moléculaires du déterminisme et de la différenciation sexuelle chez cette espèce hermaphrodite protandre. Cette approche transcriptomique s'est déroulée en 2 phases. La première phase (**Chapitre 1**) a consisté à obtenir et explorer le transcriptome de la gonade de *P. margaritifera* pour l'identification de gènes candidats potentiels impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle. La deuxième phase (**Chapitre 2**) a été focalisée sur la recherche de gènes biomarqueurs de la sexualisation. Elle a été menée à partir des données transcriptomiques générées lors de la première phase.

Dans le **Chapitre 1** nous avons analysé l'ensemble du transcriptome de la gonade de *Pinctada margaritifera* par méthode RNAseq et comparé les profils d'expression transcriptomique obtenus dans les gonades de sexe et stades gamétogéniques différents afin de i) fournir une meilleure

compréhension des mécanismes moléculaires agissant dans le dimorphisme sexuel des huîtres perlières et ii) identifier des gènes codant pour des protéines impliquées dans la différenciation sexuelle et potentiellement dans le déterminisme du sexe ainsi que dans le développement gonadique. Pour cela, le transcriptome de la gonade a été séquencé à partir de 36 échantillons gonadiques de sexe et de stades de développement différents déterminés par méthode histologique. Il a été ensuite assemblé et annoté à partir de nombreuses bases de données génomiques dont celles de l'huître creuse *C. gigas* (Zhang et al. 2012) et de l'huître perlière *P. fucata* (Takeuchi et al. 2012) récemment disponibles. Ces bases permettent ainsi, par homologie de séquence, d'identifier les gènes d'intérêt. Puis une analyse de l'expression différentielle des données quantitatives d'expression a été réalisée permettant de révéler les gènes spécifiquement exprimés en fonction du sexe ou du stade.

Dans le **Chapitre 2** nous avons ré-analysé l'expression différentielle des données de quantification issues du transcriptome afin de dresser une courte liste de gènes candidats biomarqueurs potentiels de la voie de sexualisation. Cette nouvelle analyse a été réalisée avec des seuils statistiques beaucoup plus stricts permettant de se soustraire des gènes peu différemment exprimés entre les catégories de gonades considérées. Ces candidats ont ensuite été analysés par PCR en temps réel dans de nouveaux échantillons gonadiques de sexe et de stades de développement différents dans le but de les valider en tant que biomarqueurs. L'objectif de cette approche a été d'identifier et de proposer des signatures moléculaires de la voie sexuelle utiles pour des études futures sur la reproduction de l'huître perlière *P. margaritifera* et en particulier sur la différenciation sexuelle et le changement de sexe.

Chapitre 1: Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera* : Identification of potential sex differentiation and sex determining genes

Vaihiti Teaniniuraitemoana¹, Arnaud Huvet², Peva Levy¹, Christophe Klopp³, Emeline Lhuillier⁴, Nabila Gaertner-Mazouni⁵, Yannick Gueguen¹, Gilles Le Moullac^{1*}

BMC Genomics (2014) 15:491

¹ Ifremer, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 7004, 98719 Taravao, Tahiti, Polynésie Française

² Ifremer, UMR 6539 LEMAR, BP 70, 29280 Plouzané, France

³ INRA, Sigenae, UR875, Auzeville, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ GeT-Purpan, GenoToul, UDEAR UMR 1065 CNRS/UPS / U1056 INSERM, CHU PURPAN, Place du Dr Baylac, TSA 40031, 31059 Toulouse Cedex 9, France

⁵ Université de la Polynésie Française, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 6570, 98702 Faa'a, Tahiti, Polynésie Française

Abstract

Background

Black pearl farming is based on culture of the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, lophotrochozoa), a protandrous hermaphrodite species. At first maturation, all individuals are males. The female sex appears progressively from two years old, which represents a limitation for broodstock conditioning for aquaculture production. In marine mollusks displaying hermaphroditic features, data on sexual determinism and differentiation, including the molecular sex determining cascade, are scarce. To increase genomic resources and identify the molecular mechanisms whereby gene expression may act in the sexual dimorphism of *P. margaritifera*, we performed gonad transcriptome analysis.

Results

The gonad transcriptome of *P. margaritifera* was sequenced from several gonadic samples of males and females at different development stages, using a Next-Generation-Sequencing method and RNAseq technology. After Illumina sequencing, assembly and annotation, we obtained 70,147 contigs of which 62.2% shared homologies with existing protein sequences, and 9% showed functional annotation with Gene Ontology terms. Differential expression analysis identified 1,993 differentially expressed contigs between the different categories of gonads. Clustering methods of samples revealed that the sex explained most of the variation in gonad gene expression. K-means clustering of differentially expressed contigs showed 815 and 574 contigs were more expressed in male and female gonads, respectively. The analysis of these contigs revealed the presence of known specific genes

coding for proteins involved in sex determinism and/or differentiation, such as *dmrt* and *fem-1 like* for males, or *foxl2* and *vitellogenin* for females. The specific gene expression profiles of *pmarg-fem1-like*, *pmarg-dmrt* and *pmarg-foxl2* in different reproductive stages (undetermined, sexual inversion and regression) suggest that these three genes are potentially involved in the sperm-oocyte switch in *P. margaritifera*.

Conclusion

The study provides a new transcriptomic tool to study reproduction in hermaphroditic marine mollusks. It identifies sex differentiation and potential sex determining genes in *P. margaritifera*, a protandrous hermaphrodite species.

Keywords

Pinctada margaritifera, Gametogenesis, Transcriptome, Differential expression, Sex determinism

1. Background

The black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758; Mollusca, Family Pteriidae) is a benthic bivalve occurring in the Indo-Pacific region, which is particularly abundant in the South Pacific, New Guinea, Hawaiian Islands, and Polynesia (Le Pennec et al. 2010).

As marine bivalves are organisms of major economic interest, research has recently turned its attention to their genomics (Saavedra and Bachère 2006; Ma et al. 2009; Romero et al. 2012). Black pearl farming is based on the culture of *P. margaritifera*, which a natural resource in French Polynesia. Research projects worked to develop ways to increase the pearl quality and to support sustainable development of pearl farming (Gueguen et al. 2013). *P. margaritifera* is a biological model for biomineralization (Joubert et al. 2010; Marie et al. 2012) and reproduction (Pouvreau et al. 2000b; Fournier et al. 2012b); it is a sentinel species in the context of global change (Gueguen et al. 2013) and is also economically important for pearl production, a domain in which genetic selection can now contribute to quality improvement. It has been shown that the pearl aspect/quality is dependent on the genetics of the graft donor oyster (Arnaud-Haond et al. 2007). Thus, the aim of the *P. margaritifera* selection program, is to breed families of graft donor oysters selected for their capacity to produce pearls of quality and/or particular colors and/or rapid growth (Ky et al. 2013). The successful hatching of selected spat depends on the production of gametes and embryos from synchronous breeders raised in laboratory conditions. Controlled reproduction is therefore essential to set up a genetic improvement program. It relies on the knowledge of the underlying physiological mechanisms and factors controlling them (Vahirua-Lechat et al. 2008; Chávez-Villalba et al. 2011; Le Moullac et al. 2013).

Like other pearl oysters, including *P. mazatlanica* (Saucedo and Monteforte 1997), *P. albino sugillata* (Tranter 1958b), *P. imbricata* (Kimani et al. 2006), *P. fucata* (Hwang 2007), and *P. radiata* (Derbali et al. 2009), *P. margaritifera* is a protandrous hermaphrodite species (Tranter 1958a) showing consecutive sexuality because individuals may change gender (from male to female) from the end of their second year onwards (Chávez-Villalba et al. 2011). These observations would better correspond to sequential hermaphroditism. In all cases, simultaneous hermaphrodites and animals with undetermined status were uncommon. Sex ratio is the product of sex determination. The genetic and/or environmental process that establishes the gender of an organism (Penman and Piferrer 2008), leads to specific molecular cascades transforming an undifferentiated gonad into a testis or an ovary (Piferrer and Guiguen 2008). In the animal kingdom, sex determination can be genetic (genetic sex determination, GSD), environmental (environmental sex determination, ESD), or the result of an interaction of both these factors (Valenzuela et al. 2003). In most bivalves, the main environmental factors affecting reproduction, and probably gender, are temperature, food availability (Chávez-Villalba et al. 2003; Dutertre et al. 2009) and, to a lesser degree, photoperiod (Saout et al. 1999). Environment stresses or farming processes were also reported to have important consequences for reproduction. Thielley (1993) showed that gender changed when conditions were stressful, whether these were natural (temperature or food) or artificial (handling or cleaning).

Gender is determined by cascades of molecular signals that trigger differentiation of germinal cells into oocytes or spermatozoids. Since the discovery of *Sry* in mammals (Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991), other master sex-determining genes have been characterized in vertebrates, such as *Dmy/dmrt1Yb*, *DM-W* and *DMRT1* in medaka (*Oryzias latipes*), *Xenopus laevis* and chicken, respectively (Matsuda et al. 2002; Yoshimoto et al. 2008; Smith et al. 2009), and, more recently, *amhy*, *Gsdf*, *Amhr2* and *SdY* in fishes (Kamiya et al. 2012; Hattori et al. 2012; Myosho et al. 2012; Yano et al. 2012). Within these cascades, several genes were identified as playing key roles at a downstream level, including *foxl2* and *sox9* genes, crucial for ovarian and male differentiation, respectively (Koopman 2001; Ottolenghi 2005). In invertebrates, particularly in marine mollusks displaying hermaphroditic features, data on sexual determinism, including molecular sex determining cascades, are rare. In the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*, an alternative hermaphrodite mollusk, two genetic models of 2-genotypes and 3-genotypes have been proposed for sex determination. The first, proposed by Guo et al. (1998), seems to be adequate and applicable to sex determination of *P. margaritifera*, suggesting a dominant male *M* allele and a protandric recessive *F* allele. *FM* oysters are true males (permanent males) and *FF* oysters are protandric males (males that can change into females) depending on other genetic or environmental factors. In the second model, Hedrick and Hedgecock (2010) proposed 3 genotypes: *FF* for true female oysters, *MM* for true male oysters and *FM* for individuals that may mature as females or males. Whatever the model, the authors assumed that sex in *C. gigas* would be controlled by a single, and as yet unknown, major gene. Only a few downstream actors of the molecular cascade of sex determination/differentiation of this species

have been identified, such as *Cg-DMI* for the male pathway, *Cg-foxl2* and its natural antisense transcript *Cg-foxl2os* for the female pathway (Naimi et al. 2009a; Naimi et al. 2009b; Santerre et al. 2012).

In the genus *Pinctada*, no gene has yet been identified as an actor of the molecular cascade of sex determination. Recently, in the draft genome of *Pinctada fucata*, some gene models were identified as encoding reproduction-related genes possibly involved in germline differentiation (Pifuc-*vasa*-like, Pifuc-*nanos*-like) and sex determination (Pifuc-*Dmrt2*), but no evidence was found of their function (Matsumoto et al. 2013).

In the present study, we analyzed the whole gonad transcriptome of the blacklip pearl oyster *P. margaritifera* using Illumina sequencing technology, and compared the means of expression patterns obtained in different sexes and stages of pearl oyster gonad. This study was designed i) to provide a better understanding of the molecular mechanisms underlying the reproductive cycle, and ii) to identify some genes of interest encoding proteins involved in sex determination and gonad development. These results are important resources for future research on reproduction in *P. margaritifera* and other marine hermaphrodite bivalves.

2. Methods

2.1. Animal material and tissue sampling

Five-year-old adult *P. margaritifera* ($n = 150$) from the Takaroa atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia) were grown in the Vairao lagoon for two and a half years and brought to the Ifremer laboratory in Tahiti, French Polynesia, in groups of 20 between July and December 2011. The oyster gonads were immediately dissected. For each oyster, gonad tissues were sampled for RNA extraction and fixed for histology.

First, gonad development stage and sex were determined by histological methods and samples were classified into the ten different categories of gonadic tissues described in Figure 14: male and female at “Early” stage (the gonad is in early gametogenesis; Male: $n = 17$; Female: $n = 14$), “Intermediate” stage (the gonad is developing; Male: $n = 58$; Female: $n = 30$), at “Mature” stage (the oyster is ready to spawn; Male: $n = 6$; Female: $n = 5$), “Regressed” stage (the gonad has stopped generating gametes; Male: $n = 9$; Female: $n = 6$); “Inversion” (the gonad presents male and female gametes together; $n = 2$) and “Undetermined” (the gonad contains no gametes at all; $n = 2$). This classification was inspired by the reproductive scale proposed by Pouvreau et al. (2000). Secondly, in the resulting gonadic bank, 36 samples were selected for this study, according to their representativeness of a gonadic category, with four individuals per sex and stage except for the Inversion and Undetermined categories which were composed of two individuals.

For total RNA isolation and extraction, individual samples of gonadic tissues were conserved in RNAlater™ (Qiagen) (50 mg/mL) and stored at -80°C .

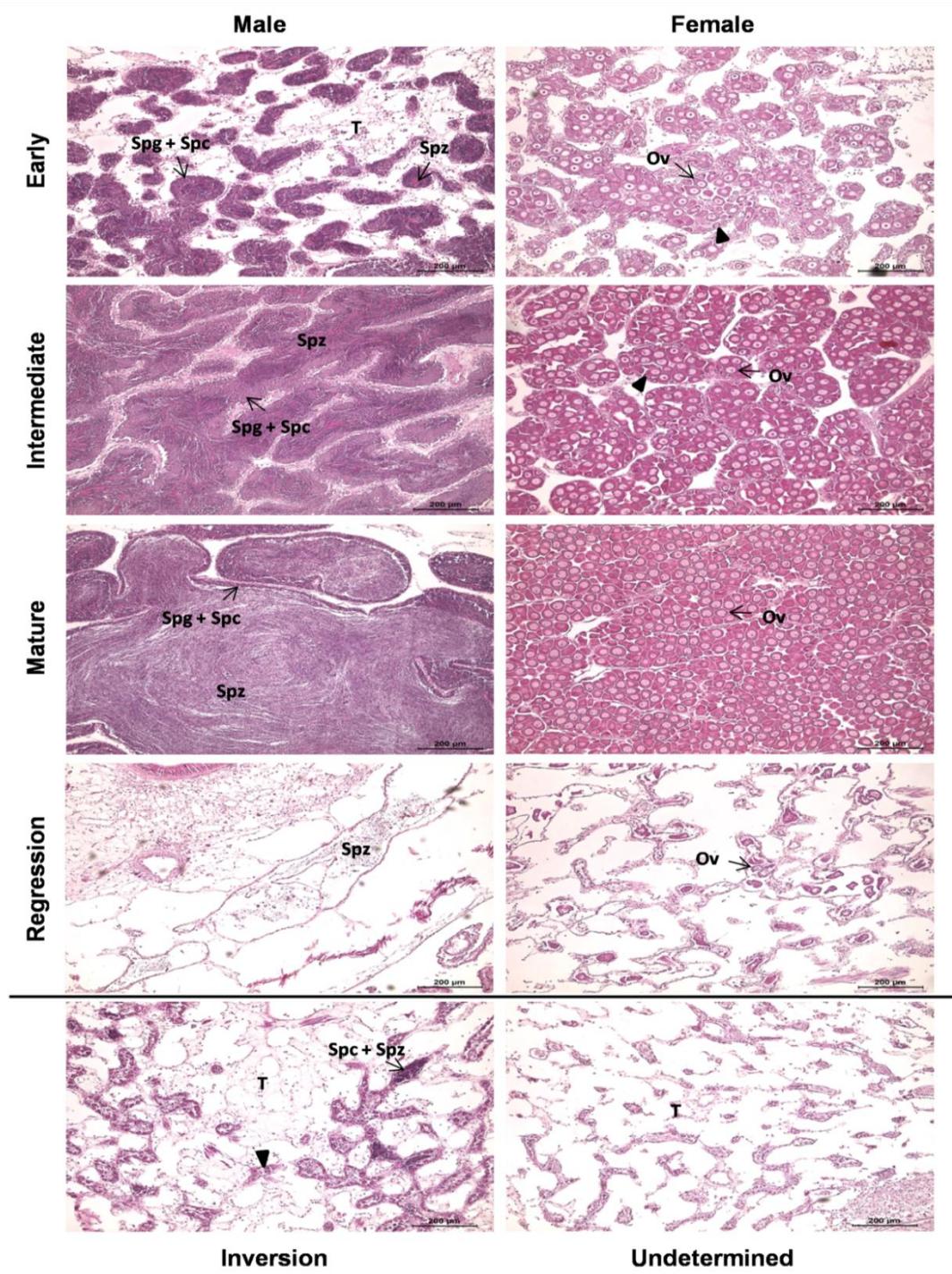


Figure 14 Histological features of the ten categories of *P. margaritifera* gonad. At the early stage, gonadic tubules, surrounded by abundant connective tissue, are less bulky and contain mostly spermatogonia and spermatocytes, and oogonia and oocytes in early development (►), in males and females, respectively. At the intermediate stage, tubules are large and the connective tissue is less abundant. In males, spermatogonia and spermatocytes form a ring at the periphery of tubules, while sperm occupy the central part. In females, oocytes in early development are still numerous (►) and those at the end of vitellogenesis begin to accumulate. At the mature stage, tubules are turgid, spermatozooids fill the entire lumen and spermatogonia and spermatocytes are reduced in number in males. In females, tubules contain only mature oocytes or those close to maturity. Regression stage is characterized by the retraction of tubules, which will then contain some residual spermatozooids in males, and some degenerating oocytes in females. Inversion category characterizes gonads in sexual inversion and thus presents both types of germ cells, male and female. And undetermined gonads are those which have no gametes and cannot therefore be associated with a sex. Ov: oocytes; Spc: spermatocytes; Spg: spermatogonia; Spz: Spermatozoid, and T: Connective tissue.

2.2. RNA preparation

Total RNA was extracted using Extract-all (Eurobio) and treated by RTS DNaseTM (MO BIO Laboratories) following manufacturer's instructions. RNA quality and integrity were checked by lab-on-chips analysis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Because 28S and 18S rRNA fragments co-migrated in bivalves, we changed the threshold "Unexpected Ribosomal Ratio" pre-set at 0.7 to 1 in the software of the Agilent 2100 Bioanalyzer and also visually assessed the total RNA quality as demonstrated in Dheilly et al. (2012). RNA concentration was measured at 260 nm using an ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Samples were stored at -80°C until further use.

2.3. cDNA library construction and Illumina sequencing

The cDNA libraries were made from the total RNA of the 36 individual samples, four individuals of each sex and stage, and two individuals of each undetermined and inversion categories. These RNA samples conformed to the required purity criteria (A_{260}/A_{230} and $A_{260}/A_{280} > 1.8$) and quality levels ($RIN > 8$) for cDNA library preparation for sequencing. The cDNA libraries were constructed using "Truseq RNA Sample Preparation v2" kits (Illumina), according to the manufacturer's instructions. The mRNA molecules containing poly(A) were purified using magnetic poly(T) beads from 1–4 µg of each total RNA sample. A fragmentation buffer was added to break the mRNA into short fragments with an average length of 155 bp (120–210 bp). From these fragments, the first strands were synthesized using random hexamer primer and the second strands of cDNA were then synthesized. After purification and end repair, these short cDNA were ligated to the sequencing adapters (60 bp on each side) and enriched by polymerase chain reaction (PCR, 12 cycles). A range of final cDNA fragments of 320 ± 20 bp was selected using E-GEL SIZESELECT 2% (Invitrogen). The 36 cDNA libraries were normalized and grouped by six in six independent lanes, and finally paired-end sequenced on an Illumina HiSeqTM 2000 at the GeT-PlaGe core facility (Genome and Transcriptome – Plateforme Génomique, Toulouse, <http://www.get.genotoul.fr/>), using TruSeq PE Cluster Kitv3 (2 x 100 bp) and TruSeq SBS Kit v3. All the obtained data were submitted to the Short Read Archive (SRA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in Bioproject PRJNA229186 under the accession number SRP033217.

2.4. Reference gonad transcriptome assembly and annotation

The dataset contains a large number of reads made from gonad tissue in different conditions. To limit the assembly problems encountered during the first tests, using all data at once, a two-step strategy was chosen. First, in order to build highly represented transcripts, 10 million random reads were assembled using ABYSS with k-mer values of 35, 45, 55, 65 and 75. The resulting contigs were filtered according to their length, keeping those longer than 100 bp. The remainders were meta-

assembled with MIRA. In order to keep only highly represented ones, the initial reads were remapped (BWA 0.6.1, Li and Durbin, 2009) on contigs and only the contigs with ≥ 500 aligned reads were kept. This produced 6,905 highly represented contigs, which were then used to filter corresponding reads in every sample read sets. The remaining reads were merged and assembled using the previously presented procedure. Finally, a contigs with over ten reads aligned in at least two samples or more than 50 aligned reads in a sample were filtered. To assess the assembly quality, all read sets were realigned on the contigs and had an alignment rate of at least 80%.

Assembled contigs were then functionally annotated in two ways. First, sequence similarities were sought by blastn/blastx with (i), a cut-off e-value of 10^{-5} against the following databases: *Pinctada fucata* Proteins (<http://marinegenomics.oist.jp/>, Takeuchi et al. 2012), *Crassostrea gigas* Proteins (<http://oysterdb.cn/>, Zhang et al. 2012), UniProtKB/Swiss-Prot Release 2012_06 of 13-Jun-2012, RefSeq Protein Index Blast of 27-Jun-2012, Pfam Release 26.0 of Nov-2011, RefSeq RNA Index Blast of 27-Jun-2012; and (ii), a cut off e-value of 10^{-2} against the following databases: TIGR Fugu FGI 3.0, TIGR ZebraFish ZGI 18.0, UniGene Fugu Build #9, UniGene Human Build #232, UniGene ZebraFish Build #125, Ensembl Ciona Transcripts CSAV2.0 67, Ensembl Fugu Transcripts FUGU4 67, Ensembl Human Transcripts GRCh37 67, Ensembl Tetraodon Transcripts TETRAODON8 67 and Ensembl ZebraFish Transcripts Zv9 67. Second, a Gene Ontology term (GO; <http://www.geneontology.org/>) was assigned if the best hits were already associated.

2.5. Detecting Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) and Simple Sequence Repeats (SSRs)

The bam file produced for quantification were first filtered to eliminate poorly aligned sequences using an alignment quality threshold of 30 and a PCR duplicate filtering step (samtools v. 0.1.19-44428 cd). The read group information was added to each file by using picard tools (v. 1.88). To improve the variation calling, the alignment were reprocessed to re-align reads on medium size deletion spots and the base pair quality values of reads were recalibrated using GATK (v2.4-9-g532efad). All alignment files were jointly processed by GATK UnifiedGenotyper to produce the INDEL and the SNP formatted variant files (VCF). In addition, RepeatMasker v. open-3.3.0 (Smit and al., unpublished data, <http://www.repeatmasker.org/>) was used to identify and localize simple sequence repeats (SSR or microsatellites) motifs. All type of SSRs from dinucleotides to hexanucleotides were searched using default settings (minimum total length = 20 bp).

2.6. Sequences analysis

The amino acid sequences of invertebrates and vertebrates were aligned using ClustalW v2 software (Larkin et al. 2007) and neighbor-joining trees with bootstrap values were constructed for phylogenetic analyses using the MEGA v6 software (Tamura et al. 2013). All the reference sequences

for phylogenetic analyses were retrieved from GenBank and their corresponding accession number are listed in Additional file 1 (*Table S1*).

2.7. Differential expression (DE) analysis

Differential level expression of contigs between the ten different gonadic categories was tested using the DESeq package v1.11.3 (Anders and Huber 2010) by use of the negative binomial distribution and a shrinkage estimator for the distribution's variance. The analysis was performed after library normalization (function *estimateSizeFactor*) of the contigs count table (RNAseq quantification, Additional file 2: *Table S2*), and following the standard procedure. Contigs considered as statistically significant differentially expressed were those showing an absolute value of Log2FoldChange > 2 i.e., exhibiting a fourfold increased expression under one of the conditions; and a *padj* < 0.001, p-value adjusted with a false-discovery rate (FDR) correction for multiple testing by Benjamini-Hochberg method (Benjamini and Hochberg 1995).

A principal component analysis (PCA), using MeV v4.8.1 (MultiExperiment Viewer) (Howe et al. 2011) and a hierarchical clustering were applied to samples to cluster them according to the similarity of expression pattern of the statistically significant differentially expressed contigs. In addition, a K-mean clustering was performed, using R, on differentially expressed contigs, in order to cluster them based on similarity of expression between the different categories of pearl oyster gonads. The algorithm was set with ten centers ($k = 10$) corresponding to the number of gonadic categories.

2.8. Real time PCR

In order to validate RNAseq data and expression profiles obtained from the DESeq analysis, real-time PCR was performed on 14 genes on the same samples. Among these genes, 11 were differentially expressed between the ten gonadic categories and distributed in different expression profiles; the remaining three genes did not show statistically differences in expression. Approximately 2.5 µg of total RNA of each sample obtained as previously described, were reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase and amplified by real time PCR. The amplification reaction contained 5 µL 2X SYBR green qPCR Mix, 1 µL cDNA template, and 2 µL of each primer (1 µM) in a final volume of 10 µL. Each run included a positive cDNA control (reverse-transcribed pool of 0.5 µg total RNA of each sample) and a blank control (water) for each primer pair. Gene relative expression levels were calculated using 2 reference genes, ef1a and gapdh1, by the delta method (Livak and Schmittgen 2001), as follows: Relative expression(target gene, sample x) = $2^{-(Ct_{target\ gene,\ sample\ x} - Ct_{reference\ gene,\ sample\ x})}$. The relative stability of ef1a and gapdh1 combination, considering the sex and reproductive stage of each gonad sample, was confirmed by using NormFinder (Andersen et al. 2004). A PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the cDNA control

to ensure that E ranged from 90 to 110%. The primers used for amplification are listed in Additional file 3 (*Table S3*).

3. Results

3.1. Sequencing and assembly of the reference gonad transcriptome

To provide global view of the transcriptional changes between the ten pearl oyster gonadic categories, we assembled a reference gonad transcriptome *de novo*. To maximize the diversity of transcripts, the 36 cDNA libraries were sequenced and assembled together. Thus, Illumina sequencing generated 2,125,798,302 raw reads of 100 bp which after the assembly formed 70,147 contigs ranged from 100 to 17,424 bp with an average length of 1,294 bp (Table 2).

Table 2 Summary statistics of *P. margaritifera* gonad transcriptome sequencing, assembly and annotation.

	Number	Percentage
Reads		
Total number	2125798302	
Number of base pairs	214705628502	
Length (bp)	100	
Average insertion size (bp)	198	
Assembly		
Number of contigs	70147	
Number of base pairs	90799729	
Number of GC base pairs	33298120	36.7%
Mapping rate of reads		91.8%
Average coverage of contigs (reads)	773.3	
Average coverage of contigs (rpkm)	9.8	
Average length of contigs (bp)	1294	
N50 of contigs (bp)	1948	
Longest contig (bp)	17424	
Shortest contig (bp)	100	
Annotation		
Unannotated contigs	26531	37.8%
Annotated contigs	43616	62.2%
Best hits (Hits):		
- <i>P. fucata</i> proteins	23522 (33448)	53.9% (76.7%)
- <i>C. gigas</i> proteins	9517 (23154)	21.8% (53.1%)
- Swissprot	362 (18736)	0.8% (43%)
- RefSeqProtein	2205 (22261)	5.1% (51%)
- RefSeq RNA	177 (5265)	0.4% (12.1%)
- Otherdatabases	7833 (19131)	18% (43.9%)

3.2. SNP and SSR discovery

Using GATK UnifiedGenotyper, we were able to identify 3,667,510 SNPs and 192,406 indels from 68,132 contigs. The overall frequency of all types of SNPs, including indels, was one per 23 bp (distributions presented in Figure 15). Transition occurred 1.5 times more frequently than transversion. A/T was the most abundant transversion (15.3%) and C/G (5.1%) the least abundant. Moreover, indels were less frequent than both transitions and transversions, with a frequency of one per 365 bp and a total proportion of around 5%.

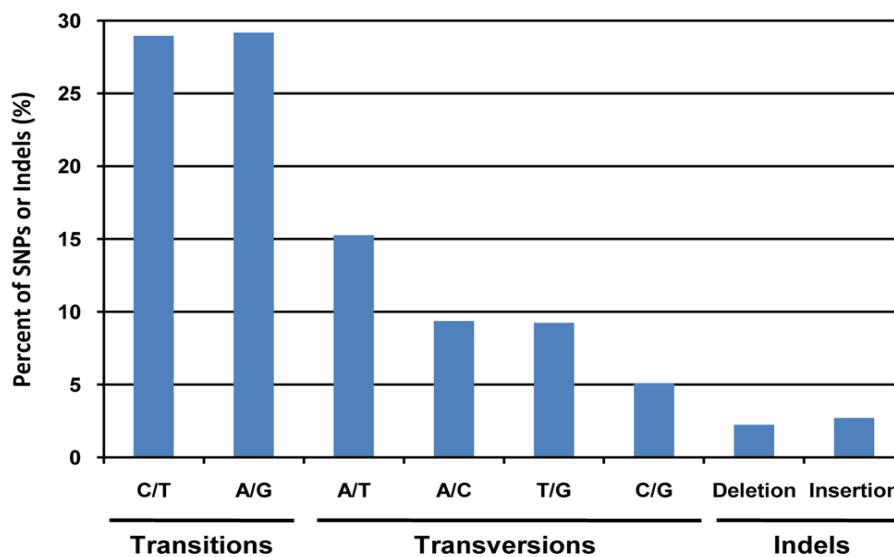


Figure 15 Classification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) including indels from the *P. margaritifera* gonad transcriptome. Distribution (%) of each SNP and indel type. The overall frequency of all types of SNPs including indels was one per 23 bp.

In addition, using RepeatMasker, we identified 7,573 total SSRs from the gonad transcriptome of *P. margaritifera*, with a total number of 196 motifs (Table 3). Tetranucleotide repeats were the most frequent type, counting a total number of 4,259 (56.2%) with (CAGA)n as a major motif accounted for 33.5% of all tetranucleotide repeats. In the remainder, two groups with similar frequency were distinguished: one of di- and trinucleotides, which accounted for 30% of all SSRs, and one of penta- and hexanucleotide repeats, which accounted for less than 15% of all SSRs.

Table 3 Summary of simple sequence repeat (SSR) types in *P. margaritifera* gonad transcriptome.

SSR Type	Number of motifs	Count	%	Major motif	Count	%
Dinucleotides	6	1098	14.5	(GA)n	245	22.3
Trinucleotides	19	1151	15.2	(ATG)n	227	19.7
Tetranucleotides	52	4259	56.2	(CAGA)n	1426	33.5
Pentanucleotides	98	651	8.6	(TTTG)n	69	10.6
Hexanucleotides	21	414	5.5	(CATATA)n	93	22.5
Total	196	7573				

3.3. Functional annotation

Blastx/Blastn searches of the 70,147 contigs with the different databases revealed 43,616 (62.2%) with significant matches to existing protein sequences. Among these, 33,448 (53.9%) presented best hits with *Pinctada fucata* proteins, 9,517 (21.8%) with *Crassostrea gigas* proteins, and 2,744 with the three generic databases Swiss-Prot (362; 0.8%), RefSeq Protein (2,205; 5.1%) and RefSeq RNA (177; 0.4%) (Table 2).

Gene ontology (GO) assignment was carried out on contigs in order to categorize the transcripts by putative function. Of 70,147 contigs, 6,394 (9%) were assigned with one or more GO term. Finally, 311,086 GO assignments were obtained, with a total of 10,001 GO terms. The assignments fall into the three major GO functional domains. Thus, among the 9%, 4,751 (74%) are involved in biological process, 5,498 (86%) are cellular components and 5,415 (85%) have molecular functions (Figure 16). Moreover, 4.6% (i.e., 220 contigs) were assigned to the biological process Reproduction.

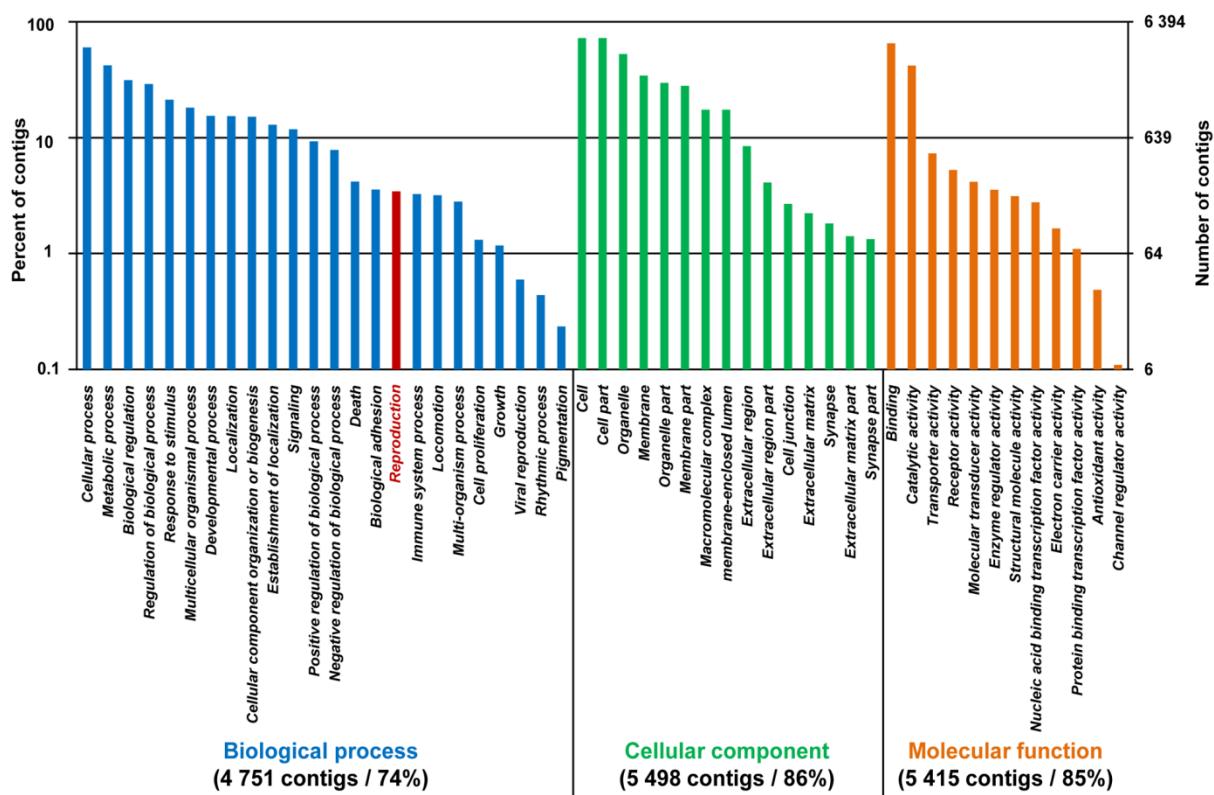


Figure 16 Gene Ontology (GO) annotation of *P. margaritifera* contigs. Distribution (%) of GO terms among the annotated contigs. GO ontologies are represented as general function categories. Among the 6,394 contigs with GO assignation, 4,751 (74%) are involved in biological process, 5,415 (85%) have a molecular function and 5,498 (86%) correspond to cellular component. In biological process, 220 (4.6%) contigs are implicated in reproduction.

3.4. Genes related to sex determination/differentiation and gametogenesis

Of the 43,616 annotated contigs, a catalogue of 87 encoded for 67 putative proteins involved in sex determination/differentiation and gonad development (Additional file 4: *Table S4*). The functions of

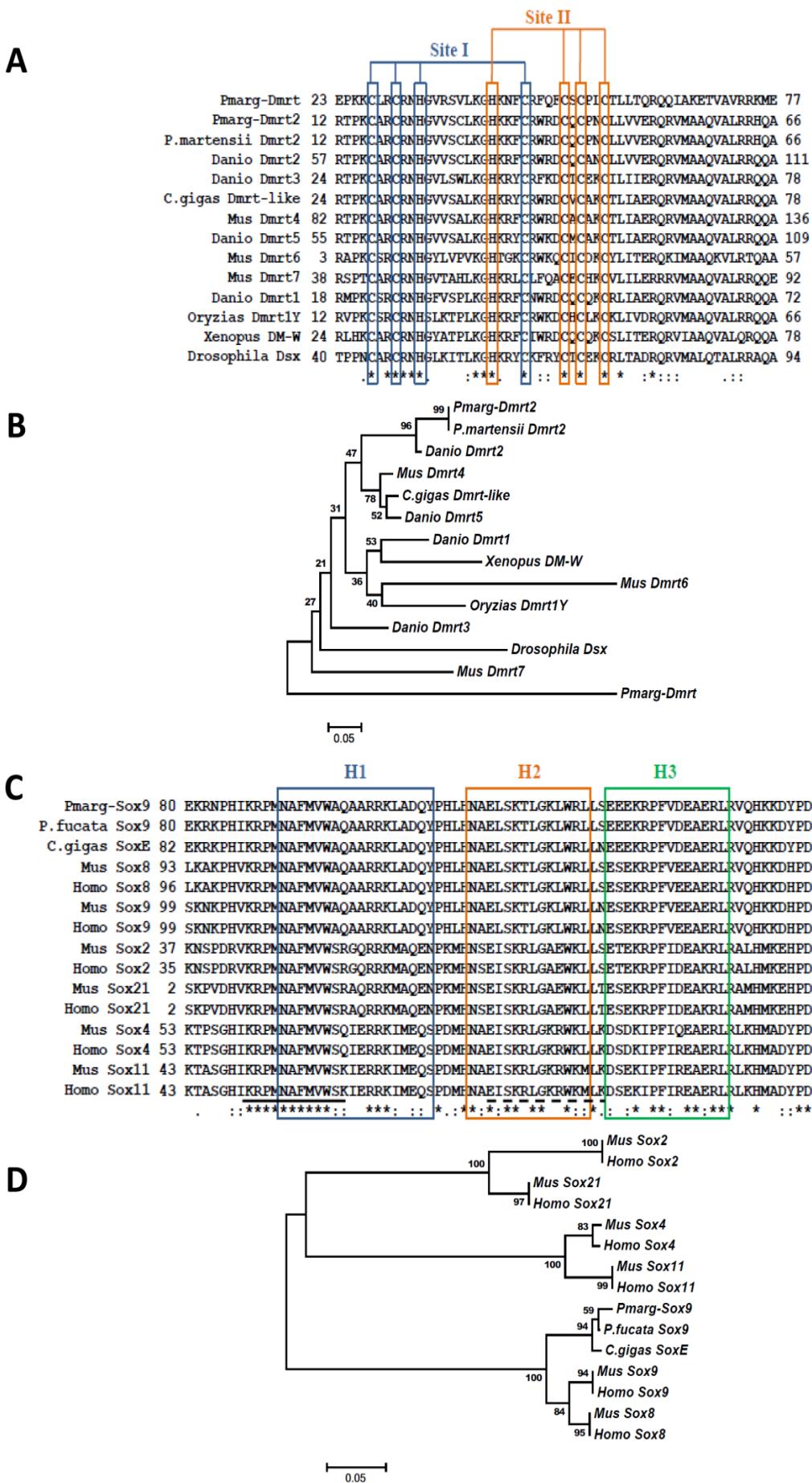
these genes are unknown in *P. margaritifera* but most of them had already been identified as playing an important role in these mechanisms in other organisms. For example, the relevant genes included *dmrt*, *sox9*, *fem-1* and *foxl2* as genes encoding proteins involved in sex determination/differentiation (Doniach and Hodgkin 1984; Ottolenghi 2005; Kanai et al. 2005; Kopp 2012), or genes encoding for proteins implicated in oogenesis and spermatogenesis as vitellogenin and testis-specific serine/threonine protein kinase, respectively (Wallace 1985; Kueng et al. 1997).

Doublesex- and mab-3-related transcription factor

Two transcripts encoding orthologs of the DM domain transcription factor were identified: a complete one of 993 bp (Contig_44478) with an open reading frame (ORF) of 825 bp, and a partial one of 1,073 bp (Contig_639) without an ATG codon but with a TGA stop codon at position 988 bp. The deduced amino acid sequences are 280aa and 329aa long, respectively, and contain the DM domain consensus sequence (from aa 12 to 66, Contig_44478; from aa 23 to 77, Contig_639) with conserved cysteines and histidines characteristic of the DMRT protein family (Figure 17A). From sequence comparison of conserved DM domains among various members of *Dmrt* family, our first *P. margaritifera* sequence was seen to share the highest amino acid identity with *P. martensii dmrt2* and zebrafish *Dmrt2* (100% and 95%, respectively), and the second with *P. martensii dmrt2* and mouse *Dmrt4* (59% and 58%, respectively). The sequence comparison reveals a conserved zinc module consisting of intertwined CCHC and HCCC Zn²⁺-binding sites (Naimi et al. 2009a). The phylogenetic tree generated using the compared DM domains (Figure 17B) provided that the first *P. margaritifera dmrt* is grouped with *Dmrt2* with high bootstrap support (91) whereas the second is grouped with no family members; thus, we named them, *pmarg-dmrt2* and *pmarg-dmrt*, respectively.

SRY (sex determining region Y)-box

A complete transcript of a *Sox* ortholog of 2,327 bp (Contig_10720) shows an ORF of 1,392 (ATG: position 196 bp; TGA: position 1,585 bp). The deduced amino acid sequence is 463aa long and contains an HMG domain with two nuclear localization signals (NLS) and one nuclear export signal (NES) (Figure 17C). The amino acid sequence comparison of HMG domains from the *P. margaritifera* Sox and members of the SOX family revealed that *P. margaritifera sox* shared the highest identity rates with the *P. fucata Sox9* (99%), the Pacific oyster *SoxE* (*Cg-SoxE*, 98%), the human and the mouse *Sox8* and *Sox9* (93% and 91%, respectively). The phylogenetic tree generated using the compared HMG domains (Figure 17D) shows that *P. margaritifera sox* forms a group with *Cg-SoxE* and *P. fucata Sox9*, which is more closely related to the SoxE members (*Sox8* and *Sox9*) with high bootstrap support (100). *P. margaritifera sox* does not cluster with vertebrate *Sox8* or *Sox9*, but comparison of complete sequences shows, after *Cg-soxE* and *P. fucata Sox9*, maximal homology and identity (e-value: 2.10⁻⁸⁵, identity: 51%) with the human *Sox9*. This transcript was named *pmarg-sox9*.

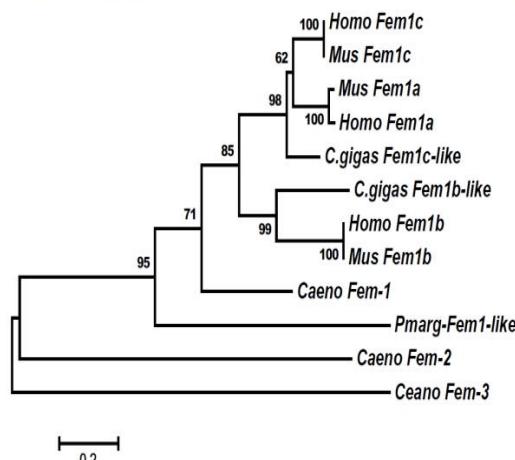


E

4 consecutive ankyrin repeats

Homo	Fem1c	107	ASVNNNTLTLN-STPLRAACFDGHLETVKYLV-EHKADIEVNRSNRGHTCLMISCY-----	KGHKEIAQYLLEKGADVNRSKVKGNTALHDCAESGSIDLIMKLIMYCAK-MEKOGYGTMPLLSASVTGHTNIVFTHH	236
Mus	Fem1c	107	ASVNNNTLTLN-STPLRAACFDGHLETVKYLV-EHKADIEVNRSNRGHTCLMISCY-----	KGHKEIAQYLLEKGADVNRSKVKGNTALHDCAESGSIDLIMKLIMYCAK-MEKOGYGTMPLLSASVTGHTNIVFTHH	236
Mus	Fem1a	107	ASVNRTRTRN-STPLRAACFDGHLDVVRVLVGEHKADIEVNRSNRGHTCLMISCY-----	KGHREIARYLLERGAQNRRSAGKNTALHDCAESGSLEIQLLQLLCHAR-MEKOGYGTMPLLAASVTGHTNIVEYIQQ	237
Homo	Fem1a	107	ASVNRTRTRN-STPLRAACFDGHLDVVRVLVGEHKADIEVNRSNRGHTCLMISCY-----	KGHREIARYLLERGAQNRRSAGKNTALHDCAESGSLEIQLLQLLCHAR-MEKOGYGTMPLLAASVTGHTNIVEYIQQ	237
C.gigas	Fem1c-like	107	SGVNNTTFTN-STPLRAACFDGHLETVKFLV-EHKADIEVNRSNRGHTCLMISCY-----	KGHKDIAKFTLLELGADVNRSKVKGNTALHDCAESGSIDLIMKLKFNAR-MEKOGYGTMPLLAASVAGYSKEVETITR	236
Homo	Fem1b	112	ANWNETTFTN-STPLRAACFDGRDLVKYLV-ENNANISIANKYDNTCLMIIAY-----	KGHDTDVRYLLEQRADPNAAKGATALHFEEAHGHDIDVKELIKWRAA-IVVNGHGMTPKVAAESCKADWELLSH	241
Mus	Fem1b	112	ANWNETTFTN-STPLRAACFDGRDLVKYLV-ENNANISIANKYDNTCLMIIAY-----	KGHDTDVRYLLEQRADPNAAKGATALHFEEAHGHDIDVKELIKWRAA-IVVNGHGMTPKVAAESCKADWELLSH	241
C.gigas	Fem1b-like	122	ADVNHAKTN-STPLRAACFDGRDLVQVCLV-EHGADISIPNKVNNTCLMITSY-----	KGHAEVRYLLEKGANGPDSIATCAGATAMIFAEAGHIEWVLDVFRYIK-QIPNDYGMTPILVAECQGSVSEWFITTK	251
Caeno	Fem-1	114	ADVNPATNTX-STPLRGACTDGHLDVKYL - EKGADPHI PNRSNRGHTCLMISY-----	RNKV/GIVEELKTGDIVNKKTERGTNALHDAESGNVEVVKILLKHSV-IMDIOQWDPMGLAALSGFLDVLNVIADQ	243
Pmary-Fem1-like	122	YDVNYKMPSSGLTLFLCACLSSDKALITYMI - KKGADVFLRTRNGSDPPLYLATYGVNSRQPDFSLITELVKGCCGVNTQNFSGTPLHRASKGDVVRVIAKLLKGADPYLCSKSGYIPIPDALSAGHEAWEVLIQIK	259		
Caeno	Fem-3	119	---MKTIVTYCNFMDLARRNGKVQTTRFELQPLHRIEERFRYMFYRQFLPNPDPNCTAFSNEYTSLLTLYTFNIP-GMPFWNNSQMYNAATGRQLVUNIAFYPPFEWPNEDESKYHTTFVPRGTEFSKFYARR	253	
Caeno	Fem-2	117	---PDIVVITSTTEAKKLFLNDKIWAIDKILQNAETCPILSEKWSGIHVSGDQ--	- LKGQHQEDRFLAYPGQMDRGEDPISVLAVPDGHGKGHECSYAAQHLWETLLEVRSRDPDSLQLR-KSLELIDER	248

F



6

		H1	S1	H2	H3	S2	W1	S3	W2			
Pmarg-FoxL2	137	DQKPPYSYVALIAMAIKES	SEKRRLTISG	GIYQIYIINKFPEYYEKKNG	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	GGGERK	GNYWTL	DPAFEDMF	EKGNYRRRRMRRP	237
.gigas FoxL2	124	EQKPPFSYVALIAMAIKES	SEKRRLTISG	IYQFIIINKFPEYYEKKNG	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	GGGERK	GNYWTL	DPAFEDMF	EKGNYRRRRMRRP	224
Mus FoxL2	48	AQKPPYSYVALIAMAIRESA	KRRLTISG	IYQIYIIAKFPEYEKKNG	WQNSIRHNL	SINECF	CIKVPRE	GGGERK	GNYWTL	DPACEDMF	EKGNYRRRRMRRP	148
Homo FoxL2	52	AQKPPYSYVALIAMAIRESA	KRRLTISG	IYQIYIIAKFPEYEKKNG	WQNSIRHNL	SINECF	CIKVPRE	GGGERK	GNYWTL	DPACEDMF	EKGNYRRRRMRRP	152
Mus FoxL1	47	PQKPPYSYIALIAMAIDAP	EPRQVTITNGIYQIF	YIMDRFPEFYHDNRCG	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	KGKPGGSY	WTL	DPRLCDMF	ENGNYRRRKPKP	147
Homo FoxL1	47	PQKPPYSYIALIAMAIDAP	EPRQVTITNGIYQIF	YIMDRFPEFYHDNRCG	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	KGKPGGSY	WTL	DPRLCDMF	ENGNYRRRKPKP	147
Mus FoxE1	53	RGKPPYSYIALIAMAIAHA	PPLRLLTIGGYKFT	ERFPRYDRNPW	WQNSIRHNL	TINDCF	FLKIPRE	AGRPKG	GNYWTL	DPNAEDMF	ESGSFLRRRKPK	153
Mus FoxE3	52	RGKPPYSYIALIAMAIAHALA	PPLRLLTIGGYKFT	ERFPRYDRNPW	WQNSIRHNL	TINDCF	FLKIPRE	AGRPKG	GNYWTL	DPNAEDMF	ESGSFLRRRKPK	162
Mus FoxE1	115	LVRPPYSYSLALIAMAIAHG	PTQLRTISQTYQVADNF	FFYNSKAG	WQNSIRHNL	SINDCF	CFVKVPRE	DDDPKG	GNYWTL	DPNECEKMD	NGFRRRKPKSD	215
Mus FoxC2	69	LVKPPYSYIALITMAIQNA	PEKKITTINGIYQIF	YIMDRFPEFYRENQ	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	DDDKPGK	GSYWTL	DPDSYNMF	ENGFLRRRRFK	169
Homo FoxC2	70	LVKPPYSYIALITMAIQNA	PEKKITTINGIYQIF	YIMDRFPEFYRENQ	WQNSIRHNL	SINECF	CFVKVPRE	DDDKPGK	GSYWTL	DPDSYNMF	ENGFLRRRRFK	170
Mus FoxA1	168	HAKPPYSYISLITMAIQNA	QAPSMLTISEIYQWIMD	LFPEYRQNQQF	WQNSIRHNL	SENDCF	CFVKVAR	SPDKPGK	GSYWTL	HPDSGNMF	CYLRRQRKF	268
Mus FoxG1	171	YEKPPFSYNALIMMAIRQ	SPKRLTITNGIYEFIM	KMNPFYRENQ	WQNSIRHNL	SINKCF	CFVKVPHY	DDDPKG	GNYWMLD	DPSSDDV	FIGGTTGKLR	271
Homo FoxG1	179	YEKPPFSYNALIMMAIRQ	SPKRLTITNGIYEFIM	KMNPFYRENQ	WQNSIRHNL	SINKCF	CFVKVPHY	DDDPKG	GNYWMLD	DPSSDDV	FIGGTTGKLR	279

4

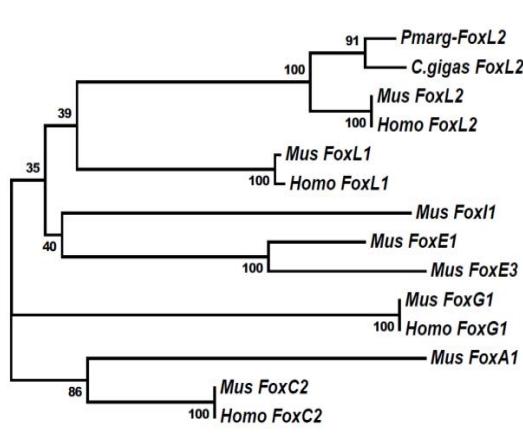


Figure 17 Sequence analysis of four sex determination/differentiation-related genes in *P. margaritifera*. **(A)** Amino acid sequence alignment of *P. margaritifera Dmrt* (Pmarg-Dmrt2, Pmarg-Dmrt) with the DM domain of various DMRT proteins. The zinc module consisting of intertwined CCHC and HCCC Zn²⁺-binding sites is shown with blue (Site I) and orange (Site II) boxes. **(B)** The phylogenetic tree generated using the DM domain of the DMRT proteins. **(C)** Amino acid sequence alignment of *P. margaritifera Sox9* (Pmarg-Sox9) with the HMG domain of various the SOX proteins. The three helices structuring the HMG domain are indicated with blue (H1), orange (H2) and green (H3) boxes. The nuclear export/localization signals (NES and NLS) are indicated in plain and dashed lines, respectively. **(D)** The phylogenetic tree generated using the HMG domain of SOX proteins. **(E)** Amino acid sequence alignment of *P. margaritifera fem1-like* (Pmarg-Fem1-like) with four consecutive ankyrin repeats (blue box) of various FEM proteins. **(F)** The phylogenetic tree generated using four consecutive ankyrin repeats of the FEM proteins. **(G)** Amino acid sequence alignment of *P. margaritifera foxl2* (Pmarg-Foxl2) with the Forkhead domains of various FOX proteins. The putative NLS sequence is underlined. The three helices (H1, H2 and H3; blue boxes), the two wings (W1, W2) and the β-strands (orange boxes) structuring the Forkhead domain are indicated. **(H)** The phylogenetic tree generated using the Forkhead domain of the FOX proteins. Alignments were generated using Clustal W2. Identical amino acids and amino acids with conserved similarities are indicated by asterisks and by dots/colons, respectively. The numbers of amino acid residues at the beginning and at the end of the different domains are indicated. The phylogenetic trees were generated using MEGA v6 via the neighbor-joining method. Numbers in the branches represent the bootstrap values (as a percentage) from 100 replicates. GenBank accession numbers of the reference sequences are listed in Table S1.

Sex determining protein fem

A complete sequence of 2,113 bp (Contig_1317) encoding a Fem ortholog was identified, showing an ORF of 912 bp (ATG: position 28 bp; TAG: position 937 bp). The deduced amino acid sequence is 303aa long and contains ankyrin repeats (four repeats, 122–259 aa) characteristic of the Fem proteins. Relationship between *P. margaritifera* Fem and other Fem proteins characterized in various organisms were investigated by sequence comparison of the four consecutive ankyrin repeats found in this ortholog (Figure 17E). *P. margaritifera* Fem shared highest identity with *C. elegans* Fem-1 (37%). The phylogenetic tree generated using the compared ankyrin repeats (Figure 17F) shows that *P. margaritifera* Fem protein forms an out-group on its own between Fem-2/Fem-3 and the Fem1 family members, to which it is strongly related (bootstrap support: 97). This *P. margaritifera* Fem mRNA was named *pmarg-fem1-like*.

Forkhead box L2

A complete *P. margaritifera* sequence of a Forkhead box ortholog of 1,624 bp (Contig_43072) showing an ORF of 1,134 bp (ATG: position 137 bp; TGA: position 1,269 bp) encodes an aa sequence of 377 bp containing the Forkhead domain consensus sequence (from aa 137 to 237), also known as “winged helix” domain, characteristic of the FOX protein family. The Forkhead domain protein sequence alignment of *P. margaritifera* Fox and members of the FOX family (Figure 17G) indicated that *P. margaritifera* Fox shares the highest aa identity rates with the Foxl2 of the Pacific oyster (95%), mouse and human (92%). The alignment also revealed that the Forkhead domain of Foxl2 proteins is conserved among species including the putative NLS sequences with basic amino acids at the C-terminal end (RRRRRMRR). The phylogenetic tree (Figure 17H) provided evidence that *P. margaritifera* Fox, named Pmarg-Foxl2, is grouped with other Foxl2 with high bootstrap support (100).

3.5. Differential expression and cluster analysis

In accordance with the absolute value of $\text{Log2FoldChange} > 2$ and $p\text{adj} < 0.001$, the DESeq method identified 1,993 contigs differentially expressed between the ten gonadic categories (Additional file 5: *Table S5*). Among these contigs, 1,555 or 78% showed significant similarity to known proteins and 214 (10.7%) had a GO term.

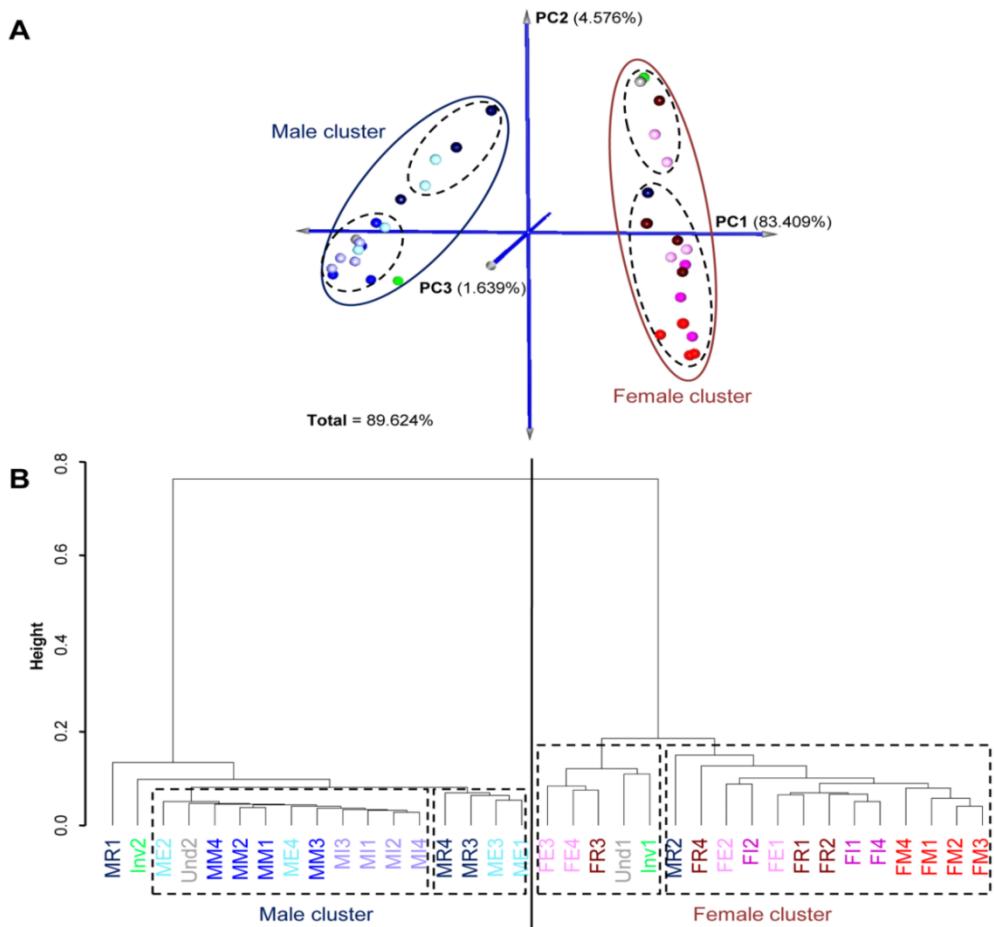


Figure 18 Expression pattern analysis in gonad samples of *P. margaritifera*. 3D Score plot using the first 3PCs identified by principal component analysis of all 1,993 contigs in the 36 individual oyster gonads (**A**). Hierarchical clustering using Spearman's correlation on all individual gonad samples (**B**). Samples are divided into 2 main clusters based on their contig expression pattern, discriminating male and female gonads. Sky blue/pink or (M/F)E: male/female at early stage; cyan/magenta or (M/F)I: male/female at intermediate stage; blue/red or (M/F)M: male/female at mature stage; darkblue/darkpink or (M/F)R: male/female at stage of regression; green or Inv: gonads in sexual inversion; and grey or Und: gonad sex is undetermined.

PCA and hierarchical clustering were applied on the 36 samples for the 1,993 contigs (Figure 18). Analysis of these two representations identified two main clusters: one female the other male. In the 3D score plot (Figure 18A), samples belonging to the same or to close gonadic categories appeared clustered together, whereas different samples, such as mature females (MF) and mature males (MM), appeared significantly further from each other. Sexes were discriminated by the first principal component (PC1), which explained 83.4% of the variation, with low component loading for males and high component loading for females. Stage of gonadic development seemed to be organized along the

second principal component (PC2, 4.6%), with decreasing component loading from the early stage and regression stage to the mature stage. Focusing on PC2, two sub-clusters could be distinguished in each main cluster: one was represented by intermediate and mature stages whereas the other was represented by early and regressed stages. These sub-clusters were also found in the hierarchical clustering plot (Figure 18B). Then, a K-means clustering was performed on differentially expressed contigs and ten distinct clusters with similar expression patterns were produced (Figure 19). Biological interpretation of the data led us to group these clusters into four major gene expression profiles: i) contigs expressed in both male and female gonads, with an increasing expression over the course of gametogenesis (clusters 1 and 2); ii) contigs specifically expressed in male gonads, with an increasing expression over the course of spermatogenesis (clusters 3, 4, 5 and 6); iii) contigs expressed more in female gonads with an increasing expression over the course of oogenesis (cluster 7, 8 and 9); and iv) contigs more expressed in undetermined, early, regressed gonads and in gonads in sexual inversion (cluster 10).

Cluster 1 and 2 together included 561 contigs, of which 465 showed significant similarities to known proteins and 51 presented GO assignations. We found several genes known to be involved in male and female germ cell development in different organisms, and known to be implicated in varied processes such as chromatin condensation (*histone h4*, Contig_45897; and *histone h5*, Contig_62257), DNA replication and repair (*serine/threonine-protein kinase plk4*, Contig_4017; and *dna repair protein rad51 homolog 3*, Contig_2162); mitosis and meiosis with *cell division cycle proteins* (Contig_2034, Contig_4811, Contig_4931 and Contig_5497), *centromere proteins* (Contig_3993, Contig_49539), and *cyclins* (Contig_1166, Contig_2825, Contig_2971 and Contig_3583); transcription with several transcription factors (Contig_883, Contig_3574 and Contig_25707); post-transcriptional regulation and translation (*protein smaug homolog 1*, Contig_1040; and *apobec1 complementation factor*, Contig_5317); and apoptosis (*e3 ubiquitin-protein ligase zswim2*, Contig_1593; and *proteasome activator complex subunit 3*, Contig_2666). Moreover, because of a higher expression in male than in female, we also found in these two clusters of genes described as playing a role in spermatogenesis, such as *sperm-specific h1/protamine-like protein type 1* (Contig_6615), *testis-expressed sequence 11 protein* (Contig_1600) or *AMY-1-associating protein expressed in testis 1* (Contig_1857); and numerous genes involved in flagella/cilia and motility (*sperm flagellar proteins*, *sperm associated antigens*, *dyneins*, *kinesin-like proteins* or *coiled-coil domain-containing proteins*). In cluster 2, *pmarg-fem1-like* (Contig_1317) was also determined.

Among the 815 contigs with increasing expression over the course of spermatogenesis (clusters 3, 4, 5 and 6), 614 presented significant homologies with genes encoding known proteins and 72 were assigned with Gene Ontology. In these clusters, a high number (1.5 times) of contigs was found differentially expressed between males and females or were involved in different stages of spermatogenesis. Indeed, there were genes implicated in spermatocytogenesis, such as those encoding for synaptonemal complex proteins 2 and 3 (Contig_4991, Contig_730, Contig_1665 and

Contig_3487); genes implicated in spermatidogenesis, including genes coding for proteins involved in spermatid differentiation and development such as meiotic recombination proteins (*r114l*, Contig_4686; *spo11*, Contig_6205; *dmc1*, Contig_4171; and *rec8*, Contig_6753) or testis-specific serine/threonine-protein kinase 1 (*tssk1*, Contig_3306, Contig_4127 and Contig_4767); and genes implicated in spermogenesis, including genes encoding for the sperm motility kinase x (*smkx*, Contig_3725) or for the methyltransferase nsun 7 (*nsun7*, Contig_3944). For genes potentially involved in male sex determination, only *pmarg-dmrt* (Contig_639) was found in cluster 4. Finally, in these clusters, we identified genes coding for proteins implicated in fertilization, such as *adenylate cyclase type 10* (Contig_1091) or *protein hapless 2-b* (Contig_29401), and many genes known to play a role in the ubiquitin proteolytic system.

Among the 574 contigs with an increasing expression through the process of oogenesis (clusters 7, 8 and 9), 452 were annotated with known proteins and 89 were assigned in GO. We identified genes coding for proteins involved at different stage of oogenesis, such as oocytogenesis (*M-phase inducer phosphatase 1 and 3*, Contig_59221 and Contig_58023; *cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1*, Contig_61458; *mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A*, Contig_18326); and ootidogenesis, including proteins involved in ootide maturation (*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase mos*, Contig_51755; *nanos-like protein 1*, Contig_43975). Many genes were also found to be implicated in glycoprotein biosynthesis and metabolism, including a female specific gene coding for vitellogenin-6 (*vit-6*, Contig_15150), and in lipid metabolism, e.g., fatty acid synthase or pancreatic lipase-related protein (*fasn*, Contig_22662, Contig_22663, Contig_41568, Contig_41569 and Contig_41569; *pnliprp1*, Contig_23348). In these clusters, we additionally determined the *pmarg-foxl2* (Contig_43072), *zglp1* (Contig_25360) and *ovo* (Contig_8141) genes encoding for proteins involved in female sex differentiation. Genes identified as playing a role in development were also found, such as *homeotic protein distal-less* (Contig_24570) and *frizzled-5* (Contig_36329). Moreover, a gene coding for a DNA (cytosine-5)-methyltransferase (Contig_674), known as playing a role in epigenetic mechanisms, was identified in the cluster 9 as differentially expressed in female mature gonads.

Forty-three contigs were found to be more expressed in undetermined, early, regressed gonads and in gonads in sexual inversion (cluster 10) and would decrease in expression along the gametogenic cycle. Among these contigs, 25 had significant similarity with known proteins and two contigs were assigned in GO. Some genes associated with the immune system were found, such as *toll-like receptor 1* (Contig_40001) and *complement C3* (Contig_35574).

3.6. Highlights of expression patterns of putative sex determining genes

The DE analysis identified some male and female sex determining/differentiation genes as differentially expressed between gonadic categories. The two potential male sex-determining genes

found were *pmarg-fem1-like* (Contig_1317, cluster 2) and *pmarg-dmrt* (Contig_639, cluster 4). These genes showed a sexually dimorphic expression pattern in *P. margaritifera* with high expression in male gonad and a weak expression in female gonads passing through large variations of expression in the undetermined and inversion gonad categories (Figure 20). Moreover, the lowest mRNA level was observed in male regressed gonad, where it showed a similar level to the female gonads.

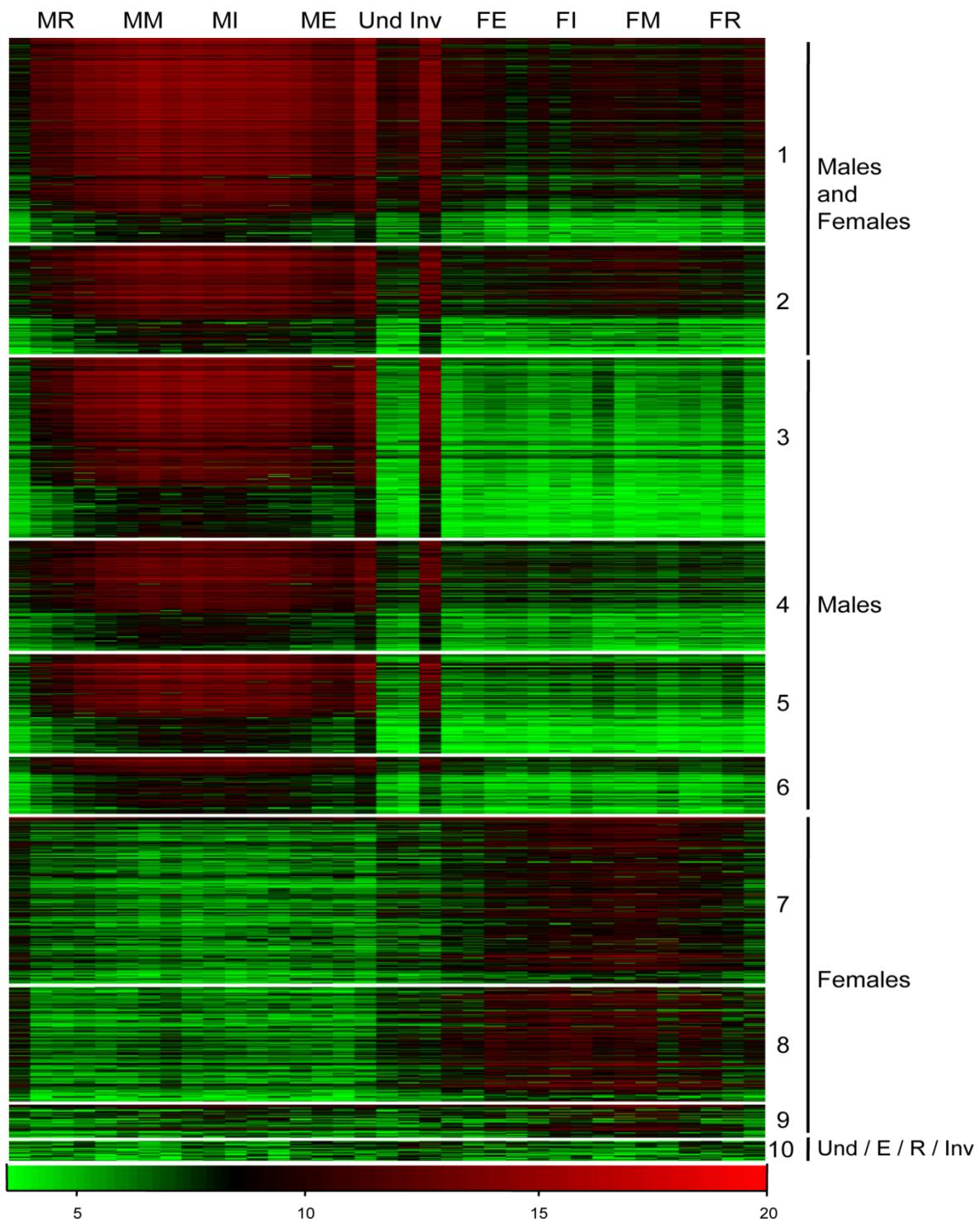


Figure 19 Heat map of contigs differentially expressed between the ten different gonadic categories of *P. margaritifera*. Clusters of the 1,993 differentially expressed contigs (rows) were obtained with K-means clustering using Spearman's correlation. Contigs showing similar expression profiles on all samples (columns) clustered together. (M/F)E: male/female at early stage; (M/F)I: male/female at intermediate stage; (M/F)M: male/female at mature stage; (M/F)R: male/female at stage of regression; Inv: gonads in sexual inversion; and Und: gonad sex is undetermined. Four main expression profiles are identified: Males and Females (genes expressed in both sexes with expression changing over the course of gametogenesis, 561 contigs); Males (genes highly expressed in males with expression increasing over the course of spermatogenesis, 815 contigs); Females (genes highly expressed in females with expression increasing over the course of oogenesis, 574 contigs); and genes more expressed in undetermined, early, regressed gonads and in gonads in sexual inversion (43 contigs). Color represents the normalized expression after variance-stabilizing transformation (DESeq). Expression levels are depicted with a color scale, in which shades of red represent higher expression and shades of green represent lower expression.

Furthermore, three genes identified as implicated in the female sex determination/differentiation pathway were found in female clusters: *pmarg-foxl2* coding for the Forkhead box protein L2 (Contig_43072, cluster 7), known to be essential for ovary differentiation and maintenance, and repression of the genetic program for somatic testis determination (Uhlenhaut et al. 2009); the GATA-type zinc finger protein 1 (*zglp1*, Contig_25360, cluster 8) and the protein ovo (*ovo*, Contig_8141, cluster 9), known to be involved in female germ line sex differentiation (Oliver et al. 1990; Strauss et al. 2011). These female genes presented an opposite expression profile compared to previously mentioned male genes, as shown in figure 20 for *pmarg-foxl2*. Here, high variations of expression were found in male gonads at regression stage and in gonads in which the sex was undetermined.

3.7. RNAseq technical validation

For technical validation of RNAseq data, real time PCR was performed on 14 chosen genes on the same individual samples previously used for the Illumina sequencing. Eleven genes were selected from the four main clusters described previously, plus three genes annotated as reproductive genes, and not identified as statistically differentially expressed. Between the normalized expression (*estimatesizefactor*) and the relative expression (relative to *ef1a* and *gapdh1*) of the RNAseq and the real time PCR data, there was a significant correlation ($R_s = 0.86$; $p < 0.00001$; Figure 21), which confirms the accuracy of the quantitative gene expression data.

4. Discussion

RNAseq, based on recent next generation sequencing technologies, has been a widely used to obtain transcriptomic information on genes that are differentially expressed under contrasting biological conditions, including testis vs. ovary or different reproductive stages (Redon et al. 2010; Llera-Herrera et al. 2013). This *de novo* technology is particularly suitable for non-model organisms for which genomic information is absent, weak or not relevant to the question addressed. In *P. margaritifera*, high-throughput expressed sequence tag (EST) pyrosequencing had already produced 276,738 sequences, but only from the calcifying mantle (in a study aimed at identifying shell matrix markers in

the dynamic process of biologically-controlled biominerization) (Joubert et al. 2010). Here, we proposed to unravel some molecular mechanisms involved in sex determination/differentiation and gametogenesis of an unusual alternative hermaphrodite invertebrate, the pearl oyster *Pinctada margaritifera* using Illumina-based RNAseq.

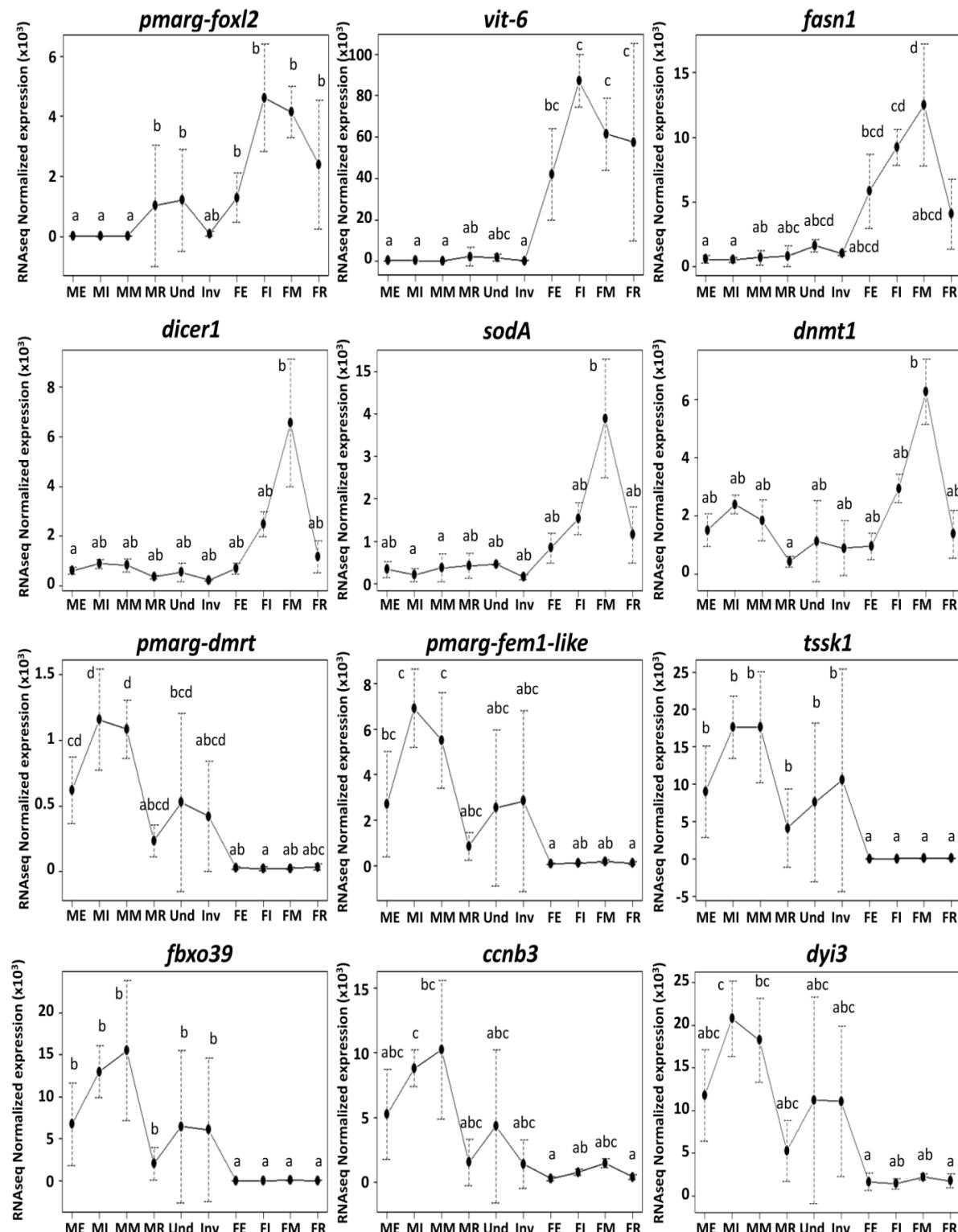


Figure 20 Highlighted expression profiles of eight reproductive genes in *P. margaritifera* gonad sample. RNAseq normalized expression (*estimateSizeFactor*) profiles of some genes determined as differentially expressed over the ten different gonadic categories (sequenced samples). Vertical bars represent standard deviation for RNAseq data (n = 4 except for the undetermined and inversion categories where n = 2). Expression profiles are shown for specific genes expressed in female gonads: *forkhead box protein l2* (*pmarg-foxl2*, Contig_43072, cluster 7), *vitellogenin-6* (*vit-6*, Contig_15150, cluster 8), *fatty acid synthase* (*fasn*, Contig_22662, cluster 8), *endoribonuclease dicer* (*dicer1*, Contig_28823, cluster 9), *superoxide dismutase 1* (*soda*, Contig_25451, cluster 7) and *dna (cytosine-5)-methyltransferase 1* (*dnmt1*, Contig_674, cluster 9); three specific genes expressed in male gonads: *doublesex- and mab-3-related transcription factor-like* (*pmarg-dmrt*, Contig_639, cluster 4), *testis-specific serine/threonine-protein kinase 1* (*tssk1*, Contig_4767, cluster 5) and *f-box only protein 39* (*fbxo39*, Contig_3220, cluster 3); and three genes expressed in male and female gonads with a higher level in the male: *sex-determining protein fem-1-like* (*pmarg-fem1-like*, Contig_1317, cluster 2), *g2/mitotic-specific cyclin-b3* (*ccnb3*, Contig_1166, cluster 2) and *dynein intermediate chain 3, ciliary* (*dyi3*, Contig_3511, cluster 1). Development stage (E: early, I: intermediate, M: mature, R: regression) and sex (M: male, F: female, Und: undetermined sex, Inv: in sexual inversion) are indicated at the bottom of each figure. Different letters indicate statistically significant differences (DESeq, *padj* < 0.001).

4.1. Reference transcriptome of the gonad of *Pinctada margaritifera*

A reference gonad transcriptome was *de novo* assembled based on the sequencing of 36 cDNA libraries, each corresponding to gonad samples of different reproductive stages and sexes. Finally, 70,147 contigs with an average length of 1,294 bp were obtained. Approximately two-thirds of the contigs had significant matches against sequences of existing proteins and 9% were annotated using Gene Ontology terms. This result is higher than recently reported in transcriptomic analysis of other bivalves (Wang et al. 2013; Huang et al. 2013), supposedly because the complete *C. gigas* and *P. fucata* protein databases have become available since their genomes were sequenced (Takeuchi et al. 2012; Zhang et al. 2012). Moreover, the higher number of contigs (10,294 more) with significant matches with *P. fucata* proteins than with *C. gigas* proteins would likely be due to the closer relationship between the two *Pinctada* species. From our sequencing effort, we identified a total of 196 *in silico* SSRs motifs and 3,667,510 putative *in silico* SNPs available for future genetics studies. This database and the available expressed sequences (Joubert et al. 2010) will accelerate the development of both genomics and genetics in this commercially-important species and may also benefit the recently published draft genome of *Pinctada fucata*. For our main interest, this work successfully allowed the relation of numerous mRNA orthologs to sex determination/differentiation and gonad development genes.

4.2. Identification of transcripts encoding proteins involved in sex determination and/or differentiation

The mechanisms governing sex determination and differentiation are highly variable among phyla. However while the genes at the top of hierarchy such as *Sry* in mammals or *sxl* in *Drosophila melanogaster* are not well conserved, the genes downstream in the sex determination pathway are more conserved.

The most conserved genes of this molecular pathway from invertebrates to human are *Dmrt*, a family of genes for *Doublesex* and *Mab-3*- related transcription factor (Kopp 2012). The *Dmrt* genes

encode a protein with an unusual zinc finger DNA-binding motif known as the DM domain (Erdman and Burtis 1993). At present, eight members of the family (*Dmrt1-8*) have been reported in vertebrates. In invertebrates, especially mollusks, orthologs of the DM domain transcription factor have been characterized from the oyster *C. gigas* (*Cg-DML*) (Naimi et al. 2009a), the scallop *Chlamys farreri* (*Cf-dmrt4-like*) (Feng et al. 2010), and the pearl oysters *P. martensii* (*pmDmrt2* and *pmDmrt5*) (Yu et al. 2009; Yu et al. 2011) and *P. fucata* (Pifuc-*Dmrt2* and Pifuc-*DM-like A* and *B*) (Matsumoto et al. 2013). Here, we characterized two *dmrt* orthologs in *P. margaritifera*: *pmarg-dmrt2* and *pmarg-dmrt*.

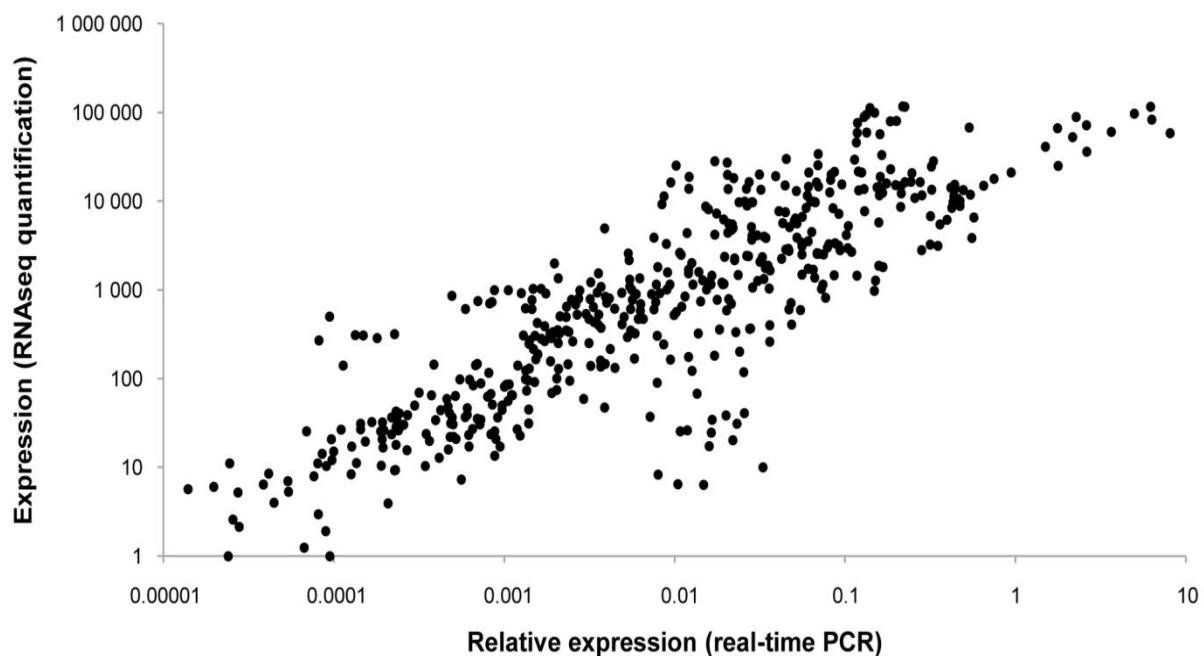


Figure 21 Validation of the RNAseq quantification data using q-RT-PCR. Validation of the RNAseq quantification data using q-RT-PCR. Fourteen genes were selected from differentially and non-differentially expressed contigs. There were 11 genes showing different expression levels depending on the sex and the maturity of the oysters: expression in both sexes (two genes from cluster 1: *tex11* [Contig_1600] and *dnah6* [Contig_2426]; and one gene from cluster 2: *ccnb3* [Contig_1166]), higher expression in males (one gene from cluster 4: *pmarg-dmrt* [Contig_639]; and two genes from cluster 5: *tssk1* [Contig_4767] and *mprb* [Contig_50490]), and higher expression in females (2 genes from cluster 7: *sox2* [Contig_37098] and *mos* [Contig_51755]; two genes from cluster 8: *vit-6* [Contig_15150] and *pnliprp1* [Contig_23348]; and one gene from cluster 9: *pbx4* [Contig_57857]). The three remaining genes, not differentially expressed but annotated as reproductive genes, were *pmarg-dmrt2* [Contig_44478], *dax1* [Contig_3226], and *vasa* [Contig_2898]. Their relative expression (to *ef1* and *gapdh1*) quantified by q-RT-PCR on samples used for sequencing were compared with those obtained using the RNAseq approach (normalized expression, *estimatesizefactor*) ($R_s = 0.86$; $p < 0.00001$).

We also identified an ortholog of the *SoxE* gene in the pearl oyster: *pmarg-sox9*. In mammals, the transcription factor *Sox9* is the direct target of *Sry* and it is both necessary and sufficient for normal testicular development (Wagner et al. 1994; Knower et al. 2011). It may induce the expression of another *SoxE* family member, *Sox8*, which participates in male gonadic differentiation and maintenance (Barrientos and Scherer 2010). *Sox9* expression is highly up-regulated in developing male genital ridges (Kent et al. 1996; Morais da Silva et al. 1996; Spotila et al. 1998). The

conservation of male-specific expression of *Sox9* suggests it is involved in normal sex determination in vertebrates. Recently, Santerre et al. (2014) characterized the first *SoxE* ortholog (*Cg-SoxE*) in a Lophotrochozoa species, *C. gigas*. Expression pattern of *Cg-SoxE* suggested its involvement in early oyster gonadic differentiation, which includes sex determination.

A derived member of the little known family *Fem1* was characterized in *P. margaritifera*, *pmarg-fem1-like*. In the worm *C. elegans*, *fem-1* is a component of the signal transduction pathway controlling sex determination (Doniach and Hodgkin 1984) and encodes FEM-1, an Ankyrin repeat protein. The *fem-1* gene, along with the *fem-2* and *fem-3* genes, are required for normal masculinization of somatic and germline tissue (Hodgkin 1986). While it is thought that nematode sexual differentiation differs from that of vertebrates, a *Fem1* gene family, encoding proteins highly related to *C. elegans* FEM-1, was described in mouse and in human, consisting of three family members, *Fem1a*, *Fem1b* and *Fem1c* (Ventura-Holman et al. 1998; Ventura-Holman and Maher 2000; Krakow et al. 2001; Ventura-Holman et al. 2003).

Forkhead box l2 (*Foxl2*), which encodes a protein belonging to the Forkhead/winged helix family transcription factors, is one of the most conserved genes involved in the differentiation and maintenance of the ovary in vertebrates. In invertebrates, orthologs of *Foxl2* have been characterized, but without a good understanding of their role in reproduction (Adell and Müller 2004; Magie et al. 2005; Tu et al. 2006; Shimeld et al. 2010). In mollusks, orthologs of *Foxl2* have been also identified, such as in *C. gigas* *Cg-foxl2* (Naimi et al. 2009b) and the scallop *Chlamys farreri* *Cf-foxl2* (Liu et al. 2012), showing a sexually dimorphic pattern, in favor of female. In the present study, we identified a *foxl2* ortholog in *P. margaritifera*, *pmarg-foxl2*, which presents a highly conserved Forkhead domain characteristic of the FOX protein family.

This study therefore helped us to identify orthologs of genes encoding proteins known as sex determination/differentiation actors in other organisms. Their function in *P. margaritifera* remains to be examined. Functional approaches such RNAi technology, now available in marine bivalves (Fabioux et al. 2009), would help in deciphering the role of these genes in pearl oyster. Nevertheless, the gene expression pattern obtained by our RNAseq approach is a first step toward understanding their role in *P. margaritifera*.

4.3. Sex is the main driver of gonad gene expression

Principal Component Analysis (PCA) revealed that the main variation in gene expression corresponds specifically to the sexes and gonad developmental stages. The sex factor alone explained more than two thirds of the variance in gonad gene expression. This strong sex effect was also revealed by gene expression profiling of the gonads of other marine bivalves with different reproductive physiology: the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*, an alternative and irregular protandrous hermaphrodite marine bivalve (Dheilly et al. 2012); the Pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*, a functional

hermaphrodite (Llera-Herrera et al. 2013); and the European clam *Ruditapes decussatus*, a gonochoric mollusk species that reproduces annually and shows sexual dimorphism (Sousa et al. 2014). In each case, molecular mechanisms specific to sex were so important that whatever the sexual determinism, the main variations in gene expression were between male and female rather than through gametogenesis development. Sex determination occurs at the onset of this distinction and is a crucial question in marine bivalves, especially in the pearl oyster, which has important environmental and aquaculture roles. From the mRNAs characterized with best hits of mRNA encoding major genes of sex determination in other organisms, few appeared differentially expressed, and positioned in clusters. The EST annotated as the female-specific gene *foxl2* showed a sexually dimorphic expression toward females and appeared differentially expressed over the course of vitellogenesis, with a significantly higher increase of expression between the “early” and “intermediate” stage females, possibly in agreement with a specific ovarian differentiation role. In the Pacific oyster, *Cg-foxl2* was demonstrated to indirectly participate in male gonadic differentiation, based on down-regulation induced by *Cg-foxl2os*, its natural antisense transcript (Naimi et al. 2009b; Santerre et al. 2012). No information is currently available on the existence of a putative natural antisense transcript of *pmarg-foxl2* in *P. margaritifera*; this could be explored in combination with the role of *pmarg-foxl2*. Concerning male sex determining genes, only *pmarg-fem1-like* and *pmarg-dmrt* appeared significantly differentially expressed between conditions: over-expressed in *P. margaritifera* males and with an increasing expression over the course of spermatogenesis. In *C. gigas*, the kinetic of DMRT-like mRNA expression suggested that it plays a role in the development of the gonad (i.e., proliferation of spermatogonia and differentiation of Sertoli cells as found for *dmrt1* in vertebrates), though without any evidence of a sex-determinism function (Naimi et al. 2009a). *fem-1* is a sex-determining gene that is required in *Caenorhabditis elegans* for the development of the male body and for spermatogenesis in males and hermaphrodites (Doniach and Hodgkin 1984). When males or hermaphrodites are *fem-1*(-), due to null mutations, animals develop as females. Here, the significant mRNA level of these two genes observed through the spermatogenesis of *P. margaritifera* might also maintain male development and spermatogenesis going, whereas repression of these two genes mRNA might provoke a sperm-oocyte switch, as observed in chicken for *dmrt1* (Smith et al. 2009) and in *C. elegans* for *fem-1* (Zanetti et al. 2012). Only a few pearl oysters in undetermined or inversion stages were examined by histology, but high variance of their mRNA level was observed distinguishing two opposite patterns, one similar to repression and one like steady state levels of *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like* mRNA over the whole course of spermatogenesis. Non-destructive gonad biopsy allowing gene expression analysis in animals showing opposite patterns at undetermined or inversion stages may explain whether *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like* or *pmarg-foxl2* would induce sex inversion. *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like* seem to be repressed in male gonads at regression stage, as are many other specific male genes, whereas *pmarg-foxl2* seems to be more highly expressed at this stage. These results suggest that, physiologically, this stage of male regression is close to the female state. Indeed,

undifferentiated, regression and inversion stages constitute the putative sex-determining time window in *P. margaritifera*, although the latter is potentially too late. Similarly, in *C. gigas*, a successive but not systematic protandric hermaphrodite species, the sex-determining time window may occur around the end of a reproductive cycle and the beginning of the next (Santerre et al. 2013).

4.4. Spermatogenesis

In male gonads, all male specific genes revealed an increasing expression over the course of spermatogenesis from early development to mature stages. No decreasing mRNA variation was observed. This result may highlight the asynchronous and continuous nature of the reproduction of *P. margaritifera*. Among the 815 contigs more expressed in males, several were identified as corresponding to genes involved in the ubiquitin proteolytic system (E3 ubiquitin-protein ligases, Kelch-like protein, F-box only proteins and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases), which have been shown to affect the sperm proteasomes in mice because a defect in these genes has negative effects on sperm efficiency (Bedard et al. 2011). The successful fertilization affected by sperm proteasomes relies on sperm capacitation. The ubiquitination-proteasome system has different levels of implication in fertilization: elimination of defective spermatozoa (Sutovsky et al. 2001) and degradation of the proteinaceous vitellin egg coat (Sawada et al. 2002). Thus, testing these specific genes in relation to sperm quality in *P. margaritifera* would be of great interest, both from aquaculture and environmental perspectives.

4.5. Oogenesis

We identified 574 genes potentially involved in oogenesis. Most of these genes appeared to have an increasing expression over the oocyte maturation process. Genes involved in the metabolism of glycoproteins and lipids, major components of the yolk envelop and yolk reserves, such as *vit-6*, *fasn* and *pnliprp1*, can be considered good targets to illustrate this process. Furthermore, maturation of oocytes includes the storage of mRNA, maternally transmitted to the embryo before the start of embryonic transcription (Moor et al. 1998). Several genes found highly expressed in mature and known to be involved in embryo development might represent some of these maternal mRNAs. The high expression of the *cpeb1-b* gene coding for the cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1-b, and the high expression of the *dicer1* gene coding for the endoribonuclease DICER may affect the translation or destruction of these mRNA through polyadenylation (Murchison et al. 2007) or RNA interference mechanisms (Bettegowda and Smith 2007) during oocyte maturation. In addition, it has been shown in some vertebrates, that the oocyte quality is linked to the high expression of genes involved in antioxidant defense. Indeed, due to their aptitude to neutralize reactive oxygen species, they promote the lifespan of the embryo during its development (Kably Ambe et al. 2004). Here, we found in mature stage, high expression of *sodA* gene coding for the superoxide dismutase-A which can

be interpreted as similar process in *P. margaritifera*, and which may indicate a maternal investment in protection of the offspring which have to adapt to a fluctuating environment, especially at the beginning of their development.

Finally, DNA methylation of pearl oyster gametes is a potentially relevant direction for future studies. It is now known that epigenetic transitions can be important at defined stages of gametogenesis and during meiosis of germ cells (Li 2002; Allegrucci et al. 2005). Methylation is faithfully recapitulated by the action of the maintenance methyltransferase *Dnmt1* which appeared here to be significantly modulated at the mRNA level during *P. margaritifera* gametogenesis so as to be up-regulated at the female mature stage. To date, *C. gigas* is the only such marine environmentally sensitive species to have been extensively studied in the epigenetic domain (Roberts and Gavery 2012; Gavery and Roberts 2013; Riviere et al. 2013).

5. Conclusion

The most significant outcome of our study is the identification of transcripts that improve our understanding of the specific reproduction of the marine bivalve *P. margaritifera* and enable us to produce lists of relevant candidate genes for further studies aimed at controlling reproduction of this species and thus supporting the sustainable development of pearl farming in French Polynesia. Among the candidate genes that appeared differentially expressed over the course of the gametogenesis or between sexes, *pmarg-dmrt*, *pmarg-fem1-like* and *pmarg-foxl2* would make good starting points for further functional research on sex determinism of the pearl oyster *P. margaritifera*. More specific and precise individual investigation is now needed to elucidate their role, using functional studies such as RNA interference.

Furthermore, a meta-analysis of the transcriptome of the gonad of several marine bivalves displaying different reproductive physiology, such as the alternative and irregular protandrous hermaphrodite oyster *Crassostrea gigas* (Dheilly et al. 2012), the functional hermaphrodite lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Llera-Herrera et al. 2013), and the gonochoric European clam *Ruditapes decussatus* (Sousa et al. 2014), would be interesting to carry out in order to shed light on the complex molecular cascade of sex determinism in marine mollusks.

Authors' contributions

AH, GLM conceived the project. VT, CK and YG contributed to the conception and the design of the experiment. GLM directed sampling and dissections of pearl oysters to form the library of gonadic tissue. PL performed all histological treatment, from fixation to coloration of histological sections. VT performed sampling, RNA extraction, sequence analysis, DE analysis, data analysis and interpretation and drafted the manuscript with AH. VT and EL performed the cDNA library construction and EL performed the sequencing. CK performed the bioinformatic analysis, assembly, annotation, SNPs and

SSRs discovery. GLM, NGM and YG contributed to supervision of the work and to the critical review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was conducted as part of the ANR “PolyPerl” project (ANR-11-AGRO-006) and the Contract Project “BiodiPerl”. The authors are indebted to J.Y. Daniel, V. Quillien, V. Vonau, J. Fievet, C. Cabrau, L. Quintric, F. Marquer and all the staff of the GeT-PlaGe core facility (<http://www.get.genotoul.fr/>) for their helpful assistance. We thank H. McCombie for her help with editing the English. V. Teaniniuraitemoana is financially supported by Ifremer and holds a grant from la Délégation à la Recherche de Polynésie française.

Chapitre 2: Molecular signatures of the female sexual pathway in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Vaihiti Teaniniuraitemoana¹, Arnaud Huvet², Peva Levy¹, Nabila Gaertner-Mazouni³, Yannick Gueguen^{1, #}, Gilles Le Moullac^{1*}

PlosOne (en soumission)

¹ Ifremer, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 7004, 98719 Taravao, Tahiti, Polynésie Française

² Ifremer, UMR 6539 LEMAR, BP 70, 29280 Plouzané, France

³ Université de la Polynésie Française, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 6570, 98702 Faa'a, Tahiti, Polynésie Française

Present address : Ifremer, UMR 5119 Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM), Montpellier, France.

Abstract

Background

In recent years, the genomics of economically important marine bivalves has been studied to provide better understanding of the molecular mechanisms underlying their different reproductive strategies. The recently available gonad transcriptome of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* provides novel and powerful tools to study these mechanisms in marine mollusks displaying hermaphroditic features. In the present study, we analyzed RNAseq quantification data on the *P. margaritifera* gonad transcriptome to identify candidate genes in histologically-characterized gonad samples to provide molecular signatures of the female sexual pathway in this pearl oyster.

Methodology/Principal finding

Based on the RNAseq dataset of *P. margaritifera* gonad transcriptome already available, stringent expression analysis identified 1,937 contigs that were differentially expressed between the different gonad histological categories. From the hierarchical clustering analysis, we proposed a new model of the reproduction of *P. margaritifera*, based on a dual histo-molecular analytical approach. Considering this new model, we identified nine candidate genes as markers of the female sexual pathway. Their mRNA levels were assayed by real-time PCR on a new set of gonadic samples. A clustering method revealed four principal expression patterns based on the relative gene expression ratio. A multivariate regression tree realized on these new samples and on the previously analyzed RNAseq samples showed that the sexual pathway of *P. margaritifera* can be predicted by a 3-gene-pair expression ratio model, strongly suggesting the implication of *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* in the sex determinism of *P. margaritifera*.

Conclusions/Significance

Our present work provides the first histo-molecular model of *P. margaritifera* reproduction and a gene expression signature of its female sexual pathway. These represent useful tools for understanding and studying sex determinism in this species and other related species for aquaculture purposes such as genetic selection programs.

Keywords

Pinctada margaritifera, Differential expression, Marine bivalve, Sexual pathway, Reproduction.

1. Introduction

The black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) var. *cumingi* (Jameson, 1901) is a benthic bivalve occurring in subtropical and tropical coral reefs. It is widely distributed in the Indo-Pacific region: throughout the Equatorial zone, down to Northern Australia and extending up to the south of Japan (Le Pennec et al. 2010).

For French Polynesia, the black pearl industry, based on the cultured of *P. margaritifera*, is the second most important economic resource. Over the last three decades, research projects have worked to support sustainable development of pearl farming and to improve the quality of the pearls produced (Gueguen et al. 2013), using genetic methods. Genetic selection programs have been encouraged because it was demonstrated that the pearl quality is dependent on the genetics of the graft donor oyster (Arnaud-Haond et al. 2007). The aim of the *P. margaritifera* selection program, is to breed families of graft donor oysters selected for their capacity to produce high quality pearls and/or particular colors and/or rapid growth (Ky et al. 2013; Blay et al. 2013; Ky et al. 2014).

The successful hatching of selected spat depends on the production of gametes and embryos from synchronous selected breeders raised in laboratory conditions. Reproduction of pearl oysters under controlled conditions mainly depends on the availability of females, which are unfortunately not abundant among farmed oysters due to the protandrous hermaphroditism of this species (Tranter 1958a). As with other pearl oysters, *P. margaritifera* shows a consecutive switch in sex: individuals may change gender (from male to female) from the end of their second year onwards (Chávez-Villalba et al. 2011). However, Thielley (1993) showed that changes from female to male could occur when conditions, either natural (temperature or food) or unnatural (handling or cleaning), were stressful. These observations would better correspond to alternate hermaphroditism. In all cases, simultaneous hermaphrodites and animals with undetermined status were uncommon. Knowledge of the underlying physiological mechanisms and factors controlling sex ratio (Vahirua-Lechat et al. 2008; Chávez-Villalba et al. 2011; Le Moullac et al. 2013) especially for the female pathway, are essential to establish a genetic improvement program.

Sex ratio is the product of sex determination. In the animal kingdom, sex determination can be genetic (genetic sex determination, GSD), environmental (environmental sex determination, ESD), or result from an interaction of both of these factors (Valenzuela et al. 2003). The genetic and/or environmental process leads to specific molecular cascades that transform an undifferentiated gonad into a testis or an ovary (Piferrer and Guiguen 2008). Although these mechanisms are well known in vertebrates, data on sexual determinism in marine mollusks displaying hermaphroditic features are still poorly understood. In most bivalves, the main environmental factors affecting reproduction, and probably gender, are temperature, food availability (Chávez-Villalba et al. 2003; Dutertre et al. 2009) and, to a lesser degree, photoperiod (Saout et al. 1999). In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Enríquez-Díaz et al. (2009) showed that while intensity was influenced by the quantity of available food, the timing and speed of gametogenesis were regulated by temperature.

During recent years, genomics of marine bivalves of major economic interest has been studying in order to provide better understanding of the molecular mechanisms underlying reproduction, including reproductive cycle, sex differentiation and sex determination (Dheilly et al. 2012; Llera-Herrera et al. 2013; Matsumoto et al. 2013; Sousa et al. 2014). Recently, Teaniniuraitemoana et al. (2014) performed a gonad transcriptome analysis of *P. margaritifera*, using Illumina-based RNAseq, unraveling some molecular mechanisms involved in sex determination/differentiation and gametogenesis. In this study, the authors revealed the importance of *pmarg-dmrt*, *pmarg-fem1-like* and *pmarg-foxl2* as starting points for further functional studies on the sex-determining cascade of the pearl oyster.

In the present study, using the previously published RNAseq dataset (Teaniniuraitemoana et al. 2014), we applied a more stringent method of statistical selection on the differential expression levels in order to draw up a short list of candidate genes of the female sexual pathway. These candidates were next assayed by real-time PCR in different sexes and stages of pearl oyster gonad. Through these analyses, we obtained new insights into the reproduction of *P. margaritifera* based on a dual histomolecular analytical approach, allowing a model to be built based on expression ratio of three gene pairs, and predictions of sexual pathway to be made for individuals of this hermaphrodite species. This study offers molecular signatures of the female sexual pathway that will be useful for future research on reproduction in *P. margaritifera*, especially research on female sex determination.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics statement

The authorization (No. 4226) of the pearl oyster translocation from Takaroa atoll (14°26'59.12"S, 144°58'19.91"W, Tuamotu Archipelago, French Polynesia) to the Vairao lagoon (Ifremer marine concession No. 8120/MLD: 17°48'26.0"S, 149°18'14.4"W, Tahiti, French Polynesia) has been issued by the Ministry of Marine Resources on September 27, 2012 after the favorable notice given by

the town councils of Takaroa and Vairao, respectively. At the departure of Takaroa atoll, pearl oysters were packed in ice-box for shipment by air. Upon their arrival at Vairao, pearl oysters were immersed for 30 min in a hyper-salted water bath (120 g of salt L⁻¹ water) following the recommendations with the authorization for transfer in order to eliminate anemones and sea squirts. Then, the pearl oysters are stored in the lagoon of Vairao for 3.5 months to recover physiologically of air transport and hyper-salted treatment. In any case, this study involves protected or endangered species.

2.1. Animal and tissue sampling

Three-year-old adult *P. margaritifera* of an average size of 118 mm ± 8.67 from Takaroa atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia), acclimated in the Vairao lagoon (Tahiti, French Polynesia) for three and a half months, were brought to the Ifremer laboratory in Tahiti, French Polynesia, in April 2013. For each oyster, gonad tissues were sampled, making a transversal section of the gonadic area for histological examination. A piece of the rest of the gonad was conserved in RNAlater™ (Qiagen) (50 mg/mL) and stored at -80 °C until RNA extraction.

2.2. Histology

Gonad development stage and sex were determined by histological methods (see Fournier et al. 2012 for details) and 44 samples were classified according to the different categories of gonadic tissues previously described in Teaniniuraitemoana et al. (2014): male and female at “Early” stage (gonad in early gametogenesis; Male: n = 4; Female: n = 3), “Intermediate” stage (gonad developing; Male: n = 4; Female: n = 4), at “Mature” stage (oyster ready to spawn; Male: n = 4; Female: n = 2), “Regressed” stage (gonad has stopped generating gametes; Male: n = 9; Female: n = 8); and “Undetermined” (gonad contains no gametes at all; n = 6). No gonads in “Inversion” (where the gonad presents both male and female gametes) were observed in this sample.

2.3. Real-time PCR

Candidate marker genes selected from the analysis of RNAseq dataset were assayed by real-time PCR on the 44 gonad samples. After removing RNAlater by pipetting and absorption, total RNA of each individual was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen) and treated with DNase I using a DNA-free™ Kit (Ambion) following manufacturer’s instructions. RNA concentrations were measured on an ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) at 260 nm, using the conversion factor 1 OD = 40 µg/mL RNA. For each sample, 0.5 µg of total RNA were reverse-transcribed using Transcripter First Strand cDNA Kit (Roche) and amplified by real-time PCR on a Stratagene MX3000P. The amplification reaction contained 12.5 µL 2X SYBR green qPCR Master Mix (Stratagene), 10 µL cDNA template, and 2.5 µL of primers (4 µM) in a final volume of 25 µL. Each run included a positive cDNA control and a blank control (water) for each primer pair. Relative gene expression was

calculated using two reference genes, *ef1a* and *gapdh1*, by the $2^{-\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001), as follows: Relative expression_(target gene, sample x) = $2^{-\Delta Ct_{\text{target gene, sample x}} - Ct_{\text{reference gene, sample x}}}$. The relative stability of the *ef1a* and *gapdh1* combination, considering the sex and reproductive stage of each gonad sample, was confirmed using NormFinder (Andersen et al. 2004) (Stability value for best combination = 0.288). PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of a cDNA to ensure that E ranged from 90 to 110%. The primers used for amplification are listed in *Table S1*.

2.4. Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using R v2.15.2, an environment and a language for statistical computing (R Development Core Team 2011).

Differential expression (DE) analysis

RNAseq quantification data of *P. margaritifera* gonads were taken from the study of Teaniniuraitemoana et al. (2014) (Bioproject PRJNA229186 – Genbank accession number SRP033217) who analyzed the gonad transcriptome based on the Illumina sequencing of 36 cDNA libraries, each corresponding to gonad samples of different reproductive stages and sexes.

The differential level expression of contigs between different gonadic categories was tested using the DESeq package v1.11.3 (Anders and Huber 2010) as described in Teaniniuraitemoana et al. (2014). In the present study, the differential expression of contigs was considered as statistically significant when the value of *FoldChange* was > 10 or < 0.1 i.e., when there was a tenfold change in expression under one of the conditions; and a *padj* < 0.001 , *p-value* adjusted with a false-discovery rate (FDR) correction for multiple testing by the Benjamini-Hochberg method (Benjamini and Hochberg 1995).

Relative expression analysis

Normality and homoscedasticity of gene relative expression data were checked using Shapiro-Wilk and Bartlett's tests. One-way ANOVA was performed followed by Tukey's multiple comparison tests to determine expression differences of candidate marker genes between the gonad categories considered.

Hierarchical clustering analysis

Hierarchical clustering was applied firstly to RNAseq samples and secondly to real-time PCR samples in order to cluster them according to the similarity of expression pattern of the statistically significant differentially expressed contigs and expression pattern of the selected candidate marker genes, respectively.

Decision tree

We adapted and performed a multivariate regression tree (MRT), widely used in the domain of ecology for modeling species-environment relationships (De'ath 2002), to evaluate the hierarchical importance of the effect of relative gene expression on the oyster sexual pathway. Divisions in the MRT were determined by cross-validation. We performed these analysis with the *mvpard* package v1.6-1 (Therneau et al. 2013) using the default parameters of the *rpart* function.

3. Results

3.1. Differential expression analysis reveals new insight into *P. margaritifera* reproduction

To provide an overall view of the transcriptional changes in the gonad of *P. margaritifera*, a new and stringent differential expression analysis was performed between the ten different gonadic categories on the RNAseq dataset already available (Teaniniuraitemoana et al. 2014). In accordance with the value of *FoldChange* > 10 or < 0.1 and *padj* < 0.001, the DESeq method identified 1,937 contigs differentially expressed between gonadic categories.

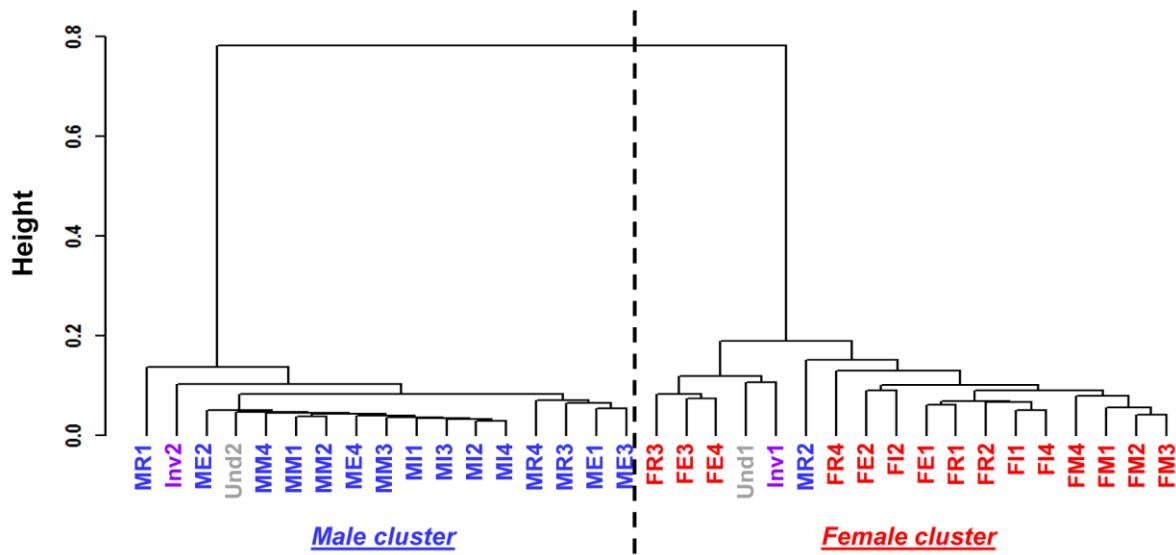


Figure 22 Hierarchical clustering using Spearman's correlation on RNAseq gonad samples. Samples are divided into two clusters based on their contig expression pattern, discriminating male (blue) and female gonads (red). (M/F)E: male/female at early stage; (M/F)I: male/female at intermediate stage; (M/F)M: male/female at mature stage; (M/F)R: male/female at regression stage; purple or Inv: gonads in sexual inversion; grey or Und: gonad sex is undetermined.

A hierarchical clustering method was applied on the RNAseq samples to cluster them according to the similarity of expression pattern among the 1,937 differentially expressed contigs (Figure 22). Analysis of the dendrogram generated identified two clusters: one male, gathering the samples of male sex, and one female, gathering the samples of female sex. Moreover, the hierarchical clustering put

one of the two gonad samples of the “undetermined” category in each cluster and did the same with the two gonad samples in sexual inversion. The one male gonad sample in regression was classified with female gonads. Thus, Figure 22 illustrates how the samples “Und1”, “Inv1” and “MR2” showed a female gene expression pattern whereas the samples “Und2” and “Inv2” showed a male gene expression pattern.

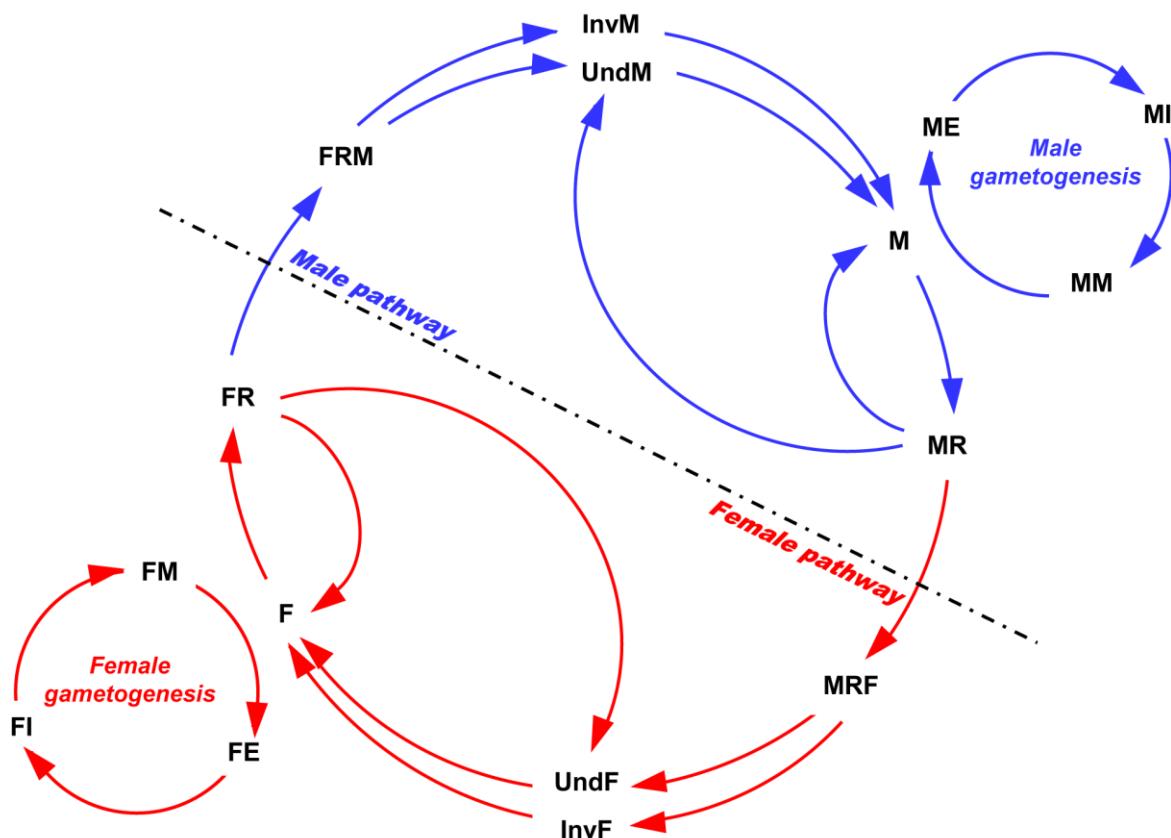


Figure 23 The histo-molecular model of the reproduction of *P. margaritifera*. M or F: male or female in gametogenesis; (M/F)E: male/female at early stage; (M/F)I: male/female at intermediate stage; (M/F)M: male/female at mature stage; (M/F)R: male/female at regression stage; Und(M/F): gonad undifferentiated at the cellular level, beginning a male or a female determination/differentiation at the molecular level; Inv(M/F): oyster in sexual inversion female to male or male to female; MRF: male in regression stage at the cellular level beginning a female determination/differentiation at the molecular level; and FRM: female in regression stage at cellular level beginning a male determination/differentiation at the molecular level.

From the clustering analysis results coupled with histological analyses, we designed a new model of reproduction in *P. margaritifera*, no longer based on a histological approach alone but on a dual histo-molecular analytical approach. Figure 23 illustrates this new model, which consists of two parts: the male and the female pathways, and describes the new considered gonadic categories. The transition from the male to the female pathway occurs from the gonad regression of male oysters and the inverse occurs for the transition from the female to the male pathway. Indeed, in this model male or female oysters pass through a regression stage before reaching an undifferentiated or an inversion stage to become females or males at gametogenesis.

3.2. Selection of nine candidate genes of the female sexual pathway in *P. margaritifera*

We performed a second differential expression analysis considering the new gonadic categories from the proposed histo-molecular model and by focusing on the male to female transition and the female pathway. Thus, this second DE analysis was performed using the DESeq package between the M category and each of the categories of the female sexual pathway as follows: M vs F, M vs FR, M vs MRF, M vs UndF and M vs InvF. We then compared all the DE results in order to obtain the contigs commonly differentially expressed in all the comparisons described above. Nine genes were thus selected (Table 4). Three genes among these nine, *pmarg-foxl2* coding for the Forkhead box protein L2 (Contig_43072) and two unknown genes *pmarg-c43476* and *pmarg-c45042* (Contig_43476 and Contig_45042), were expressed at least tenfold more in MRF, UndF, InvF, F and FR oyster gonads than in male gonads. They were thus considered as markers of the entire female pathway (FP). Two other unknown genes, *pmarg-c19309* and *pmarg-c54338* (Contig_19309 and Contig_54338), were expressed at least tenfold more in MRF and UndF oyster gonads (i.e., oysters whose female sex determination and/or differentiation was already initiated at the molecular level but not yet visible at the cellular level) than all other categories, and therefore represent markers of the “early” female pathway (eFP). Two genes coding for the GATA-type zinc finger protein 1 (*pmarg-zglp1*, Contig_25360) and vitellogenin-6 (*pmarg-vit6*, Contig_15150), showed expression at least tenfold higher in female oyster gonads in gametogenesis than in other categories, and thus were classed as markers of the female category (F). Finally, the two last genes, *pmarg-fem1-like* and *pmarg-dmrt* were expressed at least tenfold more in categories of the male pathway (UndM, InvM, M and MR), and consequently were considered as markers of the male pathway (MP). RNAseq expressions of these nine genes, classed into the new gonadic categories, are presented in Figure 24.

Table 4 List of the candidate marker genes of the female sexual pathway of *P. margaritifera*.

<i>P. margaritifera</i> contigs	Gene name	Protein name
Female pathway (MRF + UndF + InvF + F + FR)		
Contig_43072	<i>pmarg-foxl2</i>	Forkhead box L2
Contig_43476	<i>pmarg-c43476</i>	Unknown gene product
Contig_45042	<i>pmarg-c45042</i>	Unknown gene product
Early female pathway (MRF + UndF)		
Contig_19309	<i>pmarg-c19309</i>	Unknown gene product
Contig_54338	<i>pmarg-c54338</i>	Unknown gene product
Female category (F = FE + FI + FM)		
Contig_15150	<i>pmarg-vit6</i>	Vitellogenin-6
Contig_25360	<i>pmarg-zglp1</i>	GATA-type zinc finger protein 1
Male pathway (UndM + InvM + M + MR)		
Contig_639	<i>pmarg-dmrt</i>	Doublesex- and mab-3 related transcription factor
Contig_1317	<i>pmarg-fem1-like</i>	Fem1-like protein

Gene mRNA levels were then assessed using real-time PCR in a new set of oyster gonads (Figure 25A–I). These samples were classified into five gonadic categories only: M, MR, Und, F and FR, because it was not possible to determine the stages MRF, UndF or UndM, and FRM using histology. Concerning FP candidate genes, results of relative expression showed a significantly higher expression in female gonads overall, especially for *pmarg-c43476* (F: 0.0099 ± 0.0077 ; and FR: 0.0104 ± 0.0107) (Figure 25A, 25B and 25C). In the same way, relative expression of F and MP candidate genes seemed to show levels equivalent to their expression found in the RNAseq dataset. Indeed, *pmarg-vit6* (0.39 ± 0.53) and *pmarg-zglp1* (0.005 ± 0.006) were significantly more expressed in F gonads (Figure 25F and 25G), and *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like* were significantly more expressed in M gonads (0.005 ± 0.004 and 0.04 ± 0.02 respectively) (Figure 25H and 25I). For candidate genes to be markers of the early female pathway (eFP), *pmarg-c19309* and *pmarg-c54338*, there were no significant differences in their relative expression between gonadic categories (Figure 25D and 25E).

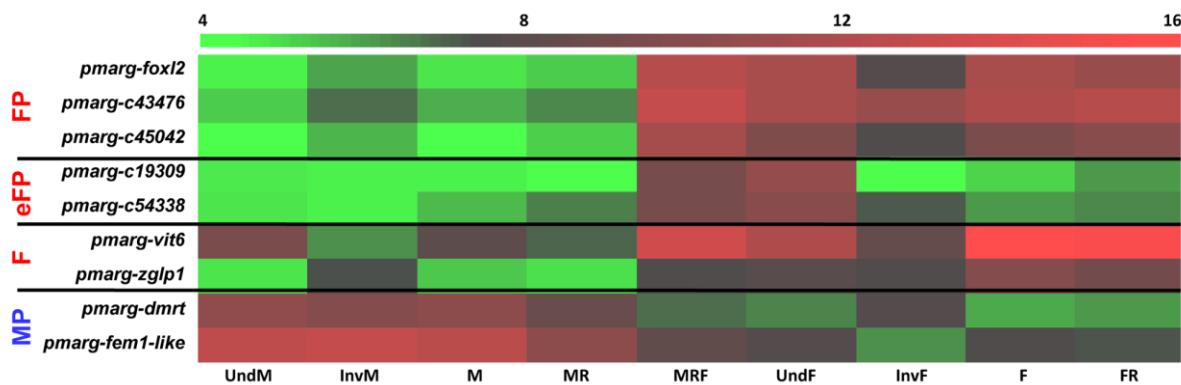


Figure 24 RNAseq expression of the nine selected genes of the female sexual pathway of *P. margaritifera*. Heat map of the RNAseq expression in the new gonad categories of the nine selected genes. Color represents the normalized expression after variance-stabilizing transformation (DESeq). Expression levels are depicted with a color scale, in which shades of red represent higher expression and shades of green represent lower expression. FP: the overall female pathway, eFP: early female pathway, F: female in active gametogenesis, MP: the overall male pathway. M or F: male or female in gametogenesis; (M/F)R: male/female at regression stage; Und(M/F): Undifferentiated gonad at the cellular level beginning a male or a female determination/differentiation at the molecular level; Inv(M/F): oyster in sexual inversion female to male or male to female; MRF: male at regression stage at the cellular level beginning a female determination/differentiation at the molecular level.

3.3. A 3 gene-pair expression ratio signature of the female sexual pathway in *P. margaritifera*

To cluster samples according to their similarity of expression patterns by the nine candidate genes, we performed a hierarchical clustering using spearman correlation, based not on relative expressions (9 variables) but on their ratio (36 variables), as in Ma et al. (2004). Following this method, samples were grouped into two main clusters discriminating samples in the male and female pathways (Figure 26). Moreover, each cluster was separated into two sub-clusters which seemed to separate oyster gonads on the early male or early female pathways (eMP or eFP), including undifferentiated and regressed gonads, from gonads in the course of active male or female gametogenesis (MP or FP).

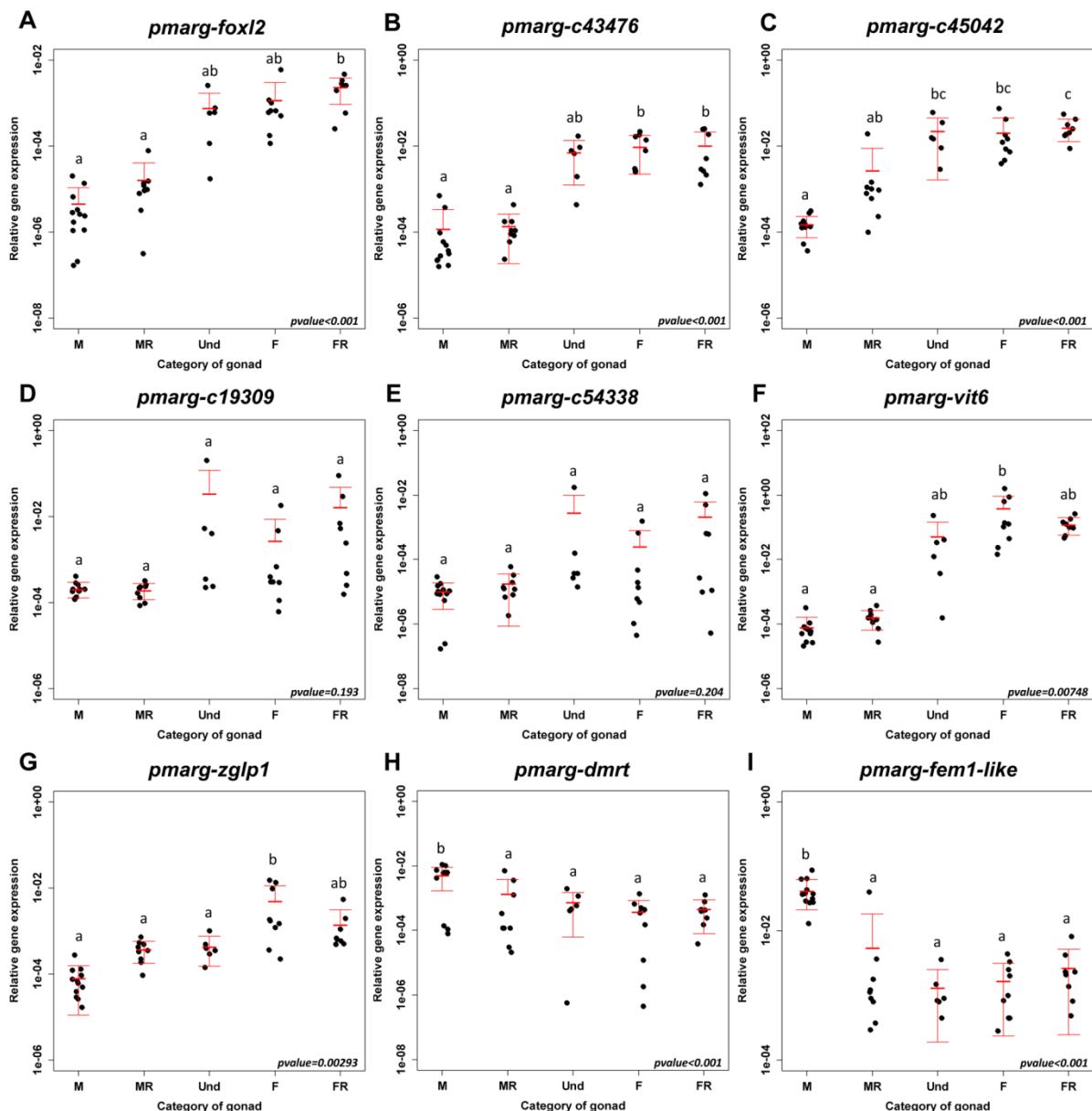


Figure 25 Relative expression of the nine selected marker genes of the female pathway of *P. margaritifera*. Relative expression profiles (real-time PCR) of *pmarg-foxl2* (A), *pmarg-c43476* (B), *pmarg-c45042* (C), *pmarg-c19309* (D), *pmarg-c54338* (E), *pmarg-vit6* (F), *pmarg-zglp1* (G), *pmarg-dmrt* (H), and *pmarg-fem1-like* (I) in gonad categories (new set of samples). Different letters indicate statistically significant differences determined by ANOVA. M or F: male or female in gametogenesis; (M/F)R: male/female at stage of regression; Und: Undetermined sex.

Next, to determine the major gene expression ratios explaining this clustering and thus having an effect on the sexual pathway, we performed a multivariate regression tree. A four-leaf MRT (where “leaf” refers to each terminal node), shown in Figure 27, best described sexual pathways, explaining 100% of the total variance (Error = 0, Cross-Validation error = 0.167, Standard error = 0.0702). From the MRT model obtained, it appeared that, among the 36 input variables, the most important factors/predictors were three relative gene expression ratios implicating four candidate marker genes: *pmarg-c43476*, *pmarg-foxl2*, *pmarg-c54338* and *pmarg-fem1-like*. The first regression tree split,

which explains 43% of the variance, is based on the relative gene expression ratio of *pmarg-c43476* to *pmarg-fem1-like*. If the expression ratio of these two genes is lower than 0.02 then, following the regression tree to the right, this means that the oyster sample is on the male pathway. When this ratio is higher than 0.02, following the MRT to the left, a second split then occurs based on the relative gene expression ratio of *pmarg-foxl2* to *pmarg-c54338*, which explains 30% of the variance. Samples showing *pmar-foxl2/pmarg-c54338* expression ratios greater or equal to 12.2 are on the female pathway, whereas samples showing a ratio lower than this critical value are on the early sexual pathway. Finally, the third and the last split of the regression tree (27% of the variance), is based on the *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like* expression ratio, and differentiates samples on the early female pathway (eFP) from those on the early male pathway (eMP) by a critical value of 0.1. Thus, following this MRT model of the sexual pathway of *P. margaritifera*, we can associate oysters with the particular pathways by analyzing the expression ratios of these three genes (i.e., *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like*, *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* and *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like*).



Figure 26 Hierarchical clustering using Spearman's correlation on gonad samples. Samples are divided into two main clusters based on their gene expression ratio pattern (36 variables), discriminating male and female pathways. Each cluster is divided into two sub-clusters discriminating oysters in early male or early female pathway (eMP or eFP) and oysters in the course of male or female pathway (MP or FP). M or F: male or female in gametogenesis; (M/F)R: male/female at regression stage; Und: gonad sex undetermined.

To test the predictive ability of this MRT model of the sexual pathway of *P. margaritifera* on other datasets, we predicted the sexual pathways on which were engaged the RNAseq samples. To do this, we used the RNAseq normalized expression (*estimatesizefactor*, DESeq) of the samples. The regression tree prediction matched with the previous hierarchical clustering (Figure 22). Samples of the male cluster were predicted to be on the male pathway and samples in the female cluster were predicted to be on the female pathway as shown in Table 5. The undetermined oyster gonads ("Und1"

and “Und2), oyster gonads in sexual inversion (“Inv1” and “Inv2”) and the male regressed gonad sample “MR2”, were classified as in the earlier analysis (Table 5, Figure 22).

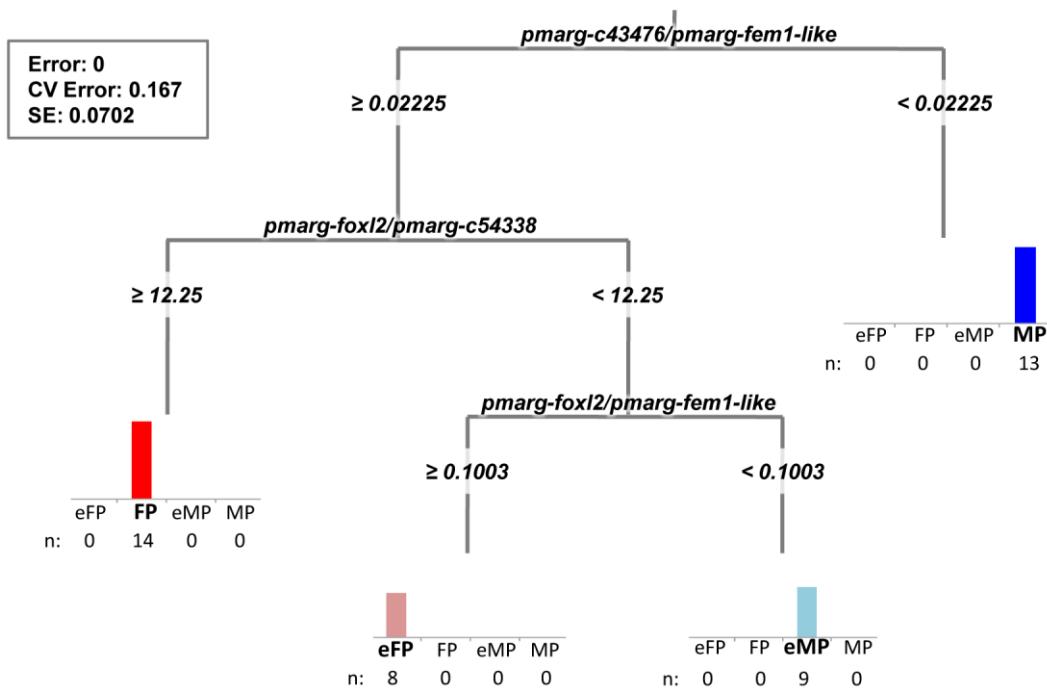


Figure 27 Multivariate regression tree of oyster sexual pathway categories. Candidate predictor/explanatory variables are the relative expression ratio of the nine potential marker genes (36 variables), and the response variables are the four sub-clusters of gonad samples ($n = 44$) determined by hierarchical clustering analysis (eMP or eFP: oyster on the early male or female pathway; MP or FP: oyster in the course of male or female pathway). This tree explained 100% of the total variance. The bar graphs at the end of each leaf represent the number of samples of the corresponding group. Statistics of the MRT are presenting at the left of the figure. Error: Residual error; CV Error: Cross-validation error; and SE: Standard error.

4. Discussion

As marine bivalves are organisms of major economic interest, genomic research has recently been conducted to provide greater insight into the molecular mechanisms governing various complex physiological traits (Joubert et al. 2010; Rosa et al. 2012; Li et al. 2013; Meng et al. 2013; Gavery and Roberts 2013; Shi and He 2014). Among those, several genomic studies have been employed successfully to better understand cellular and molecular mechanisms involved in reproductive behavior, including gametogenesis, sex determinism and sex differentiation (Banni et al. 2011; Dheilly et al. 2012; Ghiselli et al. 2012; Llera-Herrera et al. 2013; Sousa et al. 2014). Recently, in a previous study, a gonad transcriptome analysis of *P. margaritifera* was performed using Illumina-based RNAseq, which allowed to elucidate some molecular mechanisms involved in sex determination/differentiation and gametogenesis in this protandrous hermaphrodite species (Teaniniuraitemoana et al. 2014).

Here, we re-analyzed the quantification data of the *de novo* gonad transcriptome of *P. margaritifera* to identify marker genes of the female sexual pathway and therefore acquire further insights into the complex and unusual reproduction of the black-lip pearl oyster.

Table 5 Results of the predictive MRT model on RNAseq sample (data from Teaniniuraitemoana et al. 2014)

Sample	Cellular (histology)			Molecular	
Bank ID	CAH ID	Sex	Stage	CAH cluster	Decision tree group
17	ME1	Male	Early	Male	eMP
19	ME2	Male	Early	Male	MP
21	ME3	Male	Early	Male	MP
24	ME4	Male	Early	Male	MP
4	MI1	Male	Intermediate	Male	MP
18	MI2	Male	Intermediate	Male	MP
22	MI3	Male	Intermediate	Male	MP
30	MI4	Male	Intermediate	Male	MP
78	MM1	Male	Mature	Male	MP
123	MM2	Male	Mature	Male	MP
134	MM3	Male	Mature	Male	MP
135	MM4	Male	Mature	Male	MP
42	MR1	Male	Regression	Male	eMP
63	MR2	Male	Regression	Female	eFP
69	MR3	Male	Regression	Male	eMP
130	MR4	Male	Regression	Male	MP
8	FE1	Female	Early	Female	FP
31	FE2	Female	Early	Female	FP
43	FE3	Female	Early	Female	FP
133	FE4	Female	Early	Female	FP
27	FI1	Female	Intermediate	Female	FP
56	FI2	Female	Intermediate	Female	FP
83	FI3	Female	Intermediate	Female	FP
138	FM1	Female	Mature	Female	FP
143	FM2	Female	Mature	Female	FP
144	FM3	Female	Mature	Female	FP
148	FM4	Female	Mature	Female	FP
64	FR1	Female	Regression	Female	FP
79	FR2	Female	Regression	Female	eFP
132	FR3	Female	Regression	Female	FP
147	FR4	Female	Regression	Female	FP
1	Inv1	Inversion	-	Female	FP
150	Inv2	Inversion	-	Male	MP
57	Und1	Undetermined	-	Female	eFP
71	Und2	Undetermined	-	Male	MP

4.1. A dual approach to modeling *P. margaritifera* reproduction

Although hierarchical clustering, based on the expression pattern of the 1,937 contigs determined as differentially expressed using a stringent statistical analysis, did not discriminate gametogenic stages,

a clear grouping of the different sexes was observed. The main sex effect on gonadic gene expression had already been shown for *P. margaritifera* (Teaniniuraitemoana et al. 2014) as well as for other marine bivalves with different reproductive functioning, including the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (an irregular and alternative protandrous hermaphrodite) (Dheilly et al. 2012), Pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* (a functional hermaphrodite) (Llera-Herrera et al. 2013), and European clam *Ruditapes decussatus* (a gonochoric species) (Sousa et al. 2014).

Interestingly, it appeared that individuals in sexual inversion were distributed in both male and female clusters. Although oysters presented gametes of both sexes, the main gene expression pattern resulted from the sex that an oyster would become. This molecular aspect is in accordance with the cellular aspects found by observation of histological sections of gonads in the course of sexual inversion. Indeed, the new germ line, consisting of several oocytes or spermatocytes, appears at the periphery of the acini, whereas the former sex phenotype is represented only by a few residual spermatozoids or degenerated oocytes (Thielley 1993). Moreover, in the hierarchical clustering, one of the two undifferentiated individuals was grouped on the same branch as the females, and the other on the same branch as the males. Misclassification has already been observed in two other marine bivalve species, *C. gigas* and *R. decussatus*, where individuals at undetermined sex stages were found to express male- or female-specific genes, suggesting that sex differentiation had already taken place, even if it was not visible at cellular level using histology (Dheilly et al. 2012; Sousa et al. 2014). Here, the most unexpected result was finding that an individual histologically determined as a regressed male was grouped with female oysters. This result, leads us to hypothesize that although this oyster could be determined as male due to the presence of residual spermatozoids, it seemed to have already initiated female sex differentiation according to its gene expression pattern. Following this result, regression stage appears to constitute the sex-determining time window in *P. margaritifera*, as already proposed in *C. gigas*. For this latter irregular alternative hermaphrodite species, the sex-determining time window may occur in the period around the end of a reproductive cycle and the beginning of the next (Santerre et al. 2013).

All these results reveal the importance of considering both histological and molecular, approaches in the description and the understanding of the atypical reproduction of *P. margaritifera*. Thus, we established a new reference model of the reproduction of this species, elucidating stages found in the male or the female sexual pathway taking into account molecular signatures coupled with cellular descriptions. This is the first histo-molecular reproduction model proposed for a marine bivalve species.

4.2. The nine identified marker genes reveal a 3-gene-pair expression ratio model of the sexual pathway in *P. margaritifera*

Mechanisms of sex determination, which are critical for development and reproduction, are among the least well-known processes in biology, since they vary a great deal among species, in both primary

signal and downstream genetic pathways (Haag and Doty 2005; Yusa 2007). Sex determination is a crucial question that still needs to be elucidated in marine bivalves, especially pearl oyster, because of important implications for aquaculture. Providing a repertoire of molecular markers of the sexual pathway is essential for further studies on sex determination for this protandrous hermaphrodite bivalve.

Here, we selected nine genes as potential markers of the female sexual pathway based on their differential RNAseq expression, considering the new gonadic categories of the histo-molecular reproduction model. There were four unknown genes whose role cannot yet be interpreted, and five genes functionally assigned by orthology: *pmarg-foxl2*, *pmarg-vit6*, *pmarg-zglp1*, *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like*. These latter genes have already been shown to play a role in sex determination/differentiation or gonad development in other organisms. *pmarg-foxl2*, coding for the Forkhead box protein L2, is known to be essential for ovary differentiation and maintenance, and its repression of the genetic program for somatic testis determination (Uhlenhaut et al. 2009) has previously been characterized and discussed in the pearl oyster (Teaniniuraitemoana et al. 2014). The two genes *pmarg-vit6* and *pmarg-zglp1* coding for vitellogenin-6 and the GATA-type zinc finger protein 1, respectively, were identified here as putative markers of the female pathway. Indeed, vitellogenin, a female specific glycoprotein constituting the yolk protein, was identified as being necessary for building oocytes (Matsumoto et al. 2003; Dheilly et al. 2012). The GATA-type zinc finger protein 1, also named GATA-like protein-1 (GLP-1), was identified to be required for normal fertility in female mice, as its deficiency leads to the absence of oocytes at birth (Strauss et al. 2011). Finally, the two genes *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like*, orthologs of family genes known to be involved in sex determination/differentiation in model organisms and previously discussed in Teaniniuraitemoana et al. (2014), are underlined here for the male pathway.

To go beyond the limits of histological analysis mentioned above, we considered the 44 new gonadic samples based on their relative marker gene expression ratios. Hierarchical clustering revealed that oyster gonad samples can be clustered into four groups differentiating, on a first level, oysters on the main male and female pathways, and on a second level, oysters in the early stages of the male or female pathways. Herein, we successfully identified three gonad-expressed gene ratios correlated with the oyster sexual pathway. Among the 36 gene ratios, three were enough to explain 100% of the variance and thus can be considered as major sexual determinants. This 3-gene-pair ratio sexual pathway signature is *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like*, *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* and *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like*. It implicates two genes defined as potential markers of the female pathway, *pmarg-c43476* and *pmarg-foxl2*; one unknown gene, *pmarg-c54338*, detected as a marker of the early female pathway; and *pmarg-fem1-like*, a marker of the male pathway. The *P. margaritifera* *foxl2* gene, recently characterized in *P. margaritifera* (Teaniniuraitemoana et al. 2014), was identified here as a potential marker of the female sexual pathway due to its large over-expression throughout the time course of this pathway. In mammals, *foxl2* is expressed in follicular cells and is the earliest known

marker of ovarian differentiation (Cocquet et al. 2002; Schmidt et al. 2004). Interestingly, the level (0.1) of the gene expression ratio between *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* appears crucial in the sex determinism and sex differentiation of *P. margaritifera* distinguishing the early female and early male pathways. The *P. margaritifera fem1-like* gene was characterized as a derived member of the *Fem1* family, which includes the *fem-1* gene required for normal masculinization of somatic and germline tissue in the worm *Caenorhabditis elegans* (Hodgkin 1986). The high expression of *pmarg-fem1-like* might inhibit the expression of the *pmarg-foxl2* and thus cause the oyster to develop as a male. Such a pattern can be observed in *C. elegans*: *fem* genes inhibit *tra-1*, which would otherwise produce the protein TRA-1A whose sequence-specific DNA-binding would otherwise bring about female development by regulating the transcription of target genes (Zarkower and Hodgkin 1992; Zarkower and Hodgkin 1993). Although our results are insufficient to conclude that *pmarg-fem1-like* and *pmarg-foxl2* are major sex-determining genes in *P. margaritifera*, they would certainly play a key role in the molecular cascade of sex determination at a downstream level. Furthermore, unknown genes detected with relevant expression would be of great interest for further studies, as shown in other aquatic organisms (Yano et al. 2012).

5. Conclusion

The most significant outcomes of our study are the two models we constructed allowing us to improve our understanding of the specific reproduction of the marine bivalve *P. margaritifera*. The first is a model based on two approaches to reproduction in this species defining the gonadic stage occurring in the sexual pathway by considering two levels of analysis: histological and molecular. In particular it reveals that the sex-determining time window of *P. margaritifera* occurs during a regression phase of the gonad.

The second is a 3-gene-pair expression ratio based model, which makes it possible to predict the sexual pathway in this hermaphrodite species and can thus be used as a tool for future studies on female sex determination in *P. margaritifera*. Such work will aim to control reproduction for selection programs, thus supporting the sustainable development of pearl farming in French Polynesia. This latter model also revealed the importance of the expression of *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* for sex determination and the need to elucidate their role in *P. margaritifera* based on further functional research, such as the use of RNA interference now available in marine bivalves (Fabioux et al. 2009).

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: VT, AH, GLM and YG. Performed the experiment: VT and GLM. Analyzed the data: VT. Contributed reagents/materials/analysis tools: PL. Wrote the paper: VT. Critically revised the manuscript: AH, GLM, YG and NGM.

Acknowledgments

The authors are indebted to J.Y. Daniel, V. Quillien, V. Vonau, J. Fievet, C. Cabrau, L. Quintric, F. Marquer and all the staff of the GeT-PlaGe (<http://www.genomique.genotoul.fr/>) and Sigenae (<http://www.sigenae.org>) core facilities for their helpful assistance. We thank H. McCombie for English language editing.

Synthèse

Dans cette approche transcriptomique globale, il a été mis à profit l'évolution récente des méthodes de séquençage de nouvelle génération et de la technologie RNAseq afin de mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation sexuelle de l'huître perlière *P. margaritifera*.

Dans un premier temps le transcriptome de la gonade de *P. margaritifera* a été séquencé à partir de plusieurs échantillons gonadiques d'huîtres de sexe mâle et femelle à différents stades de développement (**Chapitre 1**). Après le séquençage Illumina et l'assemblage du transcriptome, 70 147 contigs ont été obtenus. L'analyse fonctionnelle de ces 70 147 contigs, a permis d'identifier des gènes d'intérêt et ainsi de constituer un catalogue de 87 ARNm codant pour 67 protéines potentiellement impliquées dans le déterminisme du sexe, la différenciation sexuelle et la gamétogenèse. Les fonctions de ces gènes sont inconnues chez *P. margaritifera* mais la plupart d'entre eux ont déjà été identifiés comme jouant un rôle dans ces processus chez divers organismes. En effet, nous avons caractérisés des orthologues des gènes *Dmrt*, *Sox9*, *Fem-1* et *Foxl2* codant pour des protéines impliquées dans la détermination et la différenciation sexuelle chez les vertébrés et chez le nématode *C. elegans* (Doniach et Hodgkin 1984; Ottolenghi 2005; Kanai et al. 2005; Kopp 2012).

De plus, l'analyse de l'expression différentielle des 70 147 contigs a révélé que 1 993 contigs étaient exprimés de manière différentielle entre les différentes catégories histologiques de gonades (sexes et stades différents). Ces profils d'expressions ont révélé que tout comme chez d'autres bivalves *R. decussatus* et *N. subnodosus* (Llera-Herrera et al. 2013; Sousa et al. 2014), le sexe à lui seul expliquait la plus grande part de la variance de l'expression des gènes au sein de la gonade. Cette analyse a également montré que 815 et 574 contigs se sont retrouvés spécifiquement exprimés dans les gonades mâles et femelles, respectivement. Les profils d'expression spécifiques de certains gènes tels que *pmarg-fem1-like*, *pmarg-dmrt* et *pmarg-foxl2* dans les différents stades de reproduction (indéterminé, inversion sexuelle et de régression) suggèrent que ces trois gènes seraient potentiellement impliqués dans le changement de sexe chez *P. margaritifera*.

Dans un deuxième temps, dans le **Chapitre 2**, une nouvelle analyse plus stricte des données de quantification RNAseq obtenues lors du chapitre précédent a été réalisée afin d'identifier des gènes candidats dans les échantillons de gonades histologiquement caractérisés et ainsi de déterminer des signatures moléculaires de la voie sexuelle chez *P. margaritifera*. Cette analyse plus stricte a révélé cette fois-ci 1 937 contigs exprimés de manière différentielle entre les catégories histologiques des gonades. À partir de l'analyse de leurs profils d'expression au sein de chaque échantillon, un modèle de la reproduction de *P. margaritifera*, basé sur une double approche analytique, eg. histo-moléculaire, a été proposé. Ce modèle révèle notamment que l'inversion sexuelle de *P. margaritifera* se produirait

durant une phase de régression de la gonade tout comme chez *C. gigas* où la fenêtre d'inversion sexuelle peut avoir lieu autour de la fin d'un cycle de reproduction et le début du prochain (Santerre et al. 2013).

À partir d'une troisième analyse de l'expression différentielle considérant les nouvelles catégories proposées par le modèle histo-moléculaire, neuf gènes candidats ont été identifiés comme biomarqueurs de la voie sexuelle. Les niveaux d'expression de ces gènes ont été analysés par PCR en temps réel sur une nouvelle série d'échantillons gonadiques. Leur rapport d'expression au sein de ces nouvelles gonades a révélé quatre profils d'expression principaux : les individus en gaméto-génèse mâle ou femelle et les individus en début de voie sexuelle mâle ou femelle. Un arbre de régression multivariée réalisé sur ces nouveaux échantillons et sur les échantillons RNAseq analysés précédemment a montré que la voie sexuelle de *P. margaritifera* peut être prédite par un modèle basé sur 3 rapports d'expression : *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like*, *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* et *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like*. Ce deuxième modèle suggère fortement l'implication de *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like* dans l'inversion et la différenciation sexuelle de *P. margaritifera*. En effet, il apparaît que le rapport de ces deux gènes serait déterminant dans la voie de sexualisation différenciant les individus en début de voie sexuelle mâle des individus en début de voie sexuelle femelle.

Grâce à cette analyse transcriptomique globale, des nouvelles informations sur les mécanismes moléculaires de la reproduction de *P. margaritifera* ont été apportées permettant ainsi une meilleure compréhension de l'inversion et de la différenciation sexuelle au plan moléculaire. En outre, cette analyse a permis aussi de proposer des outils utiles pour comprendre et étudier l'inversion sexuelle chez cette espèce hermaphrodite protandre.

PARTIE II

Contrôle de la différenciation sexuelle de l'huître perlière par des facteurs environnementaux et hormonaux anthropiques

Vers l'expression du potentiel féminin ?

Introduction

Dans la partie précédente, le déterminisme du sexe a été appréhendé au point de vue moléculaire afin d'identifier les gènes pouvant jouer un rôle clé dans la différenciation sexuelle et potentiellement dans le déterminisme du sexe de l'huître perlière. Neuf biomarqueurs de la sexualisation ont été déterminés révélant un modèle prédictif de la voie sexuelle basé sur 3 ratios d'expressions de gènes. Ce modèle apparaît comme un outil puissant pour l'étude de l'inversion et la différenciation sexuelle. Dans cette deuxième partie, la différenciation sexuelle de l'huître perlière est abordée au plan environnemental et hormonal de manière anthropique. Il s'agit ici d'étudier la possibilité d'induire une féminisation des huîtres perlières par ces 2 types de forçages. Une telle approche combine non seulement un objectif académique (l'obtention d'une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans la différenciation sexuelle chez *P. margaritifera*), mais aussi un objectif appliqué (proposition des méthodes de gestion optimale des géniteurs au sein des éclosseries).

Les principaux facteurs connus pour être impliqués dans le déterminisme environnemental du sexe sont la température, la disponibilité de la nourriture et la densité de population (Pradeep et al. 2012). Chez les bivalves, l'influence de ces derniers paramètres et plus particulièrement la température sur le sex-ratio a aussi été montrée bien que peu étudiée (Fabioux et al. 2005; Santerre et al. 2013). Cependant de nombreuses études montrent que le cycle de reproduction chez les bivalves est généralement influencé par des facteurs environnementaux et notamment la température et la ressource trophique (Bayne 1976; Sastry 1979; Gervis et Sims 1992; Fabioux et al. 2005). Par ailleurs il apparaît que l'apport anthropique d'hormones stéroïdiennes par injection, alimentation ou balnéation est susceptible d'influencer la reproduction des bivalves que ce soit au niveau de la gamétogénèse ou du sex-ratio, avec notamment un effet féminisant de l'œstradiol comme chez l'huître creuse *C. gigas* (Mori et al. 1969; Moss 1989; Varaksina et Varaksin 1991). Chez *P. margaritifera*, une ressource trophique abondante favorise la gamétogenèse. Le sex-ratio est quant à lui supposé être influencé par la température car un plus grand nombre de femelle est retrouvé dans les populations du nord de l'archipel des Tuamotu où la température est plus élevée et les variations plus faibles (Chávez-Villalba et al. 2011). En outre, il n'existe encore aucune preuve de l'impact des paramètres environnementaux ou biotiques sur le sexe lors des deux premières années de vie de *P. margaritifera*. En effet, il n'a jamais été observé de changement de sexe avant cet âge, suggérant ainsi que la période critique de la féminisation de *P. margaritifera* survient quand l'huître perlière est âgée de plus de 2 ans (Chávez-Villalba et al. 2011) comme chez le poisson *Acanthopagrus schlegeli* (Wu et Chang 2013). Le modèle histo-moléculaire proposé dans le Chapitre 2 a permis d'associer cette période critique à une phase de régression de la gonade.

Dans ce contexte, cette deuxième partie constituée d'un seul et dernier chapitre, le **Chapitre 3**, propose, par une approche expérimentale, de décrire l'influence de la température, de la disponibilité de la nourriture, et pour la première fois de l'œstradiol sur la gaméto-génèse et la sexualisation de *P. margaritifera*. Ainsi, deux expérimentations séparées ont été réalisées pour mettre en évidence l'effet de plusieurs combinaisons de température (24 and 28°C) et de niveau trophique (10 000 et 40 000 cellules mL⁻¹) (Expérimentation 1, Exp1) et de l'œstradiol-17 β (100 µg) administré par injection directe dans la gonade (Expérimentation 2, Exp2), sur le sexe, la gaméto-génèse et l'expression des neuf gènes biomarqueurs de la voie sexuelle identifiés lors de la partie précédente (Chapitre 2). Les expérimentations se sont déroulées au COP à Vairao entre Février et Avril 2013 pour l'Expérimentation 1 et entre Janvier et Mars 2014 pour l'Expérimentation 2.

Avant le début de chaque expérience, les huîtres ont été individuellement sexées par biopsie puis sous-alimentées dans le but de faire régresser la gonade et ainsi stopper la production des gonies (Le Moullac et al. 2013) afin de i) synchroniser les huîtres au point de vue de la gaméto-génèse, et ii) de placer les huîtres au niveau de la fenêtre de féminisation révélée par l'approche transcriptomique globale comme se produisant lors d'une phase de régression (supposé et confirmé dans le Chapitre 1 et 2, respectivement). À la fin de cette phase de standardisation les gonades d'un lot d'huîtres perlières ont été échantillonnées pour définir l'état initial de la population au plan gaméto-génique avant chaque expérience.

Dans la première expérimentation (Exp1) des huîtres âgées de 3 ans ont été mises en conditionnement contrôlé dans 8 bacs expérimentaux et ont été soumises aux différentes combinaisons environnementales. Les huîtres ont été prélevées après 30 et 60 jours de conditionnement.

Dans l'expérience hormonale (Exp2), 2 conditions ont été testées : la condition « injectée avec l'œstradiol-17 β » et la condition Témoin « injectée sans l'œstradiol-17 β ». Les injections ont été effectuées 1 fois par semaine durant 3 semaines sur des huîtres âgées de 2 ans et demie. Puis les huîtres ont été mises en lagon. Ici les huîtres ont été prélevées après 5 et 8 semaines après la première injection.

À chaque prélèvement la gonade de chaque individu a été prélevée pour l'analyse histologique du sexe et de la gaméto-génèse et pour l'analyse moléculaire des gènes biomarqueurs.

Chapitre 3: Effect of temperature, food availability and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Vaihiti Teaniniuraitemoana¹, Maxime Leprêtre¹, Peva Levy¹, Vincent Vanaa¹, Sophie Parrad¹, Nabil Gaertner-Mazouni², Yannick Gueguen^{1,#}, Arnaud Huvet³, Gilles Le Moullac^{1*}

Aquaculture (en préparation)

¹ Ifremer, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 7004, 98719 Taravao, Tahiti, Polynésie Française

² Université de la Polynésie Française, UMR 241 EIO, Labex CORAIL, BP 6570, 98702 Faa'a, Tahiti, Polynésie Française

³ Ifremer, UMR 6539 LEMAR, BP 70, 29280 Plouzané, France

Present address : Ifremer, UMR 5119 Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM), Montpellier, France.

Abstract

The black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* is a protandrous hermaphrodite species. Its economic value has led to the development of controlled hatchery reproduction techniques, notably for use in genetic selection programs, although many aspects remain to be optimised. In order to understand reproductive mechanisms and their controlling factors, two experiments were designed to test hypotheses of gametogenesis and sex ratio control by environmental and hormonal factors. Pearl oysters were conditioned at different combinations of temperature (24 and 28°C), food level (10 000 and 40 000 algal cells mL⁻¹) and successive 17β-estradiol injections into the gonad. Gametogenesis and sex ratio were assessed by histology for each treatment. In parallel, mRNA expressions of nine gene markers of the female sexual pathway (*pmarg-foxl2*, *pmarg-c43476*, *pmarg-c45042*, *pmarg-c19309*, *pmarg-c54338*, *pmarg-vit6*, *pmarg-zglp1*, *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like*) were investigated. Maximum maturation was observed in the treatment combining the highest temperature (28°C) and highest microalgae concentration (40 000 cells mL⁻¹), where the female sex tended to be maintained. Injection of 17β-estradiol induced a significant decrease of the proportion of males and a significant increase of the proportion of individual of undetermined sex 2 weeks after the third injection. However, after 6 weeks, all of the oysters were in active male gametogenesis. These results suggest that gametogenesis and gender in adult pearl oysters can be controlled by environmental factors and estrogens. While there were no significant effects on relative gene expression, the 3-gene-pair expression ratio model of the sexual pathway of *P. margaritifera*, revealed that 10% of the regressed male pearl oysters histologically determined were in early female sexual differentiation at the molecular level. This ratio appears no different to the female ratio found in natural populations, suggesting a probable dominance of genetic sex determinism in adult *P. margaritifera*, without

excluding a mixed sex determination mode. The results also suggest an involvement of *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* at the top of the molecular cascades of sex determination in *P. margaritifera*.

Keywords

Pinctada margaritifera, reproduction, gametogenesis, sex ratio, temperature, food availability, 17 β -estradiol

1. Introduction

The black pearl industry, which is the second most important economic resource for French Polynesia after tourism, is based on the exploitation of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). Breeding of selected donor oyster lines providing high-performance graft tissue is a way to improve the production of quality pearls (Tayalé et al. 2012; Ky et al. 2013; Ky et al. 2014). Such genetic selection is based on controlled pearl oyster reproduction in the laboratory, which requires an understanding of the physiological mechanisms involved and the factors controlling them (Gueguen et al. 2013). The artificial reproduction of the pearl oyster *P. margaritifera* implies being able to control gametogenesis and the synchronization of maturity stages of the breeders, but most importantly requires the management of sexratio for broodstock husbandry, which appears to be the main limitation. Indeed, reproduction of pearl oyster under controlled conditions mainly depends on the availability of females, which unfortunately are not abundant among young farmed batches of this species due to its protandrous hermaphroditism (Tranter 1958a). This particular reproductive strategy poses a problem of generation time for the renewal of oyster lines in hatcheries because it takes 4-5 years for a significant number of females to produce offspring (Chávez-Villalba et al. 2011).

In the animal kingdom, sex determination can be genetic (GSD), environmental (ESD); or the result of an interaction of both these factors (Valenzuela et al. 2003; Wedekind and Stelkens 2010). The main factors involved in ESD mechanisms are temperature, food availability and population density (Pradeep et al. 2012). In marine bivalves, only a few studies have covered the influence of these latter parameters on sex ratio. Stenyakina et al. (2010) showed a male-biased sex ratio in fasting mussel *M. charruana*. In Pacific oyster *Crassostrea gigas*, an alternative and irregular protandrous hermaphrodite, a male-biased sex ratio was obtained in adults by conditioning at low temperature (8°C) (Fabioux et al. 2005) whereas in spat of the same species it was obtained by conditioning at high temperature (25°C) (Santerre et al. 2013).

The pearl oyster is a suspension feeder particularly abundant in the Polynesian archipelagos where annual temperatures range from 22 to 31°C (Zanini and Salvat 2000; Fournier et al. 2012b; Le Moullac et al. 2012). *P. margaritifera* reaches sexual maturity at the end of its first year. Its production of gametes is continuous, asynchronous, and linked to pearl oyster size (Pouvreau et al. 2000b). Most studies show that the reproductive cycle in bivalves is generally influenced by environmental factors

(Sastry 1979; Bayne and Newell 1983; Gervis and Sims 1992). In temperate areas, Fabiou et al. (2005) showed that the gametogenic cycle of *C. gigas* depends on temperature and food availability. In tropical areas such as French Polynesia, however, there is no clear seasonal cycle because there is little temperature variation. Pearl oysters are reproductively active almost all year round (Pouvreau et al. 2000b; Le Moullac et al. 2012), with abundant trophic resources promoting gametogenesis and spawning (Fournier et al. 2012b). A recent study in *P. margaritifera* confirmed that gametogenesis is modulated by food level: under-feeding decreases or stops germinal activity, preventing any resumption of gametogenesis (Le Moullac et al. 2013). However, a better understanding of the influence of environmental factors on gametogenesis remains essential for controlling this crucial step in the rearing cycle.

Although some debates occur in the scientific community (Scott 2012; Scott 2013), fluctuations in levels of sex steroids have been found to be correlated with the sexual maturation cycle in a number of bivalves, thus suggesting that sex steroids may play important stimulatory roles in their reproductive regulation (Matsumoto et al. 1997; Osada et al. 2004; Gauthier-Clerc et al. 2006; Ketata et al. 2007). This hypothesis is supported by Varaksina and Varaksin (1991) and Varaksina et al. (1992) who reported that injections of estradiol, progesterone and testosterone stimulated both oogenesis and spermatogenesis in adult Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*. In the clam *Mulinia lateralis*, administration of methyltestosterone accelerated sex maturation and resulted in an increase in spawning frequency (Moss 1989), while estradiol injections stimulated vitellogenesis in the oyster *C. gigas* (Li et al. 1998; Osada et al. 2003). There is also evidence indicating that the gender of bivalves can be affected by sex steroids. Moss (1989) (Moss 1989), showed that methyltestosterone fed to spawned clam *M. lateralis* increased the male/female ratio from 0.8 to 1.6. Mori et al. (1969) showed that injection of estradiol into the oyster *C. gigas* at early stages of seasonal maturation induced sex reversal from male to female. In the pearl oyster *P. margaritifera*, no studies have yet been published on the possible effects of sex steroids on gametogenesis or gender determination.

The genetic and/or environmental process that establishes the gender of an organism (Penman and Piferrer 2008), leads to specific molecular cascades transforming an undifferentiated gonad into a testis or an ovary (Piferrer and Guiguen 2008). Recently, a gonad transcriptome analysis of *P. margaritifera*, using Illumina-based RNAseq, made it possible to propose a new model of the reproduction of *P. margaritifera* based on a dual histo-molecular approach (Teaniniuraitemoana et al. 2014); this revealed that the regression phase of the gonad could open the time window for adult sex-determination. In addition, after examining expression of nine identified marker genes of the female sexual pathway, a model was formed based on the expression ratios of 3 gene pairs. This model makes it possible to predict sexual pathway in this hermaphrodite species. This 3-gene-pair ratio sexual pathway signature concerns the ratios *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like*, *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* and *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like* and strongly suggests the involvement of *pmarg-foxl2* and *pmarg-*

fem1-like in sex determination and differentiation in *P. margaritifera* (Teaniniuraitemoana et al.; submitted).

In this context, the main objective of the present study was to examine, using two separate experiments, (1) the effect of environmental combinations of temperature (24°C and 28°C) and trophic level (10 000 and 40 000 microalgae cells mL⁻¹) and (2) the effect of injected 17 β -estradiol (100 µg) on gender, especially sexratio, gametogenesis and mRNA level of nine marker genes of the female sexual pathway.

2. Materials and Methods

2.1. Biological material

The effect of environmental factors (temperature and trophic level) was tested on 360 three-year-old male and female adult pearl oysters with an average size of 118 mm ± 8.67. These pearl oysters were transported from Takaroa (Tuamotu Archipelago, French Polynesia) to Vairao lagoon (Tahiti, French Polynesia) where they were acclimated for 3.5 months.

The effect of 17 β -estradiol injection was tested on 260 two and a half-year-old male pearl oysters with an average size of 65 mm ± 8.13. These pearl oysters were issued from a multi-familial cross performed, according to Ky et al. (2013), in the Ifremer hatchery by crossbreeding broodstock oysters (4 males and 6 females) originated from the Apataki atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia) in June 2011, and were reared in the Vairao lagoon.

2.2. Initial biopsy and standardization by gonad regression

Before the start (d0) of the two experiments (environmental: Exp1, February to April 2013; and hormonal: Exp2, January to March 2014), all pearl oysters ($n = 360$ for Exp1 and $n = 260$ for Exp2) were labelled individually and sexed by biopsy. They were then placed in the lagoon for a minimum of 2 weeks for recovery. The biopsy was performed using a needle mounted on a piston syringe inserted in the gonadic part of the visceral mass to collect gametes. Sex was determined by observation under a binocular dissecting microscope.

After the recovery period in the lagoon, pearl oysters were subjected to a period of under-feeding to stop the production of gonial cells (Le Moullac et al. 2013) and synchronize gametogenesis. For Exp1, oysters were placed randomly in 8 tanks (250 L) and then fed for 7 days on 4 400 cells mL⁻¹ microalgae (1/3 *Chaetoceros gracilis* and 2/3 *Isochrysis galbana*) at a temperature of 28°C. For Exp2, oysters were placed randomly in 26 tanks (30 L) and maintained for ten days with continuously renewed sea water at 28°C and a mean chlorophyll-a concentration of 0.015 µg L⁻¹. This phase ended by the sampling of 40 and 20 individuals in Exp1 and Exp2, respectively, to define the initial state in gametogenesis of population in each experiment before treatments.

2.3. Pearl oyster conditioning according to temperature and trophic level (Exp1)

Pearl oysters were reared at two trophic levels ($10\,000\text{ cells mL}^{-1}$ and $40\,000\text{ cells mL}^{-1}$) and two temperatures (24°C to 28°C) for 8 weeks. Four experimental treatments were realized in the laboratory in duplicate ($24^\circ\text{C} + 10\,000\text{ cells mL}^{-1}$: "24-10"; $24^\circ\text{C} + 40\,000\text{ cells mL}^{-1}$: "24-40"; $28^\circ\text{C} + 10\,000\text{ cells mL}^{-1}$: "28-10"; $28^\circ\text{C} + 40\,000\text{ cells mL}^{-1}$: "28-40"). Oysters ($n = 320$) were distributed between 8 experimental tanks (250 L), with 32 males and 8 females per tank. Seawater renewal (100 L h^{-1}) was maintained constant. Homogenization of the environment in the tanks was achieved by "air-lifts", and photoperiod was maintained at 12 h. The tanks were cleaned once a week. Pearl oysters were fed with a mixed diet composed of 2:1 (v:v) of *Isochrysis galbana* (T-Iso) and *Chaetoceros gracilis* cells, supplied continuously with Blackstone dosing pumps. Cooled sea water was produced using a plate heat exchanger stocked with cold fresh water, and warmed sea water was produced using a 2 500-watt electric heater. Each rearing tank was sampled automatically every 3 min for fluorescence and temperature measurements. The fluorometer was first calibrated for algal concentration (cells mL^{-1}) and the temperature probe was calibrated using a reference electronic thermometer. After 30 days (d30), 16 males and 4 females were randomly sampled from each tank. The 160 remaining pearl oysters were sacrificed at the end of the experiment (d60) to assess the final state.

2.4. Pearl oyster conditioning using estradiol injection (Exp2)

17β -estradiol (E_2) was purchased from Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany). E_2 was dissolved in 100% ethanol, which was then diluted 1:100 with 1- μm filtered sterilized seawater to give a $0.5\ \mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$ stock solution. From this solution, 200 μL were injected directly into the gonad of each animal ($n = 120$). The remaining pearl oysters ($n = 120$), were injected with 200 μL of a 1:100 mixture of ethanol and sterilized seawater to serve as a control. Three successive injections were performed once a week at the beginning (day 0, d0), at day 7 (d7) and at day 14 (d14) of the experiment. To minimise stress caused by the gonad injections, oysters were anaesthetized using $MgCl_2$ following the protocol provided by Suquet et al. (2009). After each injection, the pearl oysters were put back in the lagoon, where they were hung on ropes in groups of 20 on a submerged long-line at 7 m depth. Two weeks after the last injection (d28), the first half of the pearl oysters was collected. The second half was sacrificed at the end of the experiment, 6 weeks after the final injection (d56).

2.5. Histology

For each oyster, gonad tissue was sampled for histological examination. After dissection, the visceral masses were fixed in formalin solution 10% diluted in seawater for 48 hours before being transferred to 70% ethanol for 48 hours. Then, the visceral masses were cut along the sagittal plane with a microtome blade. Gonad development stage and sex were then determined by histological methods (see Fournier et al. (2012b) for details) and thus samples were classified according to the ten different

categories of gonadic tissues described previously in Teaniniuraitemoana et al. (2014): males and females at “Early” stage (the gonad is in early gametogenesis), “Intermediate” stage (the gonad is developing), at “Mature” stage (the oyster is ready to spawn), “Regressed” stage (the gonad has stopped generating gametes); “Inversion” (the gonad presents both male and female gametes together) and “Undetermined” (the gonad contains no gametes at all).

2.6. Real time PCR

For each oyster, a piece of gonad tissue was sampled, put in RNAlater™ (Qiagen) (50 mg mL⁻¹) and then stored at -80°C for subsequent total RNA extraction.

Total RNA was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen) and treated with DNase I using a DNA-free™ Kit (Ambion) following manufacturer’s instructions. RNA concentrations were measured using an ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) at 260 nm, using the conversion factor 1 OD = 40 µg mL⁻¹ RNA. For each sample, 0.5 µg of total RNA were reverse-transcribed using a Transcripter First Strand cDNA Kit (Roche) and amplified by real time PCR on a Stratagene MX3000P. The amplification reaction contained 12.5 µL 2X SYBR green qPCR Master Mix (Stratagene), 10 µL cDNA template, and 2.5 µL of each primer (4 µM) in a final volume of 25 µL. Each run included a positive cDNA control and a blank control (water) for each primer pair. Relative gene expression was calculated using two reference genes, *ef1a* and *gapdh1*, using the 2^{-ΔCt} method (Livak and Schmittgen 2001) as follows: Relative expression_(target gene, sample x) = 2⁻(C_t_{target gene, sample x} - C_t_{reference gene, sample x}). PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the cDNA control to ensure that E ranged from 90 to 110%. The 9 primer pairs used for amplification and described in Teaniniuraitemoana et al. (submitted) are listed in Table 6.

2.7. Molecular sexual pathway determination

To determine the molecular sexual pathway of oysters, we used the model proposed by Teaniniuraitemoana et al. (submitted) based on the expression ratios of three genes: *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like*, *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* and *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like*. According to this model, oysters are molecularly on the female pathway when they combine a *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.02225 and a *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* gene ratio ≥ 12.25; or a *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.02225, a *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* gene ratio < 12.25 and a *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.1003. Oysters are on the male pathway when they present a *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like* gene ratio < 0.02225 or the combination of a *pmarg-c43476/pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.02225, a *pmarg-foxl2/pmarg-c54338* gene ratio < 12.25 and a *pmarg-foxl2/pmarg-fem1-like* gene ratio < 0.1003.

Table 6 Primers used for real time PCR.

Gene names	Genbank Accession numbers	Primer names	Forward vs Reverse	Sequences (5'-3')
<i>pmarg-foxl2</i>	KJ907378	FOXL2_1S	F	TCCGGATCACAGTGTCTCAG
		FOXL2_1AS	R	GACAGCAACGCACAGAATGT
<i>pmarg-c43476</i>	KM874285	C43476_VF_1S	F	ACCCTTACCAATCACCTGC
		C46476_VF_1AS	R	TAACCAGGCCGGGACTAT
<i>pmarg-c45042</i>	KM874286	C45042_VF_2S	F	GAGTGGAAGCAAGACAGACCA
		C45042_VF_2AS	R	TCCCAGAGGTTGCCAGAACATAC
<i>pmarg-c19309</i>	KM874287	C19309_NFMRF_2S	F	GATGCACTAGACACGCCTGA
		C19309_NFMRF_2AS	R	ACATGGATCTCTGTAACCGCGT
<i>pmarg-c54338</i>	KM874288	C54338_NFMRF_1S	F	CGTCTTCTCTAATTACG
		C54338_NFMRF_1AS	R	CAGTACACACCAGTATTGA
<i>pmarg-vit6</i>	KM874283	Vit-6_2S	F	GTCCGCCAGTAAACAAAGA
		Vit-6_2AS	R	CAATGTTGGTCCAGCTTCCT
<i>pmarg-zglp1</i>	KM874284	ZGLP1_4S	F	AGGCTTCTTGTCAGACCACA
		ZGLP1_4AS	R	GTGCTGAGAGATGTGATCCCA
<i>pmarg-dmrt</i>	KJ907374	Dmrt_2S	F	AACCTCTGGGTGACAACACTGG
		Dmrt_2AS	R	ATCCAGGACCACAGGTTCAAG
<i>pmarg-fem1-like</i>	KJ907377	FEM-1_4S	F	ACTCCACAACCAGCTTCACA
		FEM-1_4AS	R	GTGCCGATGTGACACTGAGA
<i>ef1a</i>	-	EF1a5_S	F	CCACGAGTCCTTACCAAGAGG
		EF1a5_AS	R	TGGATCACTTTGCTGTCTCC
<i>gapdh1</i>	-	GAPDH1_S	F	AGGCTTGATGACCAGTGTCC
		GAPDH1_AS	R	AGCCATTCCCGTCAACTTC

2.8. Statistical analysis

Gametogenesis, sex ratio and sexual pathway were analyzed using Fischer's exact test in XLStat software. The mean of relative gene expressions were compared using the non-parametric Kruskall-Wallis test, and pair wise multiple comparisons were carried out according to the procedure of Wilcoxon using Bonferroni correction in R software (R Development Core Team 2011). All these statistical analyses were conducted with the threshold of significance $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Environmental effects on gametogenesis and sex ratio

Significant differences in the proportion of reproductive stages were revealed between the different treatments (Fisher's exact test; *pvalue* < 0.05) in the two experiments (Figure 28 and 29). At d0 of experimentation (initial state), there was a significantly higher proportion of regressed gonads, than that expected, with 100% and 80% in Exp1 and Exp2, respectively, probably caused by the initial under-feeding.

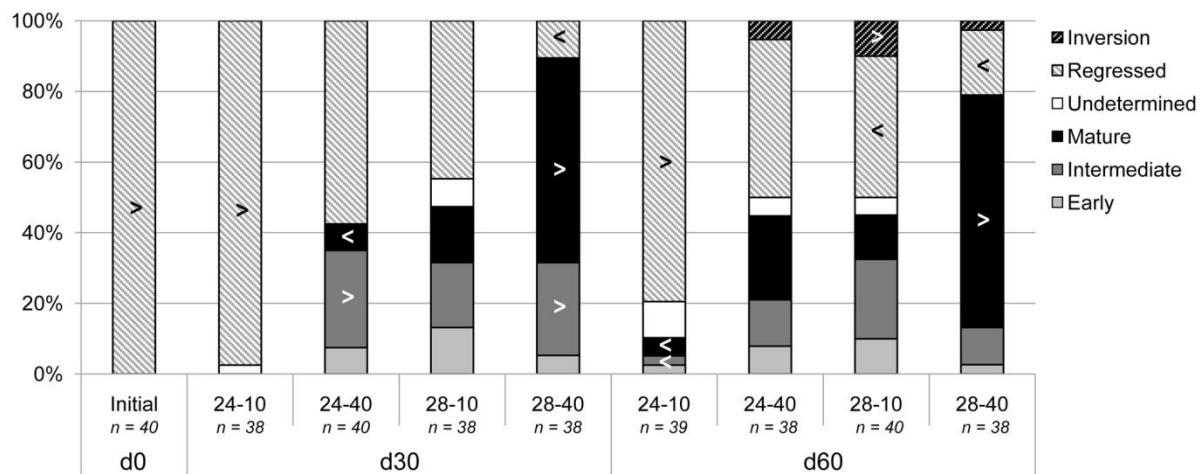


Figure 28 Frequency of maturity stages observed by histology in the environmental experiment (Exp1). Number of animals (n) sampled at each sampling time and in each treatment is indicated below each histogram. > indicates a significant higher number and < a significant lower number between conditions than predicted ($p < 0.05$, Fisher exact test). 24-10: $24^{\circ}\text{C} + 10\,000 \text{ cells mL}^{-1}$; 24-40: $24^{\circ}\text{C} + 40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$; 28-10: $28^{\circ}\text{C} + 10\,000 \text{ cells mL}^{-1}$; 28-40: $28^{\circ}\text{C} + 40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$.

In the environmental experiment (Exp1, Figure 28), after 60 days of conditioning, a significantly lower proportion (5%) of mature gonads was obtained than expected for pearl oysters conditioned at 24°C and $10\,000 \text{ cells mL}^{-1}$. For pearl oysters conditioned at 28°C and $40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$, a significantly higher proportion (65.7%) of mature gonads was obtained than expected. In this latter treatment, a higher proportion of mature pearl oysters than the expected distribution was also found after only 30 days of conditioning. Regressed gonads were observed in all temperature and trophic level combinations. Significantly higher proportions of regressed gonads were found in the treatment combining 24°C and $10\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ after both 30 and 60 days of conditioning. Pearl oysters in the regressed stage were also found in the treatment $28^{\circ}\text{C} + 40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$, but in significantly lower numbers than the expected distribution.

In addition, Fisher's exact test revealed significant differences in the proportion of females and animals in inversion ($p\text{value} < 0.001$; Table 7). Conversely, the proportion of males did not change significantly. At d30, changes in the sex ratio were found only at low trophic level. In the $28^{\circ}\text{C} + 10\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ treatment, three individuals became sexually undifferentiated, plus one female animal died. At d60 significant effects of environmental factors on the sex ratio were observed. At low trophic level and 28°C , a significant proportion of females (50%) was undergoing inversion to become male. In pearl oysters fed with a concentration of $40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$, a significantly smaller proportion of inversion was observed. At 24°C , two "female to male" inversions were observed whereas only one was seen at 28°C .

Table 7 Numbers of oysters with gonads classed as male, female, undetermined and inversion in each treatment of the two experiments.

Time	Condition	Male	Female	Undetermined	Inversion
Experiment 1 (Exp1)					
T0	-	32	8	0 ^{<}	0 ^{<}
T30	24-10	31	7	1	0 ^{<}
	24-40	32	8	0 ^{<}	0 ^{<}
	28-10	29	6	3	0 ^{<}
	28-40	30	8	0 ^{<}	0 ^{<}
T60	24-10	30	5	4	0 ^{<}
	24-40	28	6	2	2
	28-10	32	2 ^{<}	2	4 ^{>}
	28-40	30	7	0 ^{<}	1
Experiment 2 (Exp2)					
T0	-	19	0	1	0
T28	17 β -Estradiol	36 ^{<}	0	8 ^{>}	0
	Control	43	0	5	0
T56	17 β -Estradiol	39	0	0 ^{<}	0
	Control	47 ^{>}	0	0 ^{<}	0

[>] indicates a significant higher number and [<] a significant lower number between conditions ($p < 0.05$, Fisher exact test).

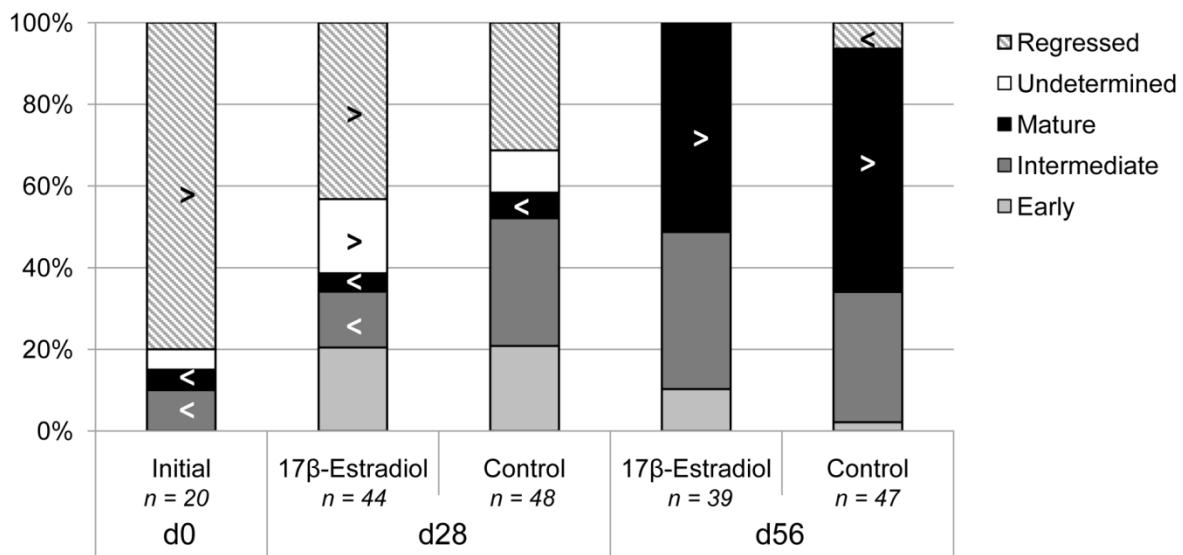


Figure 29 Frequency of maturity stages observed by histology in the hormonal experiment (Exp2). Number of animals (n) sampled at each sampling time and in each treatment is indicated below each histogram. [>] indicates a significant higher number and [<] a significant lower number between conditions ($p < 0.05$, Fisher exact test).

3.2. Effects of estradiol injection on sex ratio and gametogenesis

In the hormonal experiment (Exp2, Figure 29), after 28 days, there were significantly higher proportions of regressed and undifferentiated gonads for pearl oysters injected with 17 β -estradiol. These two stages were not found at all after 56 days in this treatment, where the mature stage then appeared significantly dominant (51%) as in the control treatment (60%). Some pearl oysters in

regression were also found in the control group at the end of the experiment (2%) but in significantly lower proportions than in the expected distribution.

3.3. Gene expression analysis reveals male pearl oysters at the onset of female differentiation

Gene expression analysis of nine candidate marker genes (*pmarg-foxl2*, *pmarg-c43476*, *pmarg-c45042*, *pmarg-c19309*, *pmarg-c54338*, *pmarg-vit6*, *pmarg-zglp1*, *pmarg-dmrt* and *pmarg-fem1-like*) was performed on regressing male and undetermined samples after 60 days of conditioning in Exp1 and after 28 days in Exp2. Statistical tests carried out on mRNA levels did not show significant effects of environmental factors (Kruskal-Wallis) or 17 β -estradiol injection (Wilcoxon) on gene expression.

Table 8 Number of pearl oysters determined as being on the male or female sexual pathway using the predictive 3-gene-pair expression ratio model of the sexual pathway proposed in Teaniniuraitemoana et al. (submitted).

Treatment	Female pathway	Male pathway	Total
Experiment 1 (Exp1)			
24-10	3	24	27
24-40	0 ^{<}	13	13
28-10	1	12	13
28-40	1	1 ^{<}	2
Subtotal	5	50	55
Experiment 2 (Exp2)			
17 β -Estradiol	2	20	22
Control	2	11	13
Subtotal	4	31	35
Total	9	81	90

[<] a significant lower number between conditions ($p < 0.05$, Fisher exact test).

However, the use of the 3-gene-pair expression ratio model of the sexual pathway of *P. margaritifera*, proposed in Teaniniuraitemoana et al. (submitted), on the present gene expression dataset revealed that nine male pearl oysters exhibited a female sexual molecular pathway (i.e., combining a *pmarg-c43476*/*pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.02225 and a *pmarg-foxl2*/*pmarg-c54338* gene ratio ≥ 12.25 ; or combining a *pmarg-c43476*/*pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.02225 , a *pmarg-foxl2*/*pmarg-c54338* gene ratio < 12.25 and a *pmarg-foxl2*/*pmarg-fem1-like* gene ratio ≥ 0.1003) (Table 8). One of these specimens was found in the treatment 28-10 and another in 28-40 and three were found in the treatment 24-10 in Exp1. In Exp2, we found two individuals among the oysters injected with 17 β -estradiol and two others in the control condition. Regarding their proportions, the Fisher exact test revealed significant differences in Exp1 but not in Exp2. Indeed, the proportion of oysters on the female and male pathways was significantly lower in treatments 24-40 and 28-40, respectively, than the expected proportions ($pvalue < 0.05$; Fisher exact test).

Comparing gene expression between individuals determined molecularly to be on female and male sexual pathways; the Wilcoxon test revealed significant differences for *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* mRNA levels but not for the seven other genes tested (Figure 30). Indeed, the mRNA level of *pmarg-foxl2* appeared significantly higher ($4.6\text{E-}05 \pm 9.7\text{E-}05$; *pvalue* < 0.05) in oysters on the female sexual pathway than in those on the male sexual pathway, whereas *pmarg-fem1-like* appeared significantly lower ($1\text{E-}03 \pm 4.4\text{E-}03$; *pvalue* < 0.01).

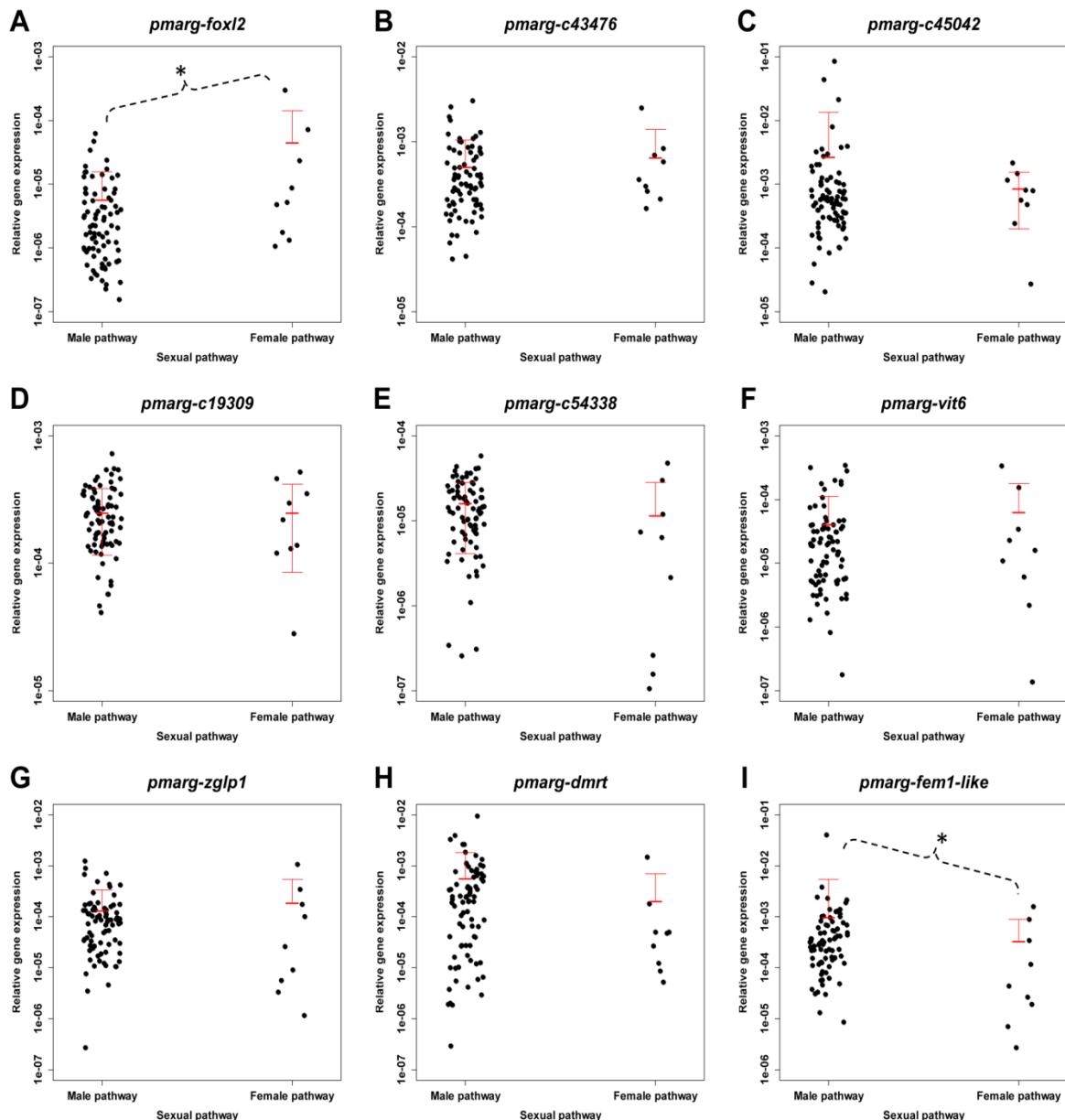


Figure 30 Relative expression profiles (real time PCR) of *pmarg-foxl2* (A), *pmarg-c43476* (B), *pmarg-c45042* (C), *pmarg-c19309* (D), *pmarg-c54338* (E), *vit-6* (F), *zglp1* (G), *pmarg-dmrt* (H), and *pmarg-fem1-like* (I) in pearl oysters on male and female sexual pathways. * indicates statistically significant differences determined by a Wilcoxon test (*p* < 0.05).

4. Discussion

In this study, we report the effect of different combinations of temperature, food quantity and 17 β -estradiol on gender determination and dynamics of gametogenesis in adult *P. margaritifera*. For this purpose, we conducted two separate experiments. In the first experiment, oysters were reared in controlled conditions of light, temperature and food availability. In the second experiment, oysters were injected 3 times at weekly intervals with 17 β -estradiol and reared in a lagoon.

4.1. Effect of food availability and temperature

Effect on gender determination

The main objective of our environmental experiment was to test the hypothesis of environmental sex determinism (ESD) in *P. margaritifera* adults.

Numerous vertebrates exhibit this sex determination mode, mainly consisting in “temperature-dependant sex determination” (TSD) (Pieau et al. 1999). For instance, among reptiles, gonadic differentiation is known to be biased towards female at high temperature in most turtle species (Shoemaker and Crews 2009), but biased towards male in some lizards (Hulin et al. 2009). In marine bivalves, only a few studies have shown the effect of environmental factors on sex ratio as a manner of induction of a male-biased sex ratio (Fabioux et al. 2005; Stenyakina et al. 2010; Santerre et al. 2013). Our results show a significant sex ratio change, determined histologically, for oysters conditioned at high temperature and low trophic level. Indeed in these environmental conditions, 50% of the initial females changed sex after 60 days, probably due to an energetic deficit. However, when looking at the molecular level using the 3-gene-pair expression ratio model, the proportion of regressed males identified as being on the male sexual pathway was significantly lower than expected in the treatment combining higher temperature conditions (28°C) with high trophic level 40 000 cells.mL⁻¹. It is therefore highly likely that we could induce a sex-reversal from male to female using such conditions. Most previous studies that revealed a change in sex ratio in adult bivalves were conducted with a long conditioning time, generally over 1 year, as in the Pacific oyster *C. gigas* (more males at approximately 8°C) (Fabioux et al. 2005) or as in the tropical Cortez oyster *C. corteziensis* (more females at 9°C) (Rodríguez-Jaramillo et al. 2008). Our experiment lasted only two months, which corresponds to two reproductive cycles in *P. margaritifera*, but this duration could be insufficient to observe a significant effect of an environmental factor, especially temperature, on sex ratio.

The energetic deficit, hypothesized above, as source of sex inversion of 50% of the females, could be explained by the temperature fixed at 28°C that would have increased the oxygen consumption and the metabolic rates, increasing the need for energy, as already demonstrated from 24 to 27°C (Chàvez-Villalba et al. 2013). Furthermore, in some molluscs, the production of female gametes is supposed to be more energetically costly than the production of male gametes, estimated at 50% more energy (Russell-Hunter 1979). To achieve sex inversion, pearl oysters should initiate

gametogenesis to renew a reproductive cycle. Bayne (1976) indicated that gametogenesis only begins when energetic reserves are sufficient. Poorly fed pearl oysters probably do not have enough energy from the diet and reserves at 28°C to initiate gametogenesis and therefore change sex. At 28°C and a high trophic level considered as a sufficient input of energy, we found only one female in the course of sexual inversion, suggesting that there are other forcing factors. A recent study on *P. margaritifera*, has shown that at equal ingestion, females assimilate organic matter of ingested food better than males, and thus require a higher oxygen consumption (Chàvez-Villalba et al. 2013). This suggests that when females are subjected to a stress, an increase of their oxygen consumption could exacerbate the energetic deficit. Rearing techniques may be partially responsible and considered as stressful. We could hypothesize that the weekly cleaning generated a detrimental chronic stress for maintaining the female sex or/and the manifestation of new females. Some previous work has shown that the proportion of females has decreased for cultured pearl oysters compared with the natural stocks (Thielley 1993). In addition, Lacoste et al. (2014) observed a negative effect of monthly cleaning on female sex on farmed pearl oysters reared in a lagoon. It therefore appeared important to find non-stressful cleaning methods in order to consider only the effect of the environmental factors and promote females in aquaculture rearing. Energetic cost of sex inversion would be also of great interest for further studies to understand and to model sex determinism in *P. margaritifera*.

Effect on gametogenesis

Food availability is known to be an important factor for bivalve development, affecting broodstock energy reserves, fecundity, quality and quantity of eggs, and larval development (Berntsson et al. 1997; Utting and Millican 1997; Hendriks et al. 2003; Delgado and Pérez-Camacho 2005). In *P. margaritifera*, the present study clearly demonstrates, in experimental conditions, that the trophic level is a key parameter in the control of gametogenesis. Low trophic level seemed detrimental to the production of gametes, resulting in a high proportion of oysters in regression and therefore the cessation of gonial cell production. Conversely, a high concentration of microalgae promoted gonial cell proliferation and maturation of gametes. These results confirm those of a study carried out by Le Moullac et al. (2013) showing that gonadic maturation and gonial proliferation of the pearl oyster is controlled by microalgal concentration. In this previous study, only 11% of individuals showed complete gametogenesis at the end of the first month of conditioning, whereas in our study, under the effect of a higher trophic level ($\times 2.5$), the proportion of oysters with complete gametogenesis reached 60%. The role of temperature in gametogenesis has also been demonstrated in many species of bivalves. Indeed, it was shown that elevated temperatures in a temperate zone (i.e., ~19–20°C) promoted reproductive effort and maturation of germ cells (Martínez and Pérez 2003; Fabioux et al. 2005). More precisely, it has been shown that temperature regulates the speed and thus the duration of gametogenesis (Enríquez-Díaz et al. 2009). From a bioenergetic point of view, conditions were met in the present study to provide the maximum energy to oysters, i.e., a temperature of 28°C (Yukihira et

al. 2000) and a trophic level close to saturation (Le Moullac et al. 2013). Under these conditions, pearl oysters realized complete gametogenesis, going to spawning for some male and female individuals (data not shown). This study therefore offers an avenue for conditioning pearl oysters for reproductive maturation, but further research will be required to test for an effect of food quantity and quality on gamete quality and on the subsequent implications for offspring.

4.2. Effect of 17 β -estradiol

The role of estrogens in the hormonal regulation of bivalve reproduction was suggested to be similar to that which they fulfil in vertebrate endocrine systems. Many studies in vertebrates, especially teleosts, showed that 17 β -estradiol has a significant effect on reproduction, stimulating ovarian development and vitellogenin synthesis (de Vlaming et al. 1980; Chang et al. 1995; Kang et al. 2002). In this context, we made the first test of the potential feminizing effect of 17 β -estradiol by directly injecting it into male gonads of *P. margaritifera*. While no sex reversal from male to female was established during this experiment, a significantly lower proportion of male and a significantly higher proportion of undetermined oysters were found in the 17 β -estradiol-injected group after 28 days (i.e., 14 days after the third injection). Furthermore, regarding gametogenesis, we also found significantly lower proportions of intermediate and mature gonads. These results strongly suggest that 17 β -estradiol has a negative effect on male gonad development in *P. margaritifera*, as in fishes. For example, Chang et al. (1995) observed that E₂ treatment completely suppressed testicular development and spermatiation in 2-year-old black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. However, in *P. margaritifera*, it seemed that this negative effect disappeared 6 weeks after the last injection, giving way to a positive effect on spermatogenesis. Indeed, although at the end of the experiment, a significantly higher proportion of mature gonads was reported in 17 β -estradiol-injected oysters than in the control group, we observed an increase of sperm motility under the microscope for mature oysters of the 17 β -estradiol-injected group compared with the control group at this time (data not shown). These results may seem to be contradictory to previous reports indicating the feminizing effect of estradiol in bivalves (Mori et al. 1969; Varaksina and Varaksin 1991), but these effects are in accordance with other reports that estradiol can stimulate male reproductive activities. Indeed, it has been reported in other marine bivalves that estradiol stimulates spermatogenesis (Varaksina et al. 1992; Wang and Croll 2004), potential sperm release and spawning (Wang and Croll 2003; Wang and Croll 2006). If we supposed that 17 β -estradiol quantity decreased in the gonad over the experiment, we can suggest that a residual quantity of 17 β -estradiol (at the end of the experiment) could have a positive effect on spermatogenesis, whereas a high dose leads to the regression of the male differentiation. Therefore, our results show an effect of 17 β -estradiol in reproduction of *P. margaritifera*, but further studies are needed to elucidate its function and mechanism of action.

4.3. Probable dominance of genetic sex determination in adult *P. margaritifera*.

The application of the model of the sexual pathway of *P. margaritifera* to real-time PCR results revealed that nine regressed male pearl oysters, overall the experiments, were molecularly on the female sexual pathway (i.e., across all conditions whether in the environmental experiment and at the hormonal experiments). These nine animals represent 10% of the total analyzed pearl oysters. This ratio is not different to the female ratio found in population of this average height (Chávez-Villalba et al. 2011), suggesting that whatever an environmental or hormonal treatment was applied here, a previously established genetic control seems to be dominant. In the Pacific oyster *C. gigas*, two genetic models have been proposed for sex determination (Guo et al. 1998; Hedrick and Hedgecock 2010). Whatever the model, the authors assumed that sex in *C. gigas* would be controlled by a single major gene. Herein, we showed that among the nine marker genes only *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* appeared significantly differently expressed between pearl oysters in male and female sexual pathways, indicating that these two genes are involved at the top of the molecular cascades of sex determination in *P. margaritifera*. More recently, Santerre et al. (2013) suggested that *C. gigas* exhibits a mixed sex determination (GSD + TSD), as can be observed for many fishes and amphibians (Valenzuela et al. 2003). In *P. margaritifera*, we did not exclude a mixed sex determination mode, GSD with ESD, but it appeared that adult sex determinism in this species is governed by more complex mechanisms. Indeed, this study covered only the effect of the exogenous factors temperature and food availability and the endogenous factor estradiol in adult pearl oysters. More studies will be required to better understand sex determination in this species, such as spat sex determination as recently studied in *C. gigas* (Santerre et al. 2013), an alternative hermaphrodite mollusc, or with regard to population density as in *Crepidula fornicata*, a sequential hermaphrodite mollusc (Proestou 2005).

Furthermore, this study also confirmed the utility and the capacity of the previously determined model based on the expression of three gene pairs to identify oysters at the onset of the female pathway.

5. Conclusion

In the present study, we found evidence for the environmental and, for the first time, hormonal control of the reproduction of *P. margaritifera*. Although no sex-reversal from male to female was observed, we suggest that environmental factors, and especially temperature combined with a predominant genetic control mechanism, are involved in the gender determination of adult pearl oysters. Furthermore, high temperature and high trophic level appeared the best combination for broodstock conditioning in future breeding programs aimed at the sustainable development of pearl farming in French Polynesia. However, the sex determinism of *P. margaritifera* remains to be explored, with the two candidate genes *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* as the best starting points. Herein we covered

adult sex determinism and it would be of great interest to study sex determinism in spat during first gonadic differentiation, like Santerre et al. (2013) in the Pacific oyster *C. gigas*.

Acknowledgments

This study was conducted as part of the ANR “POLYPERL” project (ANR-11-AGRO-006) and the Contract Project “BiodiPerl”. The authors are indebted to M. Sham Koua, M. Maihota, N. L. Tetaura, C. Soyez, H. Aurentz and A. Cizeron for their helpful assistance. We thank H. McCombie for her help in editing the English language. V. Teaniniuraitemoana is financially supported by Ifremer and holds a grant from la Délégation à la Recherche de Polynésie Française.

Synthèse

Dans ce dernier chapitre, afin de comprendre les mécanismes de la reproduction et les facteurs qui la contrôlent, deux expérimentations ont été réalisées pour tester les hypothèses environnementale et hormonale de la différenciation sexuelle. Les résultats de ces deux expériences ont pu mettre en évidence un contrôle environnemental et pour la première fois un contrôle hormonal de la reproduction chez *P. margaritifera*.

Dans la première expérience, les résultats ont montré que la condition combinant la température de 28°C et la concentration en algues de 40 000 cellules mL⁻¹ était la plus favorable non seulement à la maturation des gonades mâles et femelles mais aussi au maintien du sexe femelle. Un sex-ratio biaisé en faveur des mâles a été obtenu pour les huîtres conditionnées à 28°C et 10 000 cellules mL⁻¹. Ainsi, dans cette condition environnementale 50% des femelles sont retournées à l'état mâle après 60 jours de conditionnement, probablement dû à un déficit énergétique induit par un manque de nourriture (4 fois moins). De plus, la proportion de mâles en régression déterminés en voie sexuel mâle au niveau moléculaire par le modèle prédictif dans la condition 28-40 apparaît significativement plus faible que la proportion attendue. Il semblerait donc que ce soit dans cette condition environnementale qu'il serait possible d'induire un changement de sexe de mâle vers femelle. La courte durée de l'expérience (2 mois) pourrait être la cause de la non-inversion des huîtres. En effet, la plupart des études montrant une influence de l'environnement sur le sex-ratio, impliquaient un conditionnement de longue durée, et notamment de 1 an (Fabioux et al. 2005; Rodríguez-Jaramillo et al. 2008). D'autre part les nettoyages fréquents des bacs d'élevage pourraient avoir un effet négatif sur l'expression du sexe femelle comme le suggèrent Lacoste et al. (2014).

C'est aussi dans ces conditions (28°C et 40 000 cellules mL⁻¹) qu'une maturation maximale a été observée. En effet, à la fin de l'expérience les huîtres perlières ont réalisé une gamétopénie complète allant parfois pour certaines jusqu'à la ponte.

Dans la seconde expérimentation, il a été clairement démontré que la reproduction de *P. margaritifera* pouvait être régulée par les hormones œstrogènes comme cela a été observé chez de nombreux bivalves (Matsumoto et al. 1997; Osada et al. 2004; Gauthier-Clerc et al. 2006; Ketata et al. 2007). Les principaux résultats de ce travail montrent un effet négatif de l'œstradiol sur le développement et la différenciation mâle comme retrouvé chez le poisson *A. schlegeli* (Chang et al. 1995). En effet, les injections d'œstradiol-17 β ont induit une diminution significative de la proportion de mâles et une augmentation significative de la proportion des individus de sexe indéterminé, 2 semaines après la troisième injection. Cependant cet effet négatif laisse place à un effet positif où l'œstradiol, supposant en moindre quantité, favoriserait la spermatogenèse comme retrouvé chez d'autres bivalves (Varaksina et al. 1992; Wang et Croll 2006).

Tous ces résultats suggèrent que la gamétogenèse et le sexe des huîtres perlières adultes peuvent être contrôlés par des facteurs environnementaux et hormonaux.

Cependant aucun effet significatif des facteurs environnementaux et de l'œstradiol n'a été retrouvé sur l'expression relative des neuf gènes biomarqueurs identifiés lors de l'approche transcriptomique (Partie I). Toutefois, le modèle prédictif de la voie sexuelle de *P. margaritifera* basé sur 3 ratios d'expression de gènes, a révélé que 10% des huîtres perlières mâles, déterminés histologiquement en régression, étaient rentrés en début de voie femelle au niveau moléculaire. Cette proportion ne semble pas différente de la proportion de femelles trouvée dans les populations naturelles présentant cette moyenne de taille (Chávez-Villalba et al. 2011). Ceci suggère une programmation génétique du sexe avec une différenciation sexuelle soumise aux conditions environnementales, validant ainsi l'hypothèse d'un mode de déterminisme mixte du sexe chez *P. margaritifera*. Les résultats d'expression génique suggèrent également que les gènes *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like* seraient des acteurs secondaires majeurs impliqués en haut de la cascade moléculaire de la différenciation sexuelle chez *P. margaritifera*.

SYNTHÈSE GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Le contrôle de la reproduction, et notamment le contrôle du sexe, est un enjeu majeur pour l'aquaculture d'espèces à fort intérêt économique que ce soit chez les poissons ou les bivalves afin de répondre à la forte demande mondiale croissante des produits aquacoles. Depuis plusieurs années il est donc devenu essentiel de comprendre le déterminisme sexuel de ces espèces afin d'optimiser leur production au sein d'écloseries émergentes.

Au sein du règne animal, le sexe peut être déterminé par des facteurs génétiques, environnementaux, ou résulter d'une interaction de ces deux facteurs (Valenzuela et al. 2003; Wedekind et Stelkens 2010). Quelque soit le type de déterminisme sexuel, et les processus impliqués, des cascades moléculaires spécifiques d'activation ou d'inactivation de gènes sont mises en jeu permettant la différenciation gonadique dans le sens mâle ou femelle (Piferrer et Guiguen 2008). Bien que ces mécanismes aient été largement étudiés et bien décrits chez les vertébrés et chez certains invertébrés modèles, les connaissances sur le déterminisme sexuel chez les mollusques, dont les bivalves marins, présentant un mode de reproduction de type hermaphrodite, restent encore très partielles voire inexistantes, et ce malgré une augmentation considérable de l'acquisition de données moléculaires ces dix dernières années.

Inscrit dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était donc de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle (et notamment du sexe femelle) chez l'huître perlière *P. margaritifera*. Cette espèce apparaît comme un modèle original et d'intérêt du fait i) de son mode de reproduction atypique : l'hermaphrodisme protandre ; et ii) de l'enjeu économique qu'elle représente en Polynésie française. Pour atteindre cet objectif, une double approche, transcriptomique et expérimentale a été menée. L'approche transcriptomique visait à appréhender et connaître les mécanismes impliqués au niveau moléculaire, et l'approche expérimentale visait à comprendre le phénomène de la sexualisation par des forçages environnementaux et hormonaux en s'intéressant plus particulièrement à l'inversion sexuelle vers le sexe femelle. Ainsi, au terme de ce travail des réponses ont pu être apportées quant aux 2 questions posées en introduction :

- Quels sont les gènes codant pour des protéines impliquées dans la détermination ou la différenciation sexuelle et exprimés de manière différente au niveau des tissus gonadiques de stade et de sexe différents ? (Approche transcriptomique)
- Quels sont les facteurs favorisant l'inversion sexuelle vers le sexe femelle ? (Approche expérimentale)

En effet, les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre cette sexualité particulière intégrant son contrôle que ce soit au niveau moléculaire ou environnemental. Ces différents résultats sont repris et discutés dans les différentes parties de cette synthèse générale afin d'aborder les mécanismes du déterminisme sexuel et de la différenciation sexuelle de l'huître perlière et proposer des perspectives pour de futures études mais également pour la filière perlicole.

1. Identification de gènes acteurs dans la différenciation sexuelle

Le premier objectif de cette thèse était d'identifier des facteurs moléculaires impliqués dans le déterminisme et la différenciation sexuelle de l'huître perlière *P. margaritifera*. Pour atteindre cet objectif, il a été choisi de faire une analyse transcriptomique par une technique qui avait déjà démontré son efficacité pour l'identification de nombreux gènes candidats chez diverses espèces de bivalves (Dheilly et al. 2012; Llera-Herrera et al. 2013; Sousa et al. 2014).

Ainsi, l'un des résultats importants de cette thèse est la publication du séquençage du transcriptome de référence de la gonade de *P. margaritifera* déterminé en utilisant la technologie RNAseq (Teaniniuraitemoana et al. 2014). Sa constitution à partir de plusieurs échantillons gonadiques de sexe mâle et femelle à différents stades de développement, incluant les stades indifférenciés et d'inversions sexuelles, lui confère la robustesse nécessaire pour son utilisation pour l'étude de la reproduction de cette espèce. Parmi les 70 147 contigs qui le constituent, un peu moins de 40% sont non annotés malgré la comparaison aux génomes récemment caractérisés de *C. gigas* et *P. fucata* (Takeuchi et al. 2012; Zhang et al. 2012). Ces contigs ne sont pas à négliger et peuvent représenter des candidats potentiels spécifiques de l'espèce.

1.1. Approche candidat

Grâce à cette nouvelle base de données, plusieurs gènes d'intérêts ont pu alors être identifiés. Ainsi, un catalogue de 87 ARNm codant pour 67 protéines connues pour être impliquées dans le déterminisme sexuel, la différenciation sexuelle ou encore la gamétogenèse, a été répertorié. Des orthologues de gènes secondaires clés des cascades moléculaires chez les vertébrés et invertébrés ont été caractérisés tels que les gènes *Dmrt* (*pmarg-dmrt*, *pmarg-dmrt2*), *Sox9* (*pmarg-sox9*) et *Foxl2* (*pmarg-foxl2*) chez les mammifères (Wagner et al. 1994; Ottolenghi 2005; Kopp 2012) ou encore *Fem1* (*pmarg-fem1-like*) chez le nématode *C. elegans* (Zarkower et Hodgkin 1992, 1993). Les profils d'expression de certains de ces gènes présentent un dimorphisme sexuel en faveur des mâles comme *pmarg-dmrt* et *pmarg-fem1-like*, ou en faveur des femelles tel que *pmarg-foxl2* suggérant ainsi leur implication dans la différenciation sexuelle et potentiellement dans le déterminisme du sexe chez *P. margaritifera*. Ces résultats soutiennent l'idée que les gènes secondaires impliqués en aval des cascades moléculaires de la différenciation sexuelle restent bien conservés dans l'évolution comme montré pour les gènes à domaine DM (Matson et Zarkower 2012).

1.2. Approche différentielle

Couplée à l'approche candidat une analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée afin de déterminer quels sont les gènes qui se retrouvent exprimés de manière différente entre les tissus gonadiques de sexes et de stades différents. Cette analyse de l'expression différentielle associée à une

analyse des profils d'expression a permis de proposer une nouvelle vision de la reproduction de *P. margaritifera*, non plus basée uniquement sur une identification histologique des stades gonadiques mais aussi sur un plan moléculaire. Ainsi, le modèle proposé, redéfini les stades en tenant compte de l'expression des gènes. Cette double approche permet ainsi de s'affranchir des limites de l'identification histologique qui ne peut expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ce nouveau modèle révèle une période critique de l'inversion sexuelle qui se produirait alors lors d'une phase de régression de la gonade mâle. Cette période critique pourrait s'apparenter à celle suggérée par Santerre et al. (2013) chez *C. gigas*. En effet, chez cette espèce hermaphrodite protandre successive irrégulière, la fenêtre de temps de l'inversion se produirait à la fin et au début d'un nouveau cycle de gamétogenèse.

Considérant ainsi les nouveaux stades définis par ce modèle, 9 gènes biomarqueurs de la voie sexuelle ont pu être identifiés révélant un modèle prédictif de la voie sexuelle basé sur 3 rapports d'expressions de gènes impliquant 2 gènes inconnus *pmarg-c43476* et *pmarg-c54338* et 2 gènes connus *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like*. Ce modèle renforce l'idée que *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like* sont impliqués dans la différenciation et potentiellement dans la détermination du sexe chez *P. margaritifera*. En effet, leur rapport d'expression permet de distinguer les individus en début de voie femelle de ceux en début de voie mâle. Ainsi, il est supposé que la sur-expression de *pmarg-fem1-like* inhiberait l'expression de *pmarg-foxl2* induisant ainsi une différenciation mâle comme chez *C. elegans* où les gènes *Fem* inhibent le gène *tra-1* qui lui permet la différenciation femelle (Zarkower et Hodgkin 1992, 1993). La pertinence de ce modèle pourrait cependant être consolidée par sa validation sur des individus en inversion sexuelle que ce soit de mâle vers femelle ou femelle vers mâle. En effet, les inversions étant rares ce modèle n'a pu en tenir compte dans sa construction.

Approche fonctionnelle par RNAi

Cette approche transcriptomique globale a ainsi permis l'identification de nombreux gènes candidats potentiellement impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle chez *P. margaritifera*. Cependant la limite de cette étude réside notamment dans l'approche non fonctionnelle de ces gènes. La fonction de ces gènes pourrait être étudiée par l'utilisation d'ARN interférents dont la méthode est maintenant disponible chez les bivalves (Fabioux et al. 2009). Cette technique permettrait de mettre en évidence l'effet de l'inhibition du gène ciblé au plan cellulaire et au plan moléculaire, sur l'expression des autres gènes impliqués dans la cascade moléculaire. Cette approche fonctionnelle pourrait être réalisée en premier sur les gènes du modèle prédictif et notamment *pmarg-fem1-like* et *pmarg-foxl2* pour confirmer leur rôle chez *P. margaritifera* comme gènes clés de la différenciation sexuelle et potentiellement du déterminisme du sexe chez l'huître perlière.

2. Facteurs contrôlant la différenciation sexuelle chez *P. margaritifera*

Le deuxième objectif de cette thèse était d'identifier les facteurs contrôlant la différenciation sexuelle et notamment l'inversion sexuelle vers le sexe femelle. Pour atteindre cet objectif, il a été choisi de tester les hypothèses environnementale et hormonale de la différenciation sexuelle par deux expérimentations.

2.1. Facteurs environnementaux

Un des résultats clé de ce travail a été la mise en évidence d'un effet de la température et du niveau trophique sur la différenciation sexuelle. En effet, bien qu'aucune inversion sexuelle de mâle à femelle n'ait été relevée, les résultats de sex-ratio et du modèle moléculaire prédictif de la voie sexuelle suggèrent la possibilité d'induire ce changement de sexe dans une condition de forte température et de haut niveau trophique. Au contraire des conditions environnementales produisant un déficit énergétique, telles qu'une sous-alimentation ou une condition stressante, qui favoriseraient le retour des femelles à un état mâle. D'autres expériences sur une plus longue durée et avec une manipulation moins stressante pourraient valider le contrôle environnemental.

Contrôle lors de la première différenciation sexuelle

De nombreuses espèces de reptiles présentent un déterminisme mixte du sexe, où un déterminisme de type TSD se superpose à un déterminisme chromosomique du sexe. Le sexe génotypique initial peut être inversé à des températures d'incubation extrêmes (Deeming 2004; Harlow 2004; Quinn et al. 2007). Dans notre approche expérimentale, l'effet des facteurs environnementaux n'a été qu'appréhendé chez l'adulte au moment où la fenêtre de féminisation s'ouvre. Cependant il serait tout aussi intéressant d'étudier l'influence de ces facteurs lors de la première différenciation sexuelle avec notamment des températures plus extrêmes que celle retrouvées dans le lagon. Chez *C. gigas* il a été montré qu'une faible température (9°C) lors de la première différenciation sexuelle induisait un sex-ratio en faveur des mâles (Santerre et al. 2013).

2.2. Facteurs hormonaux

Dans l'approche expérimentale mise en œuvre, il a été montré pour la première fois chez l'huître perlière *P. margaritifera* un effet de l'oestradiol sur la différenciation sexuelle. En effet, bien qu'aucune inversion sexuelle n'ait été obtenue, il semblerait que l'oestradiol ait un effet négatif sur le développement et la différenciation mâle comme chez le poisson *A. schlegeli* (Chang et al. 1995). Cependant cet effet négatif laisse place à un effet positif où l'oestradiol, supposé en moindre quantité,

favoriserait la spermatogenèse comme chez d'autres bivalves (Varaksina et al. 1992; Wang et Croll 2006). Des études plus approfondies permettraient de mieux comprendre cette influence hormonale. Par exemple la recherche d'une aromatase-like chez l'huître perlière pour la mesurer chez des individus à divers stades du cycle gamétogénique pourrait permettre d'établir le lien entre la différenciation sexuelle femelle et son activité. Ainsi, moduler l'activité aromatase pourrait devenir un outil intéressant pour le contrôle du sexe femelle chez l'huître perlière. En effet, chez la plupart des espèces présentant un déterminisme environnemental du sexe de type TSD, la différenciation du sexe impliquerait l'activation ou l'inhibition de l'aromatase afin de permettre ou pas la production d'œstrogènes féminisantes. Ainsi, lors de la différenciation ovarienne chez les amphibiens (Urbatzka et al. 2007) ou encore chez les poissons (Guiguen et al. 2010) l'expression gonadique de l'aromatase augmente.

2.3. Facteurs génétiques

Le modèle prédictif de la voie sexuelle de *P. margaritifera* a révélé que 10% des huîtres perlières mâles étaient rentrés en début de voie femelle au niveau moléculaire. Cette proportion similaire de celle des femelles trouvée dans les populations naturelles de même taille (Chávez-Villalba et al. 2011) suggère fortement un déterminisme génétique du sexe préétabli et une différenciation sexuelle soumise aux conditions environnementales. Ainsi, l'huître perlière *P. margaritifera* posséderait un mode de détermination mixte du sexe comme chez l'huître creuse *C. gigas* (Santerre et al. 2013).

Modèle génétique

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, espèce hermaphrodite protandre irrégulière, un premier modèle de déterminisme sexuel a été proposé par Guo et al. (1998), basé sur l'existence d'un locus et de 2 génotypes. Ce dernier semble être applicable à l'huître perlière *P. margaritifera* suggérant un allèle mâle dominant (M) et un allèle protandrique récessif (F). Ainsi, les huîtres dont le génotype est MF seraient de vrais mâles (qui ne changent pas de sexe) alors que les huîtres présentant un génotype FF seraient de faux mâles protandriques pouvant devenir femelles sous le contrôle d'autres facteurs génétiques ou environnementaux. Cependant, ce modèle ne pouvant expliquer toute l'hétérogénéité des sex-ratios observés chez les descendants, il a récemment été supplanté par un modèle à 3 génotypes (Hedrick et Hedgecock 2010). Il serait donc très intéressant d'étudier le sex-ratio de familles issues de croisements spécifiques afin de proposer un modèle génétique chez *P. margaritifera*.

À partir de tous les résultats obtenus, un schéma bilan abordant les facteurs impliqués dans la différenciation sexuelle a été réalisé (Figure 31). Ce schéma reprend le nouveau modèle histo-

moléculaire de la reproduction proposé dans cette thèse et incrémenté les facteurs discutés. Il pourra par la suite être complété et amélioré par les résultats de futures études.

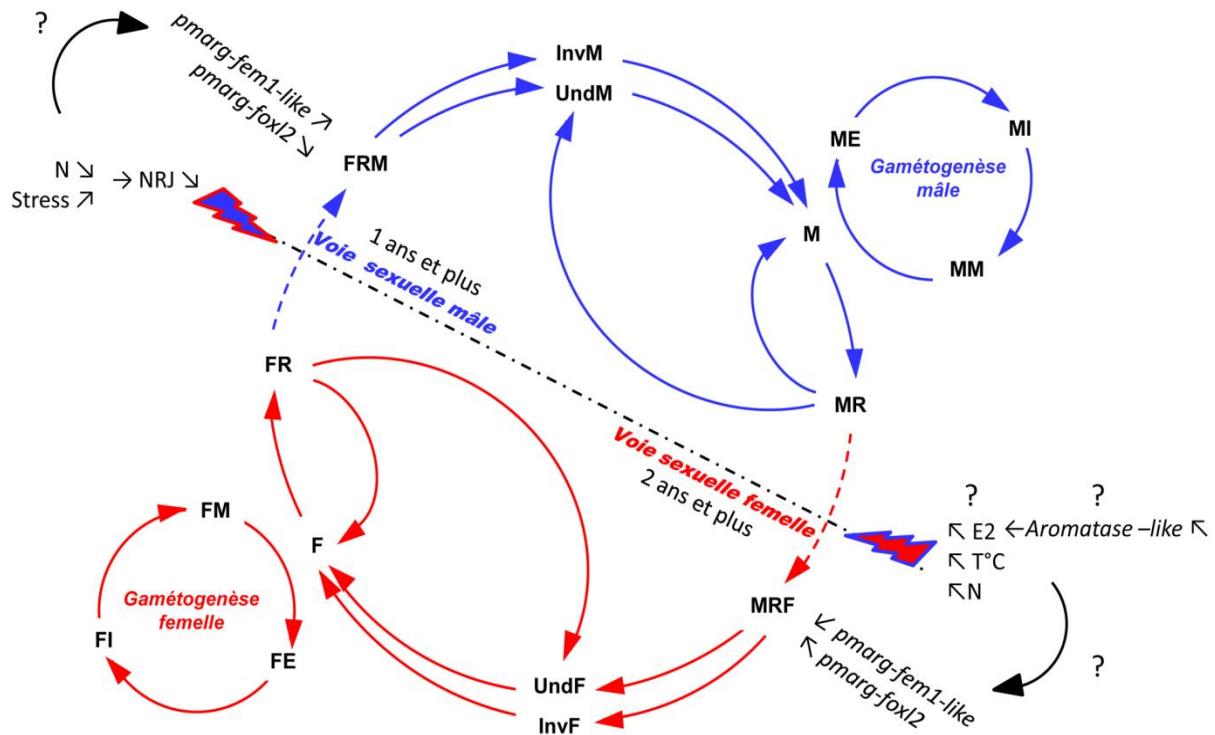


Figure 31 Le déterminisme du sexe de l'huître perlière *P. margaritifera*. E2 : œstrogènes ; T°C : température ; N : ressource trophique ; NRJ : énergie ; ? : inconnu ; ↗ : augmentation ; ↓ : diminution. M ou F : mâle ou femelle en gamétogenèse ; (M/F)E : mâle/femelle en début de gamétogenèse ; (M/F)I : mâle/femelle au stade intermédiaire ; (M/F)M : mâle/femelle au stade mature ; (M/F)R : mâle/femelle au stade de régression ; Und(M/F) : gonade indifférenciée au plan cellulaire, commençant une détermination/différenciation mâle ou femelle au niveau moléculaire ; Inv(M/F) : huître en inversion sexuelle de femelle à mâle ou de mâle à femelle ; MRF : mâle en régression au plan cellulaire initiant une détermination/différenciation femelle au plan moléculaire ; et FRM : femelle en régression au plan cellulaire initiant une détermination/différenciation mâle au plan moléculaire.

3. Application à la perliculture

Au-delà des connaissances apportées par ce travail concernant les mécanismes du déterminisme du sexe et de la différenciation sexuelle de l'huître perlière *P. margaritifera*, certains des résultats obtenus ont également un intérêt appliqué. En effet, ils fournissent des informations utiles quant aux pratiques zootechniques pour une production en conditions contrôlées de naissains sélectionnés dans le cadre de programmes de sélection génétique.

3.1. Maturation et synchronisation des géniteurs

Un des résultats de cette thèse a été l'observation d'une maturation gonadique, au bout d'un mois, voire même la ponte, au bout de 2 mois, des huîtres perlières conditionnées en laboratoire à une température élevée de 28°C et à une forte concentration de microalgues (40 000 cellules mL⁻¹). Ces

résultats pourraient être utilisés pour le conditionnement de géniteurs sélectionnés pour leurs caractères d'intérêts perlicoles afin de synchroniser leur maturation et réaliser des croisements raisonnés. En effet, à l'heure actuelle, les pontes artificielles sont réalisées à partir de géniteurs élevés en lagon dont la maturation est asynchrone résultant ainsi en des pontes aléatoires. Ce conditionnement thermique serait notamment utile quand les conditions environnementales ne seraient pas favorables à la maturation des gamètes en milieu naturel, à savoir de Juillet à Septembre lorsque les températures du lagon sont les plus faibles. Ce conditionnement peut donc s'avérer aussi très utile pour l'archipel des Gambier qui présente des températures plus fraîches et où une écloserie a été récemment mise en place.

Impact du conditionnement sur la qualité des gamètes

Nos résultats ont montré un effet positif du conditionnement sur la maturation des gonades, cependant l'effet sur la qualité des ovocytes n'a pas été appréhendé. La qualité d'un ovocyte est définie par sa capacité à être fécondé puis à permettre le bon développement d'un embryon. Chez plusieurs espèces de poissons et de bivalves, il a été relevé que la température, la quantité ainsi que la qualité de la nourriture avait un impact sur la qualité des ovocytes des géniteurs (Martinez et Mettifogo 2000; Bobe et Labbé 2010; Gómez-Robles et al. 2013). Il serait donc nécessaire de tester l'effet de ces facteurs sur la qualité des gamètes et les conséquences associés au niveau de la descendance. Le transcriptome de référence de la gonade réalisée dans cette thèse, serait un outil prépondérant dans la recherche de gènes marqueurs de la qualité des gamètes. D'ailleurs quelques-uns de ces gènes ont été abordés dans le chapitre 1.

3.2. Gestion du sex-ratio des géniteurs

L'autre aspect du conditionnement qui a été suggéré est son application pour la gestion du sex-ratio des géniteurs. Les résultats du chapitre 3 de cette thèse mettent en évidence une possibilité d'induire l'expression du sexe femelle, qui est une des limites actuelle en écloserie. Cependant ce conditionnement devrait se dérouler sur une plus longue période et dans un environnement moins stressant. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Lacoste et al. (2014) qui montrent un effet négatif sur le sexe femelle du nettoyage régulier des huîtres perlières préconisant ainsi un nettoyage moins fréquent. Pour le conditionnement contrôlé, cela demanderait le moins d'intervention possible ce qui impliquerait la nécessité de trouver des méthodes de nettoyage alternatives et notamment de type biologique avec par exemple l'utilisation d'organismes brouteurs ou dépositoires pour le nettoyage des biodépôts, tels que le gastéropode marin *Trochus niloticus* et la bêche de mer.

Impact du sexe sur la qualité des perles

La problématique de gestion du sex-ratio n'a été posé que pour les géniteurs. Cependant il serait tout aussi intéressant d'étudier l'impact du sexe sur le produit final : la perle. Cet aspect devrait être abordé chez les deux « composantes » de la greffe c'est-à-dire l'huître donneuse et l'huître receveuse. En effet, des récentes études sur l'huître perlière *Pinctada fucata* ont montré que le sexe de la receveuse impactait la qualité de la perle (Iwai et al, données non publiées). Ainsi, les receveuses de sexe femelle produiraient plus de perle de faible valeur commerciale que les receveuses de sexe mâle. Dans le cas où un tel résultat serait confirmé chez *P. margaritifera*, cela impliquerait une pratique d'élevage qui devrait conduire au maintien du sexe mâle pendant toute la période d'élevage pernicole.

4. Conclusion

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter des éléments de connaissance clés sur la reproduction de l'huître perlière *P. margaritifera* et notamment sur son déterminisme sexuel et sa différenciation sexuelle grâce à une combinaison d'une approche transcriptomique et d'une approche expérimentale. Cependant, de nombreuses questions restent à élucider pour une maîtrise totale du sexe chez cette espèce hermaphrodite protandre. Les trois outils majeurs que cette thèse met à disposition pourront être utilisés pour améliorer ces connaissances : (1) le transcriptome de référence de la gonade, (2) le modèle histo-moléculaire de la reproduction et (3) le modèle prédictif de la voie sexuelle de l'huître perlière *P. margaritifera*.

Bibliographie

Bibliographie

- Adell T, Müller WEG (2004) Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene* 334:35–46.
- Alam MA, Bhandari RK, Kobayashi Y, et al (2006) Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture* 255:532–535.
- Alam MA, Nakamura M (2007) Efferent duct differentiation during female-to-male sex change in honeycomb grouper *Epinephelus merra*. *J Fish Biol* 71:1192–1202.
- Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L (2005) Epigenetics and the germline. *Reproduction* 129:137–149.
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization , applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Reseach* 64:5245–5250.
- Anderson T, Forrester J (2001) Administration of oestradiol to barramundi, *Lates calcarifer*, induces protandrous sex change. Perspective in comparative endocrinology, unity and diversity., Monduzzi E. pp 155–164
- Arnaud-Haond S, Goyard E, Vonau V, et al (2007) Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization. *Mar Biotechnol* 9:113–16.
- Avise JC, Mank JE (2009) Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. *Sex Dev* 3:152–163.
- Banni M, Negri A, Mignone F, et al (2011) Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One* 6:e18904.
- Barriónuevo F, Scherer G (2010) SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int J Biochem Cell Biol* 42:433–436.
- Baršienė J, Ribi G, Baršytė D (2000a) Comparative karyological analysis of five species of *Viviparus* (Gastropoda: Prosobranchia). *J Molluscan Stud* 66:259–271.
- Baršienė J, Tapia G, Pujante AM, Martinez-Orti A (2000b) A comparative study of chromosomes in four species of *Theodoxus* (Gastropoda: Neritidae). *Malacol Soc London* 2000 535–541.
- Bauer RT, Holt GJ (1998) Simultaneous hermaphroditism in the marine shrimp *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae): an undescribed sexual system in the decapod Crustacea. *Mar Biol* 132:223–235.
- Bayne B (1976) Aspects of reproduction in bivalve molluscs. *Estuar Process* 1:432–448.
- Bayne BL, Newell RC (1983) Physiological Energetics of Marine Molluscs. The Mollusca, Vol 4. pp 407–515
- Bedard N, Yang Y, Gregory M, et al (2011) Mice lacking the USP2 deubiquitinating enzyme have severe male subfertility associated with defects in fertilization and sperm motility. *Biol Reprod* 85:594–604.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 57:289–300.
- Berec L, Schembri PJ, Boukal DS (2005) Sex determination in *Bonellia viridis* (Echiura: Bonelliidae): Population dynamics and evolution. *Oikos* 108:473–484.

- Berntsson KM, Jonsson PR, Wängberg SA, Carlsson AS (1997) Effects of broodstock diets on fatty acid composition , survival and growth rates in larvae of the European flat oyster , *Ostrea edulis*. Aquaculture 154:139–153.
- Bettegowda A, Smith GW (2007) Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. Front Biosci 12:3713–3726.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, et al (2003) The gene csd is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell 114:419–429.
- Bhandari RK, Alam MA, Higa M, et al (2005) Evidence that estrogen regulates the sex change of Honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. J Exp Zool A Comp Exp Biol 303:497–503.
- Bhandari RK, Higa M, Nakamura S, Nakamura M (2004) Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Mol Reprod Dev 67:303–307.
- Bhandari RK, Komuro H, Nakamura S, et al (2003) Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous Honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Zoolog Sci 20:1399–1404.
- Blay C, Sham-Koua M, Vonau V, et al (2013) Influence of nacre deposition rate on cultured pearl grade and colour in the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* using farmed donor families. Aquac Int 22:937–953.
- Bobe J, Labbé C (2010) Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol 165:535–548.
- Bradley KM, Breyer JP, Melville DB, et al (2011) An SNP-based linkage map for Zebrafish reveals sex determination loci. Genes Genomes Genet 1:3–9.
- Breton S, Beaupré HD, Stewart DT, et al (2007) The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? Trends Genet 23:465–474.
- Bridges C (1921) Triploid intersexes in *Drosophila*. 54:252–254.
- Buestel D, Pouvreau S (2000) La matière particulaire des eaux du lagon de Takapoto : nourriture potentielle pour les élevages d'huîtres perlières. Oceanol Acta 23:193–210.
- Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Cardwell J, Liley NR (1991) Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). Horm Behav 25:1–18.
- Chang CF, Lau EL, Lin BY (1995) Estradiol-17 β suppresses testicular development and stimulates sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Fish Physiol Biochem 14:481–488.
- Chang C-F, Lee M-F, Chen G-R (1994) Estradiol-17 β associated with the sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. J Exp Zool 268:53–58.
- Chang CY, Witschi E (1956) Genetic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. Proc Soc Exp Biol Med 93:140–144.
- Charnier M (1966) Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. C R Seances Soc Biol Fil 160:620–622.
- Charpy L, Charpy-Roubaud CJ (1990) Trophic Structure and Productivity of the lagoonal communities of Tikehau atoll (Tuamotu Archipelago , French Polynesia). Hydrobiologia 207:43–52.
- Chávez-Villalba J, Cochard J-C, Le Pennec M, et al (2003) Effect of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. J Shellfish Res 22:721–731.

- Chàvez-Villalba J, Soyez C, Aurentz H, Le Moullac G (2013) Physiological responses of female and male black-lip pearl oysters (*Pinctada margaritifera*) to different temperatures and concentrations of food. *Aquat Living Resour* 26:263–271.
- Chávez-Villalba J, Soyez C, Huvet A, et al (2011) Determination of gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J Shellfish Res* 30:231–240.
- Cho S, Huang ZY, Zhang J (2007) Sex-specific splicing of the honeybee doublesex gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics* 177:1733–1741.
- Chue J, Smith CA (2011) Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J* 278:1027–1034.
- Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, et al (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 39:916–921.
- Coe WR (1943) Sexual differentiation in mollusks. *Q Rev Biol* 18:154–164.
- Coeroli M (2010) Commercialisation perlière, nacirière et produits dérivés. *Huître perlière et Perles de Tahiti*. pp 159–179.
- Cogswell AT, Kenchington ELR, Zouros E (2006) Segregation of sperm mitochondria in three and four cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Génome* 799–807.
- Collin R (2013) Phylogenetic patterns and phenotypic plasticity of molluscan sexual systems. *Integr Comp Biol* 53:723–735.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, et al (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159–166.
- Cuif J-P, Dauphin Y, Denis A, et al (1991) Analyse ultrastructurale et biochimique des cristaux de nacre in *Pinctada margaritifera*. Le manteau et ses altérations. *Rapp Action Cordet* 88/210 214.
- Cunha RL, Blanc F, Bonhomme F, Arnaud-Haond S (2011) Evolutionary patterns in pearl oysters of the genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae). *Mar Biotechnol* 13:181–192.
- De Vlaming VL, Wiley HS, Delahunty G, Wallace RA (1980) Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, properties and relationship to yolk proteins. *Comp Biochem Physiol Part B* 67:613–623.
- De'ath G (2002) Multivariate regression trees: a new technique for modeling species-environment relationships. *Ecology* 83:1105–1117.
- Deeming DC (2004) Prevalence of TSD in crocodilians. In: Valenzuela N, Lance NA (eds) Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books, Washington, pp 33–41.
- Delgado M, Pérez-Camacho A (2005) Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci Mar* 69:87–97.
- Derbali A, Jarboui O, Ghorbel M, Dhib K (2009) Reproductive biology of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Mollusca: Pteriidae), in northern Kerkennah Island (Gulf of Gabes). *Cah Biol Mar* 50:215–222.
- Dheilly NM, Lelong C, Huvet A, et al (2012) Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One* 7:e36353.
- Doniach T, Hodgkin J (1984) A sex-determining gene, fem-1, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 106:223–235.
- Doroudi MS, Southgate PC (2003) Embryonic and larval development of *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Res* 23:101–107.

- Doucet-Beaupré H, Breton S, Chapman EG, et al (2010) Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evol Biol* 10:50.
- Dupuy C, Vaquer A, Lam-höai T, et al (2000) Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 205:171–184.
- Dutertre M, Beninger PG, Barillé L, et al (2009) Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquat Living Resour* 22:319–329.
- Eernisse DJ (1988) Reproductive patterns in six species of Lepidochitonida (Mollusca: Polyplacophora) from the pacific coast of North America. *Biol Bull* 174:287–302.
- Eggers S, Sinclair A (2012) Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosom Res* 20:215–238.
- El mouden EH, Znari M, Francillon-Vieillot H (2001) Variations histologiques de l'ovaire au cours du cycle reproductif annuel chez Agama impalearis Boettger, 1874 (Reptilia: Agamidae). *Belgium J Zool* 131:17–30.
- Elinson RP (1983) Inheritance and expression of a sex-linked enzyme in the frog, *Rana clamitans*. *Biochem Genet* 21:435–442.
- Enríquez-Díaz M, Pouvreau S, Chávez-Villalba J, Le Pennec M (2009) Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac Int* 17:491–506.
- Erdman SE, Burtis KC (1993) The *Drosophila doublesex* proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J* 12:527–535.
- Evans JD, Shearman DCA, Oldroyd BP (2004) Molecular basis of sex determination in haplodiploids. *Trends Ecol Evol* 19:1–3.
- Ewert MA, Lang JW, Nelson CE (2005) Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *J Zool* 265:81–95.
- Ewert MA, Nelson CE (1991) Sex determination in Turtles: diverse patterns and some possible adaptive value. *Copeia* 1991:50–69.
- Ezaz T, Valenzuela N, Grützner F, et al (2006) An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosom Res* 14:139–150.
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, et al (2009) In vivo RNA interference in oyster - vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276:2566–2573.
- Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, et al (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250:458–470.
- Feng Z, Shao M, Sun D, Zhang Z (2010) Cloning, characterization and expression analysis of Cf-dmrt4-like gene in *Chlamys farreri*. *J Fish Sci China* 17:930–940.
- Fleury E, Moal J, Boulo V, et al (2010) Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Mar Biotechnol (NY)* 12:326–339.
- Fougerouse A, Herbaut C (1994) Atlas anatomique de l'huître perlière: *Pinctada margaritifera*.
- Fournier J, Dupuy C, Bouvy M, et al (2012a) Pearl oysters *Pinctada margaritifera* grazing on natural plankton in Ahe atoll lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Mar Pollut Bull* 65:490–499.

- Fournier J, Levesque E, Pouvreau S, et al (2012b) Influence of plankton concentration on gametogenesis and spawning of the black lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* in Ahe atoll lagoon (Tuamotu Archipelago, French polynesia). *Mar Pollut Bull* 65:463–470.
- Gamble T, Zarkower D (2012) Sex determination. *Curr Biol* 22:R257–262.
- Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, et al (2009) Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev Biol* 9:36.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC (2006) Estradiol-17 β and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 145:133–139.
- Gavery MR, Roberts SB (2013) Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc.
- Georges A (1988) Sex determination is independent of incubation temperature in another chelid turtle, *Chelodina longicollis*. *Copeia* 1988:248–254.
- Gervis MH, Sims NA (1992) The Biology and Culture of Pearl Oysters (Bivalvia : Pteriidae). *ICLARM Stud Rev* 21:1–49.
- Ghiselin MT (1969) The evolution of hermaphroditism among animals. *Q Rev Biol* 44:189–208.
- Ghiselli F, Milani L, Chang PL, et al (2012) De Novo assembly of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination. *Mol Biol Evol* 29:771–786.
- Godwin J, Luckenbach JA, Borski RJ (2003) Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evol Dev* 5:40–49.
- Godwin JR, Thomas P (1993) Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *Gen Comp Endocrinol* 91:144–157.
- Gómez-Robles E, Mazón-Suástequi JM, Acosta-Salmón H, et al (2013) Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture* 412-413:45–51.
- Grossen C, Neuenschwander S, Perrin N (2010) Temperature-dependent turnovers in sex-determination mechanisms: a quantitative model. *Evolution* 65:64–78.
- Gueguen Y, Montagnani C, Joubert C, et al (2013) Characterization of molecular processes involved in the pearl formation in *Pinctada margaritifera* for the sustainable development of pearl farming industry in French Polynesia. In: Watabe S, Maeyama K, Nagasawa H (eds) Recent Advances in Pearl Research. TERRAPUB, Tokyo, pp 183–193.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang C-F (2010) Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:352–366.
- Guiguen Y, Jalabert B, Thouard E, Fostier A (1993) Changes in plasma and gonadal steroid hormones in relation to the reproductive cycle and the sex inversion process in the protandrous Seabass, *Lates calcarifer*. *Gen Comp Endocrinol* 92:327–338.
- Guler Y, Short S, Kile P, Ford AT (2012) Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. *Mar Biol* 159:2885–2890.
- Guo X, Allen SK (1994) Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* say). *Genetics* 1199–1206.
- Guo X, Hedgecock D, Hershberger WK, et al (1998) Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution (N Y)* 52:394–402.
- Haag ES, Doty A V (2005) Sex determination across evolution: connecting the dots. *PLoS Biol* 3:e21.

- Harlow PS (2004) Temperature-dependent sex determination in lizards. In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 42–52.
- Harlow PS, Taylor JE (2000) Reproductive ecology of the jacky dragon (*Amphibolurus muricatus*): an agamid lizard with temperature-dependent sex determination. *Austral Ecol* 25:640–652.
- Haszprunar G, Schaefer K (1996) Anatomy and phylogenetic significance of *Micropilina arntzi* (Mollusca, Monoplacophora, *Micropilinidae* Fam. Nov.). *Acta Zool* 77:315–334.
- Hattori RS, Gould RJ, Fujioka T, et al (2007) Temperature-dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes*: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and DMRT1 expression profile. *Sex Dev* 1:138–46.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, et al (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2955–2959.
- Hawkins J, Roberts C (2004) Effect of fishing on sex-changing Caribbean parrotfishes. *Biol Conserv* 115:213–256.
- Hediger M, Henggeler C, Meier N, et al (2010) Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics* 184:155–170.
- Hedrick PW, Hedgecock D (2010) Sex determination: genetic models for oysters. *J Hered* 101:602–611.
- Heller J (1993) Hermaphroditism in molluscs. *Biol J Linn Soc* 48:19–42.
- Hempel LU, Oliver B (2007) Sex-specific DoublesexM expression in subsets of *Drosophila* somatic gonad cells. *BMC Dev Biol* 7:113.
- Hendriks IE, van Duren LA, Herman PM. (2003) Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *J Exp Mar Bio Ecol* 296:199–213.
- Herpin A, Schartl M (2011) Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J* 278:1010–1019.
- Higa M, Ogasawara K, Sakaguchi A, et al (2003) Role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. *Fish Physiol Biochem* 28:149–150.
- Hillis DM, Green DM (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *J Evol Biol* 3:49–64.
- Hobbs J-P a, Munday PL, Jones GP (2004) Social induction of maturation and sex determination in a coral reef fish. *Proc R Soc London* 271:2109–2114.
- Hodgkin J (1986) Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of TRA-3 suppressors and characterization of FEM genes. *Genetics* 114:15–52.
- Hoving HJT, Roeleveld MAC, Lipinski MR, Videler JJ (2006) Nidamental glands in males of the oceanic squid *Ancistrocheirus lesueurii* (Cephalopoda: Ancistrocheiridae) - sex change or intersexuality? *J Zool* 269:341–348.
- Howe EA, Sinha R, Schlauch D, Quackenbush J (2011) RNA-Seq analysis in MeV. *Bioinformatics* 27:3209–3210.
- Huang Q (1997) Morphological, allozymic, and karyotypic distinctions between *Neritina* (Dostia) *violacea* and *N. (D.) cornucopia* (Gastropoda: Neritoidea). *J Zool* 241:343–369.
- Huang X-D, Zhao M, Liu W-G, et al (2013) Gigabase-scale transcriptome analysis on four species of pearl oysters. *Mar Biotechnol* 15:253–264.
- Hulin V, Delmas V, Girondot M, et al (2009) Temperature-dependent sex determination and global change: are some species at greater risk? *Oecologia* 160:493–506.

- Hwang J-J (2007) Reproductive cycles of the pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould) and *Pinctada margaritifera* (Linnaeus) (Bivalvia: Pteriidae) in southwestern Taiwan waters. *J Mar Sci Technol* 15:67–75.
- Inamdar LS, Vani V, Seshagiri PB (2012) A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 317:32–46.
- Jarne P, Auld JR (2006) Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution* 60:1816–1824.
- Joubert C, Piquemal D, Marie B, et al (2010) Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics* 11:613.
- Kably Ambe A, Ruiz Anguas J, Carballo Mondragón E, et al (2004) Correlation between follicle levels of superoxide dismutase and oocyte quality, fertilization rates and embryo development. *Ginecol Obstet Mex* 72:335–344.
- Kallman KD (1984) A new look at sex determination in poeciliid fishes.
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, et al (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet* 8:e1002798.
- Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T (2005) From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J Biochem* 138:13–9.
- Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, et al (2002) Effect of 17beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47:71–80.
- Kato Y, Kobayashi K, Watanabe H, Iguchi T (2011) Environmental sex determination in the brachiopod crustacean *Daphnia magna*: Deep conservation of a doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genet* 7:e1001345.
- Kawai A, Nishida-Umebara C, Ishijima J, et al (2007) Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenet Genome Res* 117:92–102.
- Kenchington E, Macdonald B, Cao L, et al (2002) Genetics of mother-dependent sex ratio in Blue mussels (*Mytilus* spp.) and implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 158:1579–1588.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, et al (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813–2822.
- Ketata I, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2007) Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: a one year study in the gulf of Gabès area. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147:424–431.
- Kikuchi K, Hamaguchi S (2013) Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Dev Dyn* 242:339–53.
- Kimani E, Mavuti K, Mukama T (2006) The reproductive activity of the pearl oyster *Pinctada imbricata* Röding 1798 (Pteriidae) in Gazi Bay, Kenya. *Trop Zool* 19:159–174.
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, et al (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509:633–636.
- Klinbunga S, Amparyup P, Khamnamtong B, et al (2008) Isolation and characterization of testis-specific DMRT1 in the tropical abalone (*Haliotis asinina*). *Biochem Genet* 47:66–79.
- Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM, et al (2011) Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS One* 6:e17751.
- Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M (2013) Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex Dev* 7:115–125.

- Kokokiris L, Fostier A, Athanassopoulou F, et al (2006) Gonadal changes and blood sex steroids levels during natural sex inversion in the protogynous Mediterranean red gorgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Gen Comp Endocrinol* 149:42–48.
- Koopman P (2001) Sry, Sox9 and mammalian sex determination. In: Scherer G, Schmid M (eds) *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhäuser Basel, Basel, pp 25–56.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117–121.
- Kopp A (2012) Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet* 28:175–184.
- Krakow D, Sebald E, King LM, Cohn DH (2001) Identification of human FEM1A, the ortholog of a *C. elegans* sex-differentiation gene. *Gene* 279:213–219.
- Kroon FJ, Munday PL, Westcott DA, et al (2005) Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proc R Soc London* 272:1399–1405.
- Kueng P, Nikolova Z, Djonov V, et al (1997) A novel family of serine/threonine kinases participating in spermiogenesis. *J Cell Biol* 139:1851–1859.
- Ky C-L, Blay C, Sham-Koua M, et al (2013) Family effect on cultured pearl quality in black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* and insights for genetic improvement. *Aquat Living Resour* 26:133–145.
- Ky C-L, Blay C, Sham-Koua M, et al (2014) Indirect improvement of pearl grade and shape in farmed *Pinctada margaritifera* by donor “oyster” selection for green pearls. *Aquaculture* 432:154–162.
- Lacoste E, Le Moullac G, Levy P, et al (2014) Biofouling development and its effect on growth and reproduction of the farmed pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture* 434:18–26.
- Lamprell K, Scheltema A (2001) Mollusca: Aplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda, Cephalopoda. In: Wells A, Houston W (eds) *Zoological Catalogue of Australia Volume 17*. CSIRO Publishing, Melbourne.
- Larkin M a, Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Le Moullac G, Soyez C, Sham-Koua M, et al (2013) Feeding the pearl oyster *Pinctada margaritifera* during reproductive conditioning. *Aquac Res* 44:404–411.
- Le Moullac G, Tiapari J, Teissier H, et al (2012) Growth and gonad development of the tropical black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.), in the Gambier archipelago (French Polynesia). *Aquac Int* 20:305–315.
- Le Pennec M, Anastas M, Bichet H, et al (2010) Huître perlière et perle de Tahiti. HQ Imaging, Faaa, French Polynesia
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3:662–673.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
- Li Q, Osada M, Suzuki T, Mori K (1998) Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol- 17β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr Reprod Dev* 33:87–93.
- Li Q, Zhao X, Kong L, Yu H (2013) Transcriptomic response to stress in marine bivalves. *Invertebr Surviv J* 10:84–93.
- Liew WC, Bartfai R, Lim Z, et al (2012) Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS One* 7:e34397.

- Linard C (2010) Ecophysiologie et dynamique de la croissance coquillière de l’huître perlière, *Pinctada margaritifera*: analyses moléculaires et microstructurales.
- Liu M, Sadovy Y (2004) The influence of social factors on adult sex change and juvenile sexual differentiation in a diandric, protogynous epinepheline, *Cephalopholis boenak* (Pisces, Serranidae). *J Zool* 264:239–248.
- Liu X-L, Zhang Z-F, Shao M-Y, et al (2012) Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates. *Dev Genes Evol* 222:279–286.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–8.
- Llera-Herrera R, García-Gasca A, Abreu-Goodger C, et al (2013) Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. *PLoS One* 8:e73176.
- Loret P, Le Gall S, Dupuy C, et al (2000) Heterotrophic protists as a trophic link between picocyanobacteria and the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Aquat Microb Ecol* 22:215–226.
- Ma S, Sun Z, Chen K (2009) Review of bivalve genomics and proteomics. *J Tianjin Agric Coll* 41–45,50.
- Ma X-J, Wang Z, Ryan PD, et al (2004) A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5:607–616.
- MacDonald BA, Thompson RJ (1986) Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. III. Physiological ecology, the gametogenic cycle and scope for growth. *Mar Biol* 93:37–48.
- Magie CR, Pang K, Martindale MQ (2005) Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol* 215:618–630.
- Maine E, Salz H, Cline T, Schedl P (1985) The sex-lethal gene of *drosophila*: DNA alterations associated with sex-specific lethal mutations. *Cell* 43:521–529.
- Marie B, Joubert C, Tayalé A, et al (2012) Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20986–20991.
- Marshall Graves J a, Peichel CL (2010) Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol* 11:205.
- Martínez G, Mettifogo L (2000) Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183:149–159.
- Martínez G, Pérez H (2003) Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 228:153–167.
- Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, et al (2011) DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476:101–104.
- Matson CK, Zarkower D (2012) Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet* 13:163–174.
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, et al (2006) Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18190–18195.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563.

- Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, et al (2003) Oryzias curvinotus has DMY , a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoolog Sci* 20:159–161.
- Matsumoto T, Masaoka T, Fujiwara A, et al (2013) Reproduction-related genes in the pearl oyster genome. *Zoolog Sci* 30:826–850.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Kayano T (2003) Molecular characterization of a cDNA encoding putative Vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoolog Sci* 20:37–42.
- Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K (1997) Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 118:811–817.
- Meng X, Liu M, Jiang K, et al (2013) De novo characterization of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* transcriptome and analysis of its gene expression following cadmium exposure. *PLoS One* 8:e64485.
- Merchant-Larios H, Díaz-Hernández V (2012) Environmental sex determination mechanisms in reptiles. *Sex Dev* 7:95–103.
- Merchant-Larios H, Díaz-Hernández V, Marmolejo-Valencia A (2010) Gonadal morphogenesis and gene expression in reptiles with temperature-dependent sex determination. *Sex Dev* 4:50–61.
- Miller LM, Plenefisch JD, Casson LP, Meyer BJ (1988) *xol-1*: A gene that controls the male modes of both sex determination and X chromosome dosage compensation in *C. elegans*. *Cell* 55:167–183.
- Mitchell NJ, Nelson NJ, Cree A, et al (2006) Support for a rare pattern of temperature-dependent sex determination in archaic reptiles: evidence from two species of tuatara (*Sphenodon*). *Front Zool* 3:9.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J (1998) Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update* 4:223–236.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, et al (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14:62–68.
- Mori K, Muramatsu T, Nakamura Y (1969) Effect of steroid on oyster III: sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by estradiol-17b. *Bull Japanese Soc Sci Fish* 35:1072–1076.
- Moss SM (1989) Effects of Exogenous androgens on growth, biochemical composition, and reproduction of the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Pacific Sci* 43:200.
- Moyer J, Nakazono A (1978) Protandrous hermaphroditism in six species of the anemonefish genus *Amphiprion* in Japan. *Japanese J Ichthyol* 25:101–106.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z, et al (2007) Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* 21:682–693.
- Myosho T, Otake H, Masuyama H, et al (2012) Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191:163–170.
- Naimi A, Martinez A-S, Specq M-L, et al (2009a) Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152:189–196.
- Naimi A, Martinez A-S, Specq M-L, et al (2009b) Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 154:134–142.
- Nakamura HK (1986) Chromosomes of Archaeogastropoda (Mollusca : Prosobranchia), with some remarks on their cytobranchology and phylogeny. *Publ Seto Mar Biol Lab* 31:191–267.
- Nakamura M, Kobayashi Y, Miura S, et al (2005) Sex change in coral reef fish. *Fish Physiol Biochem* 31:117–122.

- Nanda I, Kondo M, Hornung U, et al (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11778–11783.
- Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, et al (2011) DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genet* 7:e1002447.
- Naylor C, Adams J, Greenwood PJ (1988) Variation in sex determination in natural populations of a shrimp. *J Evol Biol* 1:355–368.
- Oliver B, Pauli D, Mahowald AP (1990) Genetic evidence that the ovo locus is involved in *Drosophila* germ line sex determination. *Genetics* 125:535–550.
- Osada M, Takamura T, Sato H, Mori K (2003) Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by estradiol-17 beta and the central nervous system. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 299:172–9.
- Osada M, Tawarayama H, Mori K (2004) Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139:123–128.
- Ottolenghi C (2005) Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 14:2053–2062.
- Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, et al (2007) Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 16:2795–2804.
- Pannetier M, Pailhoux E (2010) FOXL2, le gardien de l'identité ovarienne. *Médecine/sciences* 470–473.
- Passamonti M, Ghiselli F (2009) Doubly uniparental: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA Cell Biol* 79–89.
- Pen I, Uller T, Feldmeyer B, et al (2010) Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature* 468:436–438.
- Penman DJ, Piferrer F (2008) Fish gonadogenesis. Part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev Fish Sci* 16:16–34.
- Petersen CW (1990) Variation in reproductive success and gonadal allocation in the simultaneous hermaphrodite, *Serranus fasciatus*. *Oecologia* 83:62–67.
- Pieau C, Dorizzi M (1981) Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *J Morphol* 170:373–382.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol life Sci* 55:887–900.
- Piferrer F, Blasquez M, Navarro L, Gonzalez A (2005) Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Gen Comp Endocrinol* 102–110.
- Piferrer F, Guiguen Y (2008) Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev Fish Sci* 16:35–55.
- Piferrer F, Ribas L, Diaz N (2012) Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation.
- Policansky D (1982) Sex change in plants and animals. *Annu Rev Ecol Syst* 13:471–495.
- Pouvreau S, Bodoy A, Buestel D (2000a) In situ suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margarifera*: combined effects of body size and weather-related seston composition. *Aquaculture* 181:91–113.

- Pouvreau S, Gangnery A, Tiapari J, et al (2000b) Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat Living Resour* 13:37–48.
- Pouvreau S, Jonquières G, Buestel D (1999) Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture* 176:295–314.
- Pouvreau S, Prasil V (2001) Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: synthesis of several sampling designs conducted between 1994. *Aquat Living Resour* 14:155–163.
- Pradeep PJ, Srijaya TC, Papini A, Chatterji AK (2012) Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)]. *Aquaculture* 6:181–187.
- Proestou DA (2005) Sex change in *Crepidula fornicata*: influence of environmental factors on reproductive success and the timing of sex change.
- Proestou DA, Goldsmith MR, Twombly S (2008) Patterns of male reproductive success in *Crepidula fornicata* provide new insight for sex allocation and optimal sex change. *Biol Bull* 214:194–202.
- Quinn AE, Georges A, Sarre SD, et al (2007) Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* (80-) 316:411.
- R Development Core Team R (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. 1:409.
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, et al (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14:2587–2595.
- Redon E, Bosseboeuf A, Rocancourt C, et al (2010) Stage-specific gene expression during spermatogenesis in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Reproduction* 140:57–71.
- Riviere G, Wu G-C, Fellous A, et al (2013) DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. *Mar Biotechnol* 15:739–753.
- Roberts SB, Gavery MR (2012) Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates? *Front Physiol* 2:116.
- Rodríguez-Jaramillo C, Hurtado M a, Romero-Vivas E, et al (2008) Gonadal development and histochemistry of the Tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J Shellfish Res* 27:1129–1141.
- Romero A, Novoa B, Figueras A (2012) Genomics , immune studies and diseases in bivalve aquaculture. *Invertebr Surviv J* 9:110–121.
- Rosa RD, de Lorgeril J, Tailliez P, et al (2012) A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics* 13:252.
- Ruiz C, Abad M, Sedano F, et al (1992) Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J Exp Mar Bio Ecol* 155:249–262.
- Russell-Hunter WD (1979) The evolution of filter-feeding bivalves. A life of invertebrates. MacMillan Publishing Company, New-York, p 656.
- Saavedra C, Bachère E (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture* 256:1–14.
- Saavedra C, Reyero M-I, Zouros E (1997) Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 1073–1082.

- Santerre C, Sourdaine P, Adeline B, Martinez A-S (2014) Cg-SoxE and Cg- β -catenin, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 167:68–76.
- Santerre C, Sourdaine P, Marc N, et al (2013) Oyster sex determination is influenced by temperature - first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165:61–69.
- Santerre C, Sourdaine P, Martinez A-S (2012) Expression of a natural antisense transcript of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: first demonstration in the gonads of a lophotrochozoa species. *Sex Dev* 6:210–21.
- Saout C, Quéré C, Donval A, et al (1999) An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172:301–314.
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26:639–45.
- Sastray AN (1979) Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese AC, Pearse JS (eds) *Reproduction of marine molluscs*. Academic Press, New York, pp 113–292
- Sato T, Endo T, Yamahira K, et al (2005) Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoolog Sci* 22:985–988.
- Saucedo P, Monteforte M (1997) Breeding cycle of pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia: Pteriidae) at Bahia de la Paz, Baja California Sur, Mexico. *J Shellfish Res* 16:103–110.
- Saucedo P, Racotta I, Villareal H, Monteforte M (2002) Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J Shellfish Res* 21:127–135.
- Sawada H, Sakai N, Abe Y, et al (2002) Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1223–1228.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, et al (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131:933–942.
- Schoenmakers HJN, Van Bohemen CG, Dieleman SJ (1981) Effects of Oestradiol-17 beta on the ovaries of the starfish *Asterias rubens*. *Dev Growth Differ* 23:125–135.
- Scott AP (2012) Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids* 77:1450–1468.
- Scott AP (2013) Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids* 78:268–281.
- Shetty S, Kirby P, Zarkower D, Graves JAM (2002) DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element. *Cytogenet Genome Reserach* 99:245–251.
- Shi Y, He M (2014) Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Gene* 538:313–322.
- Shimeld SM, Boyle MJ, Brunet T, et al (2010) Clustered Fox genes in lophotrochozoans and the evolution of the bilaterian Fox gene cluster. *Dev Biol* 340:234–248.
- Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, Crews D (2007) Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 236:1055–1063.

- Shoemaker CM, Crews D (2009) Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin Cell Dev Biol* 20:293–303.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, et al (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461:267–271.
- Sousa JT, Milan M, Bargelloni L, et al (2014) A microarray-based analysis of gametogenesis in two Portuguese populations of the European clam *Ruditapes decussatus*. *PLoS One* 9:e92202.
- Spotila LD, Spotila JR, Hall SE (1998) Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool* 281:417–427.
- Stenyakina A, Walters LJ, Hoffman EA, Calestani C (2010) Sex expression and environmental-stress in a mollusk, *Pinctada margaritifera*. *Mol Reprod Dev* 77:222–230.
- Stiglec R, Ezaz T, Graves J a M (2007) A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 117:103–109.
- Strauss TJ, Castrillon DH, Hammes SR (2011) GATA-like protein-1 (GLP-1) is required for normal germ cell development during embryonic oogenesis. *Reproduction* 141:173–181.
- Suárez-Ulloa V, Fernández-Tajes J, Manfrin C, et al (2013) Bivalve omics: state of the art and potential applications for the biomonitoring of harmful marine compounds. *Mar Drugs* 11:4370–4389.
- Suquet M, de Kermoysan G, Araya RG, et al (2009) Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 22:29–34. doi: 10.1051/alr/2009006
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-santos J, et al (2001) A putative , ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci* 114:1665–1675.
- Takeuchi T, Kawashima T, Koyanagi R, et al (2012) Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: a platform for understanding bivalve biology. *DNA Res* 19:117–130.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.
- Tayalé A, Gueguen Y, Treguier C, et al (2012) Evidence of donor effect on cultured pearl quality from a duplicated grafting experiment on *Pinctada margaritifera* using wild donors. *Aquat Living Resour* 25:269–280.
- Teaniniuraitemoana V, Huvet A, Levy P, et al (2014) Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: identification of potential sex differentiation and sex determining genes. *BMC Genomics* 15:491.
- Therneau TM, Atkinson B, Ripley B, et al (2013) mpart: Multivariate partitioning. R package version 1.6-1.
- Thielley M (1993) Etude cytologique de la gaméto-génèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l’huître perlière *Pinctada margaritifera* (L) var. *cumingii* (Jameson), (mollusque, bivalves). Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould). Université française du pacifique.
- Thiriot-Quiévreux C (2003) Advances in chromosomal studies of gastropod molluscs. *J Molluscan Stud* 69:187–202.
- Thomas Y (2009) Ecologie larvaire de l’huître perlière (*Pinctada margaritifera* L.), croissance et dispersion dans un atoll polynésien.
- Thomas Y, Garen P, Pouvreau S (2011) Application of a bioenergetic growth model to larvae of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* L.. *J Sea Res* 66:331–339.

- Tranter D (1958a) Reproduction in australian pearl oysters (Lamellibranchia). IV. *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). Mar Freshw Res 9:509–525.
- Tranter D (1958b) Reproduction in australian pearl oysters (Lamellibranchia). III. *Pinctada albina* (Lamarck): Breeding season and sexuality. Mar Freshw Res 9:191 – 216.
- Tu Q, Brown CT, Davidson EH, Oliveri P (2006) Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. Dev Biol 300:49–62.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, et al (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. Cell 139:1130–1142.
- Uhlenhaut NH, Treier M (2006) Foxl2 function in ovarian development. Mol Genet Metab 88:225–234.
- Urbatzka R, Bottero S, Mandich A, et al (2007) Endocrine disrupters with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. Comp Biochem Physiol Part C 144:310–318.
- Utting SD, Millican PF (1997) Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. Aquaculture 155:45–54.
- Vahirua-Lechat I, Laure F, LeCoz JR, et al (2008) Changes in fatty acid and sterol composition during oogenesis in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Aquac Res 39:1739–1746.
- Valenzuela N (2010) Multivariate expression analysis of the gene network underlying sexual development in turtle embryos with temperature-dependant and genotypic sex determination. Sex Dev 4:39–49.
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ, et al (2003) Pattern Does Not Equal Process : Exactly When Is Sex Environmentally Determined ? Am Nat 161:676–683.
- Valenzuela N, Neuwald JL, Literman R (2013) Transcriptional evolution underlying vertebrate sexual development. Dev Dyn 242:307–319. doi: 10.1002/dvdy.23897
- Varaksina GS, Varaksin AA (1991) Effects of estradiol, progesterone, and testosterone on oogenesis of yezo scallop. Biol Morya 3:61–68.
- Varaksina GS, Varaksin AA, Maslennikova LA (1992) The role of gonadal steroid hormones in the spermatogenesis of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. Biol Morya 3:77–83.
- Veith A-M, Froschauer A, Körting C, et al (2003) Cloning of the dmrt1 gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. Gene 317:59–66.
- Ventura-Holman T, Lu D, Si X, et al (2003) The Fem1c genes: conserved members of the Fem1 gene family in vertebrates. Gene 314:133–139.
- Ventura-Holman T, Maher JF (2000) Sequence, organization, and expression of the human FEM1B gene. Biochem Biophys Res Commun 267:317–320.
- Ventura-Holman T, Seldin MF, Li W, Maher JF (1998) The murine fem1 gene family: homologs of the *Caenorhabditis elegans* sex-determination protein FEM-1. Genomics 54:221–230.
- Verhulst EC, Beukeboom LW, van de Zande L (2010) Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. Science (80-) 328:620–623. doi: 10.1126/science.1185805
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, et al (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell 79:1111–1120.
- Wallace H, Badawy GMI, Wallace BMN (1999) Amphibian sex determination and sex reversal. Cell Mol Life Sci 55:901–909.
- Wallace RA (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Browder LW (ed) Developmental Biology Volume 1 Oogenesis. Springer US, Boston, MA, pp 127–177

- Wallis MC, Waters PD, Graves JAM (2008) Sex determination in mammals--before and after the evolution of SRY. *Cell Mol life Sci* 65:3182–3195.
- Wane G (2013) Les problèmes réels de l'industrie de la perle de Tahiti. *Tahiti Pacifique, Mens d'information d'économie* 260:15–24.
- Wang C, Croll RP (2004) Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 238:483–498.
- Wang C, Croll RP (2003) Effects of sex steroids on in vitro gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Invertebr Reprod Dev* 44:89–100.
- Wang C, Croll RP (2006) Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 256:423–432.
- Wang S, Hou R, Bao Z, et al (2013) Transcriptome sequencing of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and comparative transcriptomic analysis with Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *PLoS One* 8:e63927.
- Wedekind C, Stelkens RB (2010) Tackling the diversity of sex determination. *Biol Lett* 6:7–9.
- Wright WG (1988) Sex change in the Mollusca. *Trends Ecol Evol* 3:137–140.
- Wu G-C, Chang C-F (2013) The switch of secondary sex determination in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiol Biochem* 39:33–38.
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, et al (2012) An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* 22:1423–1428.
- Yano A, Nicol B, Jouanno E, et al (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol Appl* 6:486–496. doi: 10.1111/eva.12032
- Yi W, Zarkower D (1999) Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development* 126:873–881.
- Yoshimoto S, Ito M (2011) A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS J* 278:1020–1026.
- Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, et al (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2469–2474.
- Young JE, Georges A, Doody JS, et al (2004) Pivotal range and thermosensitive period of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Testudines: Carettochelydidae), from northern Australia. *Can J Zool* 82:1251–1257.
- Yu F-F, Wang M-F, Zhou L, et al (2009) Cloning and expression characterization of Dmrt5 in *Pinctada martensii*. *Acta Hydrobiol Sin* 33:844–850.
- Yu F-F, Wang M-F, Zhou L, et al (2011) Molecular cloning and expression characterization of Dmrt2 in Akoya pearl oysters, *Pinctada martensii*. *J Shellfish Res* 30:247–254.
- Yukihira H, Lucas JS, Klumpp DW (2000) Comparative effects of temperature on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. *Mar Ecol Prog Ser* 195:179–188.
- Yusa Y (2007) Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca - an overview. *Am Malacol Bull* 23:89–98.
- Zanetti S, Grinschgl S, Meola M, et al (2012) The sperm-oocyte switch in the *C. elegans* hermaphrodite is controlled through steady-state levels of the fem-3 mRNA. *RNA* 18:1385–1394.

- Zanini JM, Salvat B (2000) Assessment of deep water stocks of pearl oysters at Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs* 19:83–87.
- Zarkower D, Hodgkin J (1992) Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* 70:237–249.
- Zarkower D, Hodgkin J (1993) Zinc fingers in sex determination: only one of the two *C. elegans* *Tra-1* proteins binds DNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 21:3691–3698.
- Zhang E-F, Qiu G-F (2010) A novel *Dmrt* gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Dev Genes Evol* 220:151–159.
- Zhang G, Fang X, Guo X, et al (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54.
- Zhang N, Xu F, Guo X (2014) Genomic analysis of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc. *G3* 1–36.

Reproduction of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Study of the female sex determinants in adult oyster

For several years it has become essential to understand sex determination of species with high economic interest to maximize their production in emerging hatcheries.

The main objective of this thesis was to identify the mechanisms involved in sex determination and sex differentiation, and particularly in female sex, in the pearl oyster *P. margaritifera*, a protandrous hermaphrodite species and the key species of the pearl farming, the second economic resource for French Polynesia. To achieve this goal, two approaches were undertaken: a transcriptomic approach to investigate the molecular mechanisms of sex determinism and sex differentiation, and an experimental approach to understand the phenomenon of sexualization by environmental and hormonal forcing focusing especially on female sex determinism and female sex differentiation.

In the transcriptomic approach, the gonad transcriptome of *P. margaritifera* was sequenced from several samples of male and female oyster gonads at different stages of development. After Illumina sequencing and assembly of the transcriptome, 70,147 contigs were obtained. Functional analysis of these 70,147 contigs identified genes of interest and allowed the constitution of a catalog of 87 mRNAs encoding 67 proteins involved in sex determination, sex differentiation and/or gametogenesis. Then a strict analysis of RNAseq quantification data revealed 1,937 contigs differentially expressed between the histological categories of gonad. From the analysis of their expression profiles in each sample, a new model of reproduction of *P. margaritifera*, based on dual analytical approach, i.e. histo-molecular, has been proposed. This model shows that sex determination of adult *P. margaritifera* pearl oysters occur during a regression phase of the gonad. And considering the new stages defined on this model, 9 biomarkers genes of the female sexual pathway have been identified revealing a 3-gene-pair expression ratio based model, which makes it possible to predict the sexual pathway in this hermaphrodite species. This predictive model involves two unknown genes *pmarg-c43476* and *pmarg-c54338* and 2 known genes *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like*, and strongly suggests the involvement of *pmarg-foxl2* and *pmarg-fem1-like* in sex determinism in *P. margaritifera*.

In the experimental approach, two separated experiments were conducted to demonstrate the effect of i) various combinations of temperature and trophic level, and ii) 17 β -estradiol administered by direct injection into the gonad; on sex, gametogenesis and expression of the nine biomarkers genes of the female sexual pathway previously identified. The results showed that the condition combining a temperature of 28 °C and a concentration of 40 000 cells of algae mL⁻¹ was the most favorable not only for the maturation of the male and female gonads but also for the maintenance of the female sex. It would be in this environmental condition that it would be possible to induce a sex change from male to female. In the second experiment, it was clearly demonstrated that the reproduction of *P. margaritifera* could be regulated by estrogen hormones. The results show a negative effect of estradiol on male development and differentiation. Finally the results of the predictive model of the sexual pathway of *P. margaritifera*, suggest a genetic programming of the female sex, which however remain subject to environmental conditions, thus validating the hypothesis of a mixed sex determinism mode in *P. margaritifera*.

Key words

Pinctada margaritifera, sex determinism, transcriptome, differential expression, marine bivalve, sexual pathway, gametogenesis, sex ratio, temperature, food availability, 17 β -estradiol.

Reproduction de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* : Étude des déterminants du sexe femelle chez l'adulte

Depuis plusieurs années il est devenu essentiel de comprendre le déterminisme sexuel des espèces à fort intérêt économique afin d'optimiser leur production au sein d'éclosseries émergentes.

L'objectif principal de cette thèse était de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelle, et notamment de l'inversion vers le sexe femelle, chez l'huître perlière *P. margaritifera*, espèce hermaphrodite protandre et espèce clé de la perliculture, la seconde ressource économique pour la Polynésie française. Pour atteindre cet objectif, deux approches ont été menées : une approche transcriptomique visant à étudier les mécanismes moléculaires du déterminisme et de la différenciation sexuelle, et une approche expérimentale visant à comprendre le phénomène de la sexualisation par des forçages environnementaux et hormonaux en s'intéressant plus particulièrement au déterminisme et à la différenciation sexuelle femelle.

Dans l'approche transcriptomique, le transcriptome de la gonade de *P. margaritifera* a été séquencé à partir de plusieurs échantillons gonadiques d'huîtres de sexe mâle et femelle à différents stades de développement. Après le séquençage Illumina et l'assemblage du transcriptome, 70 147 contigs ont été obtenus. L'analyse fonctionnelle de ces 70 147 contigs, a permis d'identifier des gènes d'intérêt et ainsi de constituer un catalogue de 87 ARNm codant pour 67 protéines impliquées dans la détermination, la différenciation sexuelle et/ou la gaméto-génèse. Ensuite une analyse stricte des données de quantification RNAseq a révélé 1 937 contigs exprimés de manière différentielle entre les catégories histologiques des gonades. À partir de l'analyse de leurs profils d'expression au sein de chaque échantillon, un nouveau modèle de la reproduction de *P. margaritifera*, basé sur une double approche analytique, eg. histo-moléculaire, a été proposé. Ce modèle révèle notamment que le déterminisme sexuel de *P. margaritifera* chez l'adulte se produirait durant une phase de régression de la gonade. Considérant ainsi les nouveaux stades définis par ce modèle, 9 gènes biomarqueurs de la voie sexuelle femelle ont pu être identifiés révélant un modèle prédictif de la voie sexuelle basé sur 3 rapports d'expressions de gènes impliquant 2 gènes inconnus *pmarg-c43476* et *pmarg-c54338* et 2 gènes connus *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like*. Ce deuxième modèle suggère fortement l'implication de *pmarg-foxl2* et *pmarg-fem1-like* dans le déterminisme du sexe de *P. margaritifera*.

Dans l'approche expérimentale, deux expérimentations séparées ont été réalisées pour mettre en évidence l'effet i) de plusieurs combinaisons de température et de niveau trophique, et ii) de l'oestradiol-17 β administré par injection directe dans la gonade ; sur le sexe, la gaméto-génèse et l'expression des neuf gènes biomarqueurs de la voie sexuelle femelle identifiés précédemment. Les résultats ont montré que la condition combinant la température de 28°C et la concentration en algues de 40 000 cellules mL⁻¹ était la plus favorable non seulement à la maturation des gonades mâles et femelles mais aussi au maintien du sexe femelle. Ce serait dans cette condition environnementale qu'il serait possible d'induire un changement de sexe de mâle vers femelle. Dans la seconde expérimentation, il a été clairement démontré que la reproduction de *P. margaritifera* pouvait être régulée par les hormones œstrogènes. Les résultats montrent un effet négatif de l'oestradiol sur le développement et la différenciation mâle. Enfin les résultats du modèle prédictif de la voie sexuelle de *P. margaritifera*, suggèrent une programmation génétique du sexe femelle qui toutefois resterait soumise aux conditions environnementales validant ainsi l'hypothèse d'un mode de détermination mixte du sexe chez *P. margaritifera*.

Mots clés

Pinctada margaritifera, déterminisme du sexe, transcriptome, expression différentielle, bivalve marin, voie sexuelle, gaméto-génèse, sex-ratio, température, disponibilité en nourriture, oestradiol-17 β .