



HAL
open science

**Étude génétique et génomique de la réponse à un
changement de salinité chez la truite arc-en-ciel
Oncorhynchus mykiss**

Yvan Le Bras

► **To cite this version:**

Yvan Le Bras. Étude génétique et génomique de la réponse à un changement de salinité chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Ecologie, Environnement. Université Rennes 1, 2010. Français. NNT : 2010REN1S198 . tel-00620203

HAL Id: tel-00620203

<https://theses.hal.science/tel-00620203>

Submitted on 7 Sep 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : BIOLOGIE

Ecole doctorale Vie-Agronomie-Santé

présentée par

Yvan Le Bras

préparée à l'unité de recherche UR1037 INRA, SCRIBE
Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie, Biodiversité et
Environnement
U.F.R Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Etude génétique et
génomique de la
réponse à un
changement de
salinité chez la truite
arc-en-ciel
*Oncorhynchus
mykiss***

**Thèse soutenue à Rennes
le 17 décembre 2010**

devant le jury composé de :

Pr Marie-Dominique GALIBERT-ANNE

Professeure à l'Université de Rennes 1
UMR 6061 CNRS IGDR, Rennes / *examinatrice*

Dr Gwenola TOSSER-KLOPP

Chargée de Recherche INRA
UMR 444 INRA LGC, Castenet-Tolosan / *rapportrice*

Pr Jean LAROCHE

Professeur à l'Université de Brest
UMR 6539 CNRS-UBO-IRD LEMAR, Brest / *rapporteur*

Dr Viviane BOULO

Cadre IFREMER
UMR CNRS-IFREMER Ecolag, Montpellier / *examinatrice*

Dr Patrick PRUNET

Directeur de Recherche INRA
INRA UR1037 SCRIBE, Rennes / *directeur de thèse*

Dr Pascale LE ROY

Directrice de Recherche INRA
INRA UMR0598 GARen, Rennes / *co-directrice de thèse*



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : BIOLOGIE

Ecole doctorale Vie-Agronomie-Santé

présentée par

Yvan Le Bras

préparée à l'unité de recherche UR1037 INRA, SCRIBE
Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie, Biodiversité et
Environnement
U.F.R Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Etude génétique et
génomique de la
réponse à un
changement de
salinité chez la truite
arc-en-ciel
*Oncorhynchus
mykiss***

**Thèse soutenue à Rennes
le 17 décembre 2010**

devant le jury composé de :

Pr Marie-Dominique GALIBERT-ANNE

Professeure à l'Université de Rennes 1
UMR 6061 CNRS IGDR, Rennes / *examinatrice*

Dr Gwenola TOSSER-KLOPP

Chargée de Recherche INRA
UMR 444 INRA LGC, Castenet-Tolosan / *rapportrice*

Pr Jean LAROCHE

Professeur à l'Université de Brest
UMR 6539 CNRS-UBO-IRD LEMAR, Brest / *rapporteur*

Dr Viviane BOULO

Cadre IFREMER
UMR CNRS-IFREMER Ecolag, Montpellier / *examinatrice*

Dr Patrick PRUNET

Directeur de Recherche INRA
INRA UR1037 SCRIBE, Rennes / *directeur de thèse*

Dr Pascale LE ROY

Directrice de Recherche INRA
INRA UMR0598 GARen, Rennes / *co-directrice de thèse*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury Marie-Dominique Galibert-Anne, Vivane Boulo, Gwenola Tosser-Klopp et Jean Laroche pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. J'exprime toute ma reconnaissance à Gwenola Tosser-Klopp et Jean Laroche pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce travail.

Un grand merci à Pascale Le Roy et Patrick Prunet pour m'avoir proposé ce sujet ambitieux et avoir encadré ma thèse en me laissant évoluer avec autonomie.

Recherche

Merci tout d'abord à l'école doctorale Vie, Agro, Santé, pour m'avoir accordé un financement MENRT en 2007 et avoir permis le bon déroulement de ce projet de thèse. Je tiens à féliciter l'engagement d'Yvan Lagadeuc et d'Annick Guyomard auprès des doctorants.

Merci également à la région Bretagne et à l'Europe pour avoir financé respectivement les programmes Aquagénome et Aquafirst dans lesquels s'intègre cette thèse.

Je remercie tous les scribiens pour leur accueil et les échanges que nous avons pu avoir. Merci particulièrement pour leurs conseils lors de mes débuts à Jean-Jacques, Julien et Yann. Merci à toute l'équipe adaptation, Isabelle, Violette, Violaine, Stéphanie, Claudiane et Sandrine pour leur accueil. Merci Aurélie et Jérôme pour votre participation aux expériences et ces bons moments passés en votre compagnie. Merci également Greg pour ces discussions enrichissantes et sympathiques et tous ces moments de rire. Merci à Martin, Guillaume, Thomas, Eloi pour ces grands moments vécus à Nantes.

MERCI à mon autre labo d'accueil, GARen. Merci Guillaume, Olivier, Fifi, Nico, Colette, Cécile, Fred H., Fred Le Bolos, Sandrine, Christian. Merci Marion, Yuna et Xiao pour tous ces rires dans notre bureau et en dehors. Merci à tous de m'avoir si bien accueilli dans votre coin de verdure, réputé à travers tout Rennes pour servir les meilleures andouillettes de l'ouest. Ces moments passés en votre compagnie ont toujours été très enrichissants et sympathiques.

Je tiens à remercier l'unité GABI et l'équipe de génétique des poissons, particulièrement Edwige et Nicolas qui ont collaboré étroitement avec nous sur ce projet de thèse et toujours de manière fort agréable.

Pour leur bonne humeur, merci à Jean-Michel et Hélène pour ces moments sympathiques passés en votre compagnie à Wageningen ainsi qu'à Leipzig.

Un grand MERCI aux « repro girls », Aude, Maëlla, Lucie, Vanessa et Barbara ainsi qu'à shrimp girl. Sans vous, ces années n'auraient pas été les mêmes. Merci pour votre soutien, et tous ces petits moments de bonheur passés en votre compagnie. Merci également pour toutes ces petites recettes et autres repas partagés.

Je tiens tout particulièrement à remercier Xavier, Sandrine, Guenièvre pour leur accueil et leur aide lors de mon arrivé à SCRIBE. Merci pour votre soutien et tous ces moments passés en votre compagnie à SCRIBE comme en dehors.

Enseignement

Je tiens à remercier Mme Jouan de l'Institut d'Etudes Européennes de Saint-Malo pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour m'avoir laissé ma chance pour débiter dans l'enseignement dans de bonnes conditions. Je garderai pour toujours un agréable souvenir de ces lundis passés au sein des remparts de la vieille ville.

J'adresse également mes remerciements à Joël Boissoles de m'avoir permis d'enseigner dans le cadre si sécurisant du monitorat pendant ces deux dernières années. Merci à Didier Pierre de son investissement dans le projet. Je n'oublie pas bien sûr les moments passés avec les autres moniteurs, particulièrement Désiré et Philippe, avec qui j'ai vécu des épisodes assez épiques.

Je remercie vivement les élèves et étudiants que j'ai martyrisés ces trois années. Le retour qu'ils m'ont procuré m'a bien souvent aidé à garder le cap. Je remercie particulièrement François pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

La famille, les amis

Un grand merci à tous mes amis, de m'avoir permis de décrocher de temps en temps de ce projet prenant qu'est la thèse.

Je tiens à remercier ma famille qui m'a beaucoup soutenu tout au long de cette période.

Merci également à tous ces enfants et éclats de rire qui ont ponctué ces années de thèse. Je pense particulièrement à Gabin, Lucien, Gaël et Maëlla.

Je ne remercierai enfin jamais assez Bichoune pour m'avoir soutenu pendant ces 3 années compliquées.

A Prattou, Claire,

« Hier est un souvenir, demain est un mystère, aujourd'hui est un cadeau, c'est pour cela qu'on l'appelle le présent »

Kung Fu Panda

Abréviations

11 β HSD : 11 β Hydroxysteroid

Dehydrogenase

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AE1 : échangeur Cl⁻ / HCO₃⁻ isoform 1

AGENAE : Analyse du GENome des Animaux d'Elevage Domestiques et d'Intérêt Economique

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

AMEN : Annotation, Mapping, Expression and Network

AMPc : Adenosine 3', 5'- monophosphate cyclique

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ARL : ADP_riboseylation factor_like protein

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATMk : Ataxia Telangiectasia Mutated kinase

ATP : Adénosine TriPhosphate

BP : Biological Process

CAR : Constitutive Androstane Receptor

CaSR : Calcium-sensing Receptor

cDNA / ADNc : ADN complémentaire

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CRB-GADIE : Le Centre national de Ressources pour la Génomique des Animaux

cM : centiMorgan

cRNA / ARNc : ARN complémentaire

CYP1A : Cytochrome P450 1A

dATP : deoxyAdenosine TriPhosphate

dGTP : deoxyGuanosine TriPhosphate

dNTP : deoxyNucleotide TriPhosphate

dTTP : deoxyThymidine TriPhosphate

DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase

DOC : 11-Deoxycorticosterone

eF1 α : elongation Factor 1 alpha

ENaC : canal sodique

eQTL : expression QTL

EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

EST : Expressed Sequence Tag

FDR : False Discovery Rate

FW : FreshwaterGH : Growth hormon

GADD45 : Growth Arrest and DNA Damage

GO : Gene Ontology

GR : Glucocorticoid Receptor

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis

HR : High Responsive

HSP : Heat Shock Protein

IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1

JNK : c-Jun N-terminal kinase

Kir : canal K⁺

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LA : Linkage Analysis

LCMS : Likelihood Causal Model System

LR : Low Responsive

LRT : Likelihood Ratio Test

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK : MAPK Kinase
MAPKKK : MAPKK Kinase
MR : Mineralocorticoid Receptor
MSH : Melanocyte Stimulating Hormone
NHE : échangeur Na^+/H^+
NKA : pompes Na^+K^+ ATPase
NKCC : cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$
OCS : Octachlorostyrene
ORD : Outer-Ring Deiodinase
ORE-BP : Tonicity Response Element-Binding
Ostf1 : Osmotic stress transcription factor 1
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP3 : Phosphatidyl Inositol 3, 4, 5 triPhosphate
PKA : Protéine kinase A
Prl : Prolactine
PSU : Practical Salinity Unit
PT : Post Transfert
QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL : Quantitative Trait Locus
RTK : Récepteurs à la Tyrosine Kinase
RT-PCRq : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction quantitative
SAM : Significance Analysis of Microarray
SAPK1 : Stress-activated protein kinase 1
SAPK2 : Stress-activated protein kinase 2
SDS : Sulfate Dodécylque de Sodium
SIGENAE : Système d'Informations pour l'analyse du GENome des Animaux d'Elevage
SULT : Sulfotransferase
SW : Seawater
T3 : Triiodothyronine
T4 : Tetraiodothyronine
TCTP : Translationally Controlled Tumour Protein
TONEBP : Tonicity Response Element-Binding
TMeV : Tigr Multiexperiment viewer
TRP : Transient Receptor Potential channels
TRPV4 : Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I. CONTEXTE, INTERET ET BUT DE L'ETUDE	6
1. Réponse des téléostéens aux variations osmotique du milieu environnant	6
1.1. Les organismes et leur environnement	6
1.2. L'osmorégulation chez les Téléostéens	9
1. Principe de base de l'osmorégulation	9
2. Structure et fonctionnement de la branchie	11
Les cellules de l'épithélium branchial (partie superficielle)	11
Acclimatation fonctionnelle et morphologique à un changement de salinité	13
Description des transports ioniques en ED et en EM: rôle primordial de la branchie	13
3. Osmorégulation et dépense d'énergie	17
1.3. Osmorégulation et expression de gènes	18
1. Les osmo-effecteurs	19
2. Perception des variations osmotiques environnementales : les osmosenseurs	22
3. La transduction du signal	24
a) Les voies de signalisation cellulaires	24
b) Les facteurs de transcription	28
c) Les hormones et leurs récepteurs	29
1.4. Génétique de l'osmorégulation	32
2. La truite arc-en-ciel, un salmonidé d'aquaculture	33
3. Les objectifs	34
CHAPITRE II. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DIFFERENTIELLE	36
1. Article transcriptomie différentielle	37
2. Discussion	83
CHAPITRE III. IDENTIFICATION DE QTL EN LIEN AVEC L'ACCLIMATATION A L'EAU DE MER	85
1. La détection de QTL	86
1.1. Principe	87
1.2. Cartographie d'intervalle	88
1.3. Approche multiQTL	90
1.4. Analyses multicaractères	90
1.5. Seuils et intervalles de confiance	91
1.6. Densité des cartes génétiques et nombre de recombinants, des facteurs limitants	92
2. QTL et aquaculture	94
3. Article QTL	94
4. Discussion	136

CHAPITRE IV. IDENTIFICATION D'EQTL EN LIEN AVEC L'ACCLIMATATION A L'EAU DE MER	139
1. Cartographie fine de QTL: utilisation des données d'expression de gènes	139
1.1. Concept et origine	140
1.2. Classification des régions eQTL	141
1.3. Prétraitement des données d'expression	141
1.4. Facteurs influençant l'expression des gènes	142
1.5. Principales stratégies d'utilisation des résultats d'analyse eQTL	144
2. Matériel et méthodes	146
2.1. Animaux	146
2.2. Lames de verres Agilent 15k dédiées branchie: Du design à l'utilisation	147
1. Design	147
2. Extraction des acides nucléiques et marquage	148
3. Hybridation, lavage et scan	149
4. Contrôle qualité et normalisation des données	149
2.3. Correction des données d'expression	150
2.4. Analyses des résultats	151
3. Résultats	153
3.1. Description des résultats	153
3.2. Caractérisation des eQTL	155
1. Sélection de gènes sans a priori biologique	155
a) Recouvrement avec les candidats différentiels	155
b) Colocalisation QTL / eQTL	156
c) Régions eQTL à forte significativité	160
2. Sélection de gènes avec a priori fonctionnel	160
3. Etude de QTL particuliers : Les QTL du chlore2 sur RT10 et RT19	161
a) Analyse conjointe caractère-expression	161
b) Etude des corrélations entre caractère et expression de gènes	162
4. Enrichissement de fonctions biologiques	164
4. Discussion	167
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 177
1. Synthèse des résultats	179
2. Perspectives	181
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 184

Introduction générale

Introduction générale

Le chercheur mène des expériences afin de répondre à des questions d'ordre sociétal. Ces expériences ne fournissent qu'un ensemble d'images plus ou moins figées, limitées dans le temps et l'espace. S'intéresser à la génétique d'une espèce, c'est essayer de comprendre, à l'échelle de l'individu, comment l'information inerte héritée d'ancêtres peut influencer les processus biologiques liés à la vie d'un organisme au sein de son environnement.

La recherche de liens entre composantes génétiques d'une espèce, d'une population ou d'un individu et, caractéristiques biotiques, représente un enjeu scientifique des sciences biologiques contemporaines. Que ce soit pour mieux comprendre et combattre les maladies humaines ou pour améliorer les productions végétales et animales, la découverte de gènes influant est aujourd'hui courante. Le séquençage complet du génome et son annotation ne font pas tout. Le boom spectaculaire que vit actuellement la biologie avec l'essor de la génomique rend le séquençage de génome, ainsi que l'étude de son expression, abordable chez de nombreuses espèces d'intérêt commercial limité et jusqu'ici peu considérées. Un projet français impliquant l'INRA annonce le séquençage imminent de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Pour autant, la connaissance du code nucléotidique de la mystérieuse molécule d'ADN de nos chers modèles ne nous renseignera pas directement sur la fonction des gènes qui la constitue. Pour cela, des approches phylogénétiques *in silico* pourront donner des informations sur la présence d'orthologues et le degré de synténie avec d'autres espèces mieux connues permettant l'inférence de fonctions. Mais pour pouvoir vérifier *in vivo* l'implication de gènes dans certains processus biologiques, il est nécessaire de se tourner vers les méthodes liées à la cartographie génétique, la transcriptomie, la protéomique, ou la métabolomique. La première approche relie des zones du génome à l'expression des caractères. Elle est notamment utilisée depuis quelques décennies pour localiser des gènes influant sur des caractères quantitatifs (QTL pour Quantitative Trait Locus). Les 3 suivantes permettent une investigation, à 3 niveaux différents, du résultat de l'expression des gènes, c'est-à-dire de la génomique fonctionnelle. Utiliser conjointement ces deux types d'approche permet de décrire des fonctions biologiques, du gène au processus biologique, en passant par le caractère. L'objectif de ma thèse est de décrire les processus d'acclimatation à l'eau salée de la truite arc-en-ciel par une étude couplant approches de génomique fonctionnelle et génétique.

Les poissons téléostéens peuvent être sténohalin ou euryhalin selon qu'ils évoluent exclusivement dans le milieu dulcicole ou marin, ou qu'ils soient capables de passer d'un environnement osmotique à un autre. De nombreuses espèces sont utilisées en aquaculture dans le monde et la salinité du milieu représente souvent un paramètre responsable de la variabilité de croissance et de coût de production. D'où l'intérêt d'étudier les processus liés à l'adaptation des téléostéens aux capacités osmotiques de leur environnement. C'est notamment le cas chez les téléostéens les plus élevés en Europe : les Salmonidés. Sur les 1 182 000 tonnes de production répertoriée en 2007 (FAO) en Europe, 82% proviennent d'élevages marins. La même année, près de 280 000 tonnes de truite arc-en-ciel ont été produites en mer dans le monde (FAO). Ce poisson téléostéen représente un modèle biologique d'étude en physiologie de l'osmorégulation, mais jamais la recherche de gènes impliqués dans les capacités d'adaptation à l'eau de mer n'a été envisagée à haut débit au niveau fonctionnel et positionnel. C'est ce que propose cette étude. Elle se base sur deux expériences de transfert de truite d'eau douce en eau salée. La première, observera la réponse transcriptomique au niveau branchial de 90 individus de souche INRA. La seconde, permettra la détection de QTL et eQTL influençant les capacités osmorégulatoires à partir d'un protocole réunissant 5 familles F2 regroupant plus de 1000 individus issus du croisement de deux lignées divergentes de truites.

Dans une première partie, je définirai les contraintes liées à l'euryhalinité chez les téléostéens ainsi que l'intérêt d'étudier les processus génétiques sous-jacents chez la truite arc-en-ciel.

Pour mieux apprécier les résultats de cartographie génétique, il advient de disposer d'information fonctionnelle sur les processus liés à l'acclimatation à l'eau de mer sur le même modèle biologique. Ces données seront obtenues dans la seconde partie de ce manuscrit décrivant la recherche de gènes candidats de l'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel par une approche cinétique de type transcriptomie différentielle.

La troisième partie de cette étude présentera les résultats de la détection de QTL pour cinq caractères sur un dispositif F2 de pleins frères de truites arc-en-ciel en réponse à un challenge hyperosmotique. Il s'agira alors de dégager les résultats les plus pertinents et de les discuter.

Enfin, l'approche de cartographie fine par détection de QTL d'expression (eQTL), complémentaire de la précédente, permettra de pointer du doigt les fonctions influencées par les QTL primolocalisés. Les résultats obtenus seront croisés avec ceux de la deuxième partie

et différentes approches seront testées afin de proposer des candidats positionnels et fonctionnels particulièrement intéressants.

Chapitre I

Contexte, intérêt et but de l'étude

Chapitre I. Contexte, intérêt et but de l'étude

Après avoir défini les phénomènes de réponse des organismes aux variations de l'environnement et les processus particuliers impliqués dans l'osmorégulation chez les téléostéens, nous nous proposons de faire l'état de l'art des connaissances accumulées ces 20 dernières années sur les composantes génétiques mises en jeu lors de la réponse à une modification de salinité de l'environnement chez les téléostéens. Si ces processus n'ont été définis qu'à un niveau fonctionnel, de nombreuses pistes permettent d'avancer l'existence d'une forte composante génétique impliquée dans les capacités d'adaptation aux milieux osmotiquement différents.

Finalement, suite à la présentation du matériel biologique utilisé dans ce projet, la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, nous fixerons les objectifs de ce travail de thèse.

1. Réponse des téléostéens aux variations osmotique du milieu environnant

Commençons par aborder les mécanismes de réponse des poissons téléostéens face aux variations osmotiques de leur environnement : le milieu aquatique.

1.1. Les organismes et leur environnement

Au cours de la vie de tout organisme, les paramètres environnementaux subissent des changements plus ou moins rapides et importants dans le temps et dans l'espace. Pour chacun de ces facteurs, il existe un gradient dans lequel chaque population, espèce ou communauté sous la dépendance de ce paramètre, peut vivre (loi de tolérance de Shelford (1913), figure 1). Cet intervalle de tolérance définit la valence écologique d'une espèce.

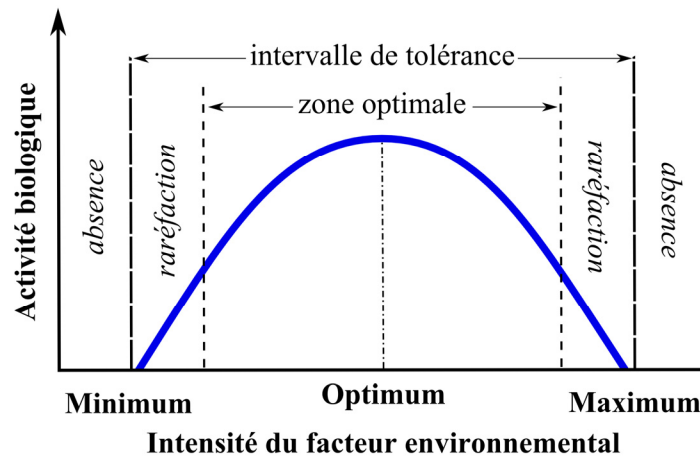


Figure 1 : Relation existant entre l'activité biologique d'un individu, d'une population, espèce ou communauté, et l'intensité d'un facteur environnemental dont il ou elle est dépendant(e)

Les réponses physiologiques des organismes, animaux comme végétaux, face aux variations des paramètres environnementaux sont, selon l'échelle de temps considérée, de trois principaux types :

(i) Si des changements environnementaux ont orienté l'évolution des populations par la sélection, nous parlerons d'adaptation des animaux à leur environnement (Eckert *et al.*, 1999). Ce processus est généralement irréversible. Il qualifie le fait que la physiologie d'un animal soit appropriée à son biotope. Ces changements intervenus dans le passé ont alors induit une sélection des phénotypes les mieux adaptés sur des milliers de générations (Eckert *et al.*, 1999). Du fait des relations entre phénotype, environnement et génotype, ce processus d'adaptation aboutit également à la sélection de génotypes. Ainsi, l'adaptation d'individus à un environnement peut être traduite par le fait qu'ils possèdent un matériel génétique en adéquation avec les paramètres biotiques et physico-chimiques de ce dernier.

(ii) Lorsque d'importantes modifications environnementales se déroulent à l'échelle temporelle de l'individu, l'organisme peut subir un processus d'acclimatation. Ce phénomène est réversible et intervient sur une durée de plusieurs jours ou semaines (Eckert *et al.*, 1999). Lors du passage d'un paramètre environnemental d'une gamme de valeurs à une autre et de sa stabilisation dans ce nouvel état, il peut intervenir chez le poisson téléostéen de profonds dérèglements. Pour que cela ne le pénalise pas, il va subir des modifications physiologiques afin que son fonctionnement biologique soit en accord avec les nouvelles caractéristiques du milieu. Dans ce cas, l'intervalle de tolérance d'un organisme ou d'un groupe d'individus se déplace d'une valence écologique 1 vers une valence écologique 2 comme indiqué dans la figure 2.

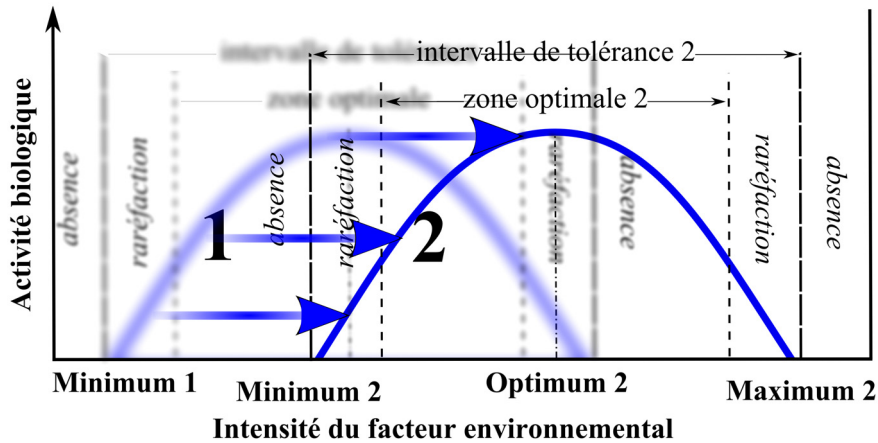


Figure 2 : Représentation du phénomène d'acclimation chez un organisme, une espèce ou une communauté, en fonction de la loi de tolérance de Shelford (1913).

Cette notion d'acclimation, lorsqu'elle n'est pas dépendante du génotype des organismes, peut être liée à celle de plasticité phénotypique. En effet, la plasticité phénotypique traduit le fait qu'un génome peut produire différents phénotypes, en fonction des paramètres externes.

L'amplitude et la rapidité de la modification du paramètre écologique associées aux capacités des organismes ne rendent pas toujours possible l'acclimation des individus. Elles peuvent alors entraîner un état de stress permanent ou la mort de l'animal.

(iii) Enfin, les organismes peuvent être stressés. Est considéré comme stressant toute déviation significative des conditions de vie menaçant l'équilibre physiologique d'un individu (Selye, 1936) (figure 3). Cette étape de stress peut être suivie d'une phase d'acclimation.

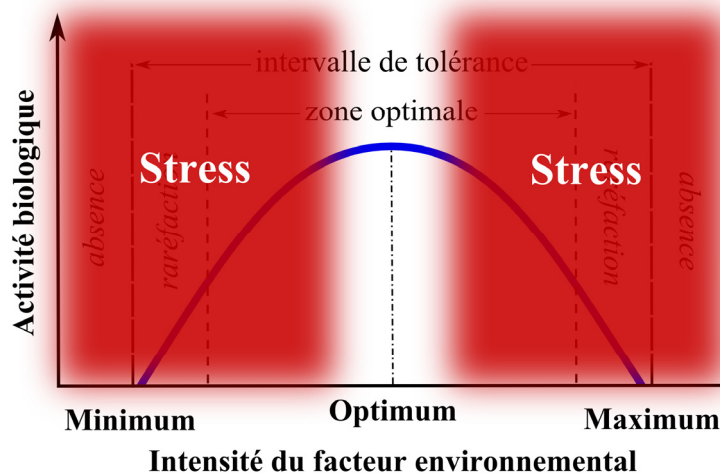


Figure 3 : Représentation des plages de stress potentielles pour un organisme, une espèce ou une communauté en fonction de la loi de tolérance de Shelford (1913).

L'infra-classe des téléostéens regroupe autour de 90% des espèces de poissons connues et près de la moitié des espèces de vertébrés. Ce groupe représente ainsi le taxon le plus grand et le plus diversifié du règne animal. Le milieu aquatique présente un fort gradient

temporel et spatial en composition physico-chimique, principalement au regard de sa salinité. Ainsi, des lacs d'Afrique à la mer Méditerranée en passant par l'océan, mais également sur l'estran, en fonction des marées, la salinité de l'eau peut être quasiment nulle ou atteindre des valeurs extrêmes de 25, 30 ‰. Des phénomènes d'osmose s'appliquent au niveau de toute membrane séparant deux milieux osmotiquement différents, et sont observables chez la majorité des animaux aquatiques entre leur milieu interne et leur environnement. Ces différences de pression osmotique obligent alors les animaux à mettre en place des mécanismes pour réguler les phénomènes d'osmose au niveau cellulaire mais également systémique : c'est l'osmorégulation.

1.2. L'osmorégulation chez les Téléostéens

1. Principe de base de l'osmorégulation

Le poisson est un animal vivant avec des membranes perméables. La pression osmotique interne d'un poisson en eau douce est la même que celle des Mammifères, soit environ 290 mOsmo.L⁻¹. S'il n'existait aucun système de régulation, les lois de l'osmose s'appliqueraient. Le poisson téléostéen serait envahi par l'eau en raison des sorties passives d'ions. Il se met alors en place une absorption active de sels au niveau branchial, et le poisson ne boit pas. En même temps, au niveau rénal, les sels vont être réabsorbés et une urine très abondante produite (Bœuf, 1987).

En eau de mer, la pression osmotique du poisson téléostéen atteint 310 mOsmol.L⁻¹. Il est sujet à une importante déshydratation à cause des mouvements passifs de sorties d'eau et d'entrée d'ions provoquant la prise réflexe de boisson. Un dessalement partiel de l'eau absorbée est pratiqué au niveau de l'œsophage pour faciliter les échanges intestinaux. Dans l'intestin, une absorption active permet ensuite aux sels de passer de la lumière intestinale vers le sang. Les excédents de sels transitant alors dans la circulation générale de l'animal sont excrétés au niveau branchial (Bœuf, 1987). Dans les reins, est produite une urine peu abondante et très concentrée, particulièrement en ions divalents. Ces mécanismes sont repris en figure 4.

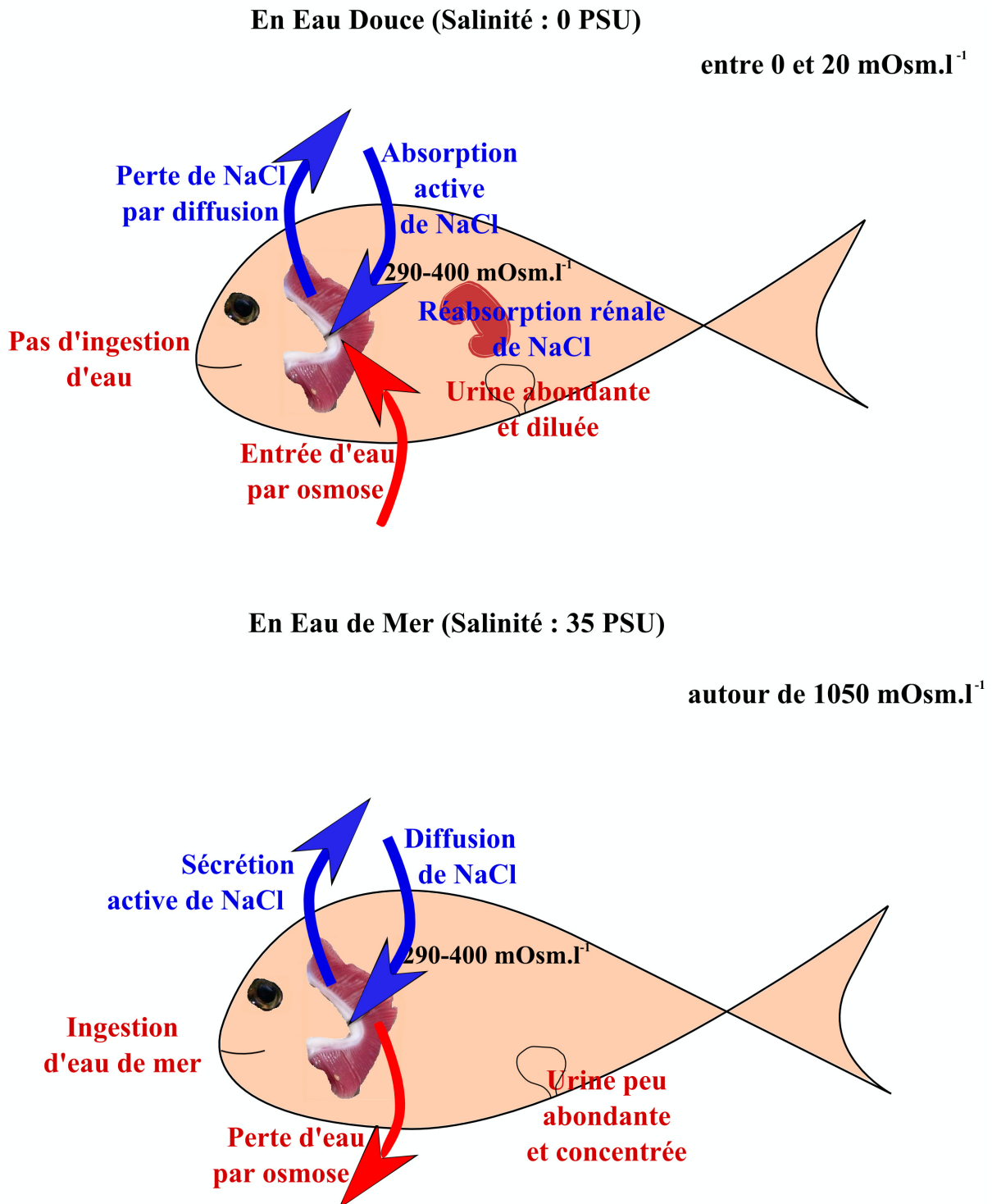


Figure 4: Régulation de la balance hydrominérale chez un téléostéen évoluant en milieu dulcicole et marin.

Il y a trois principaux organes impliqués dans l'osmorégulation : le système rénal, surtout mobilisé en eau douce, le système intestinal, utilisé particulièrement en eau de mer, et la branchie, principal organe osmorégulateur, essentiel en eau douce comme en eau de mer. La branchie, lieu d'échanges respiratoires, d'élimination des déchets azotés, d'absorption de

Ca^{2+} et de régulation de la balance acide-base, est alors également utilisée pour maintenir l'homéostasie ionique via une régulation de la balance hydrominérale.

La branchie, présentant une forte irrigation sanguine ainsi qu'une importante surface épithéliale, représente l'organe principal de l'osmorégulation. L'épithélium branchial peut être représenté sous la forme d'une couche cellulaire fine séparant le milieu intérieur du poisson de son environnement et capable de véhiculer d'importantes quantités de sels.

2. Structure et fonctionnement de la branchie

Chez les téléostéens, la branchie est constituée de 4 paires d'arcs branchiaux. Chacun de ces arcs est composé d'une double rangée de lamelles primaires. A son tour, chaque lamelle primaire regroupe des filaments branchiaux, appelés lamelles secondaires.

Les cellules de l'épithélium branchial (partie superficielle)

La branchie est un organe multifonctionnel. Son épithélium est composé à hauteur d'environ 90% de cellules pavimenteuses, aussi appelées cellules respiratoires. Les cellules à chlorure, ou cellules riches en mitochondries, encore dénommées ionocytes en recouvrent quant à elles de 5 à 10%. Enfin sont présentes des cellules à mucus (<2%) et autres cellules indifférenciées et neuroépithéliales. La figure 5 présente l'organisation cellulaire de l'épithélium branchial d'un téléostéen.

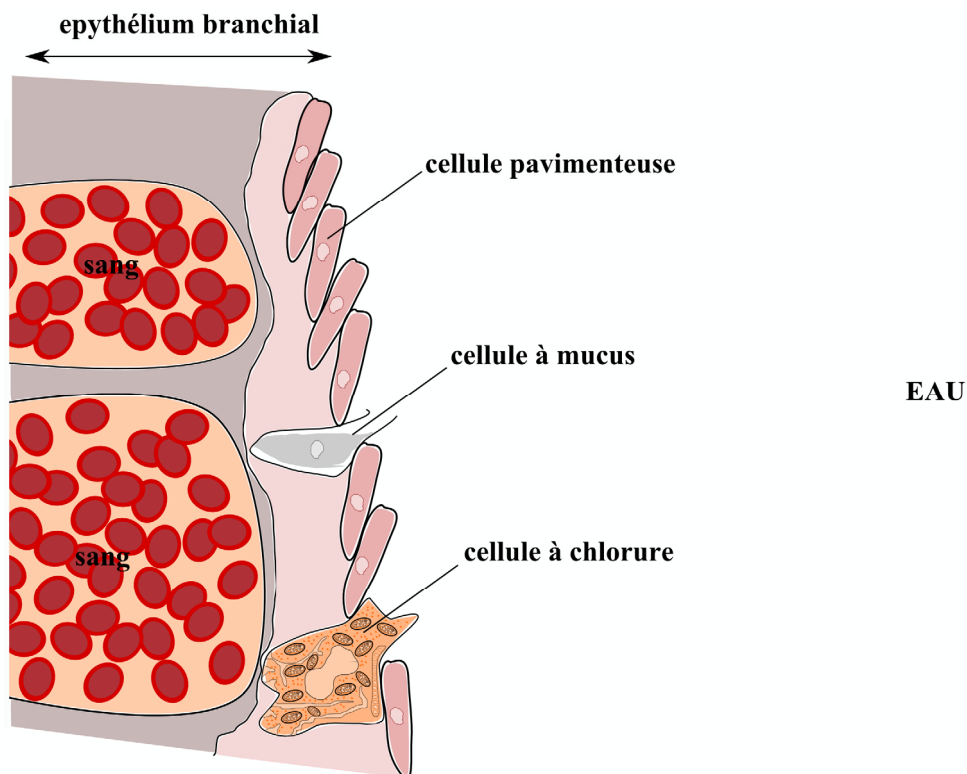


Figure 5: Organisation cellulaire de l'épithélium branchial d'un téléostéen

Les cellules à chlorure sont disposées le long de la lame basale des lames primaires. Il s'agit de cellules polarisées, caractérisées par une partie basale très différente de la partie apicale, qui ne présente pas d'invaginations. Cette asymétrie est révélatrice de la mise en place de processus de sécrétion. Le noyau de ces ionocytes est volumineux, et de nombreuses mitochondries composent leur cytosol. Il est également notée la présence de granules de glycogène, traduisant le stockage possible d'énergie, et d'un système tubulaire en continuité avec le milieu intercellulaire. L'épithélium branchial des téléostéens euryhalins est très différent entre eau douce et eau de mer, particulièrement au niveau de son organisation cellulaire (Evans *et al.*, 2005 ; Laurent et Dunel, 1980). Ainsi, pendant l'acclimatation des poissons entre eau douce et eau de mer (et vice versa), un remodelage a lieu pour permettre à la branchie de posséder tous les « outils » cellulaires nécessaires au transport d'ions. L'un des premiers changements concerne la structure des cellules à chlorure et des cellules accessoires (figure 6).

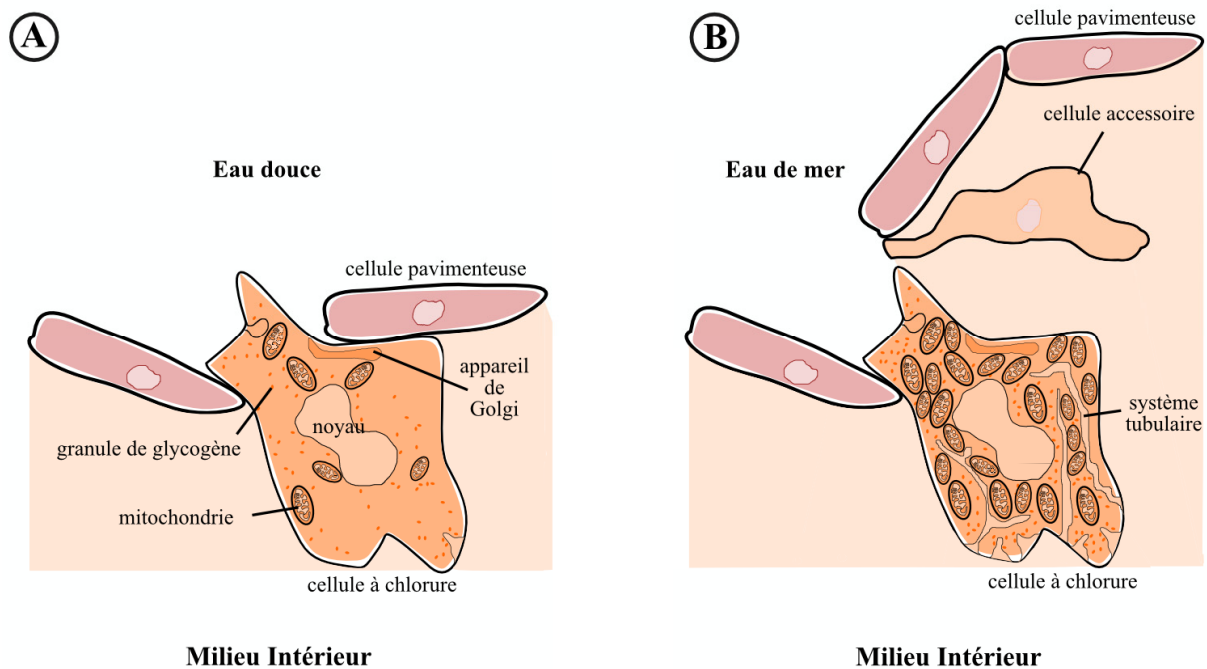


Figure 6: Représentation de l'épithélium branchial au niveau d'une cellule à chlorure chez un téléostéen euryhalin A) en eau douce B) en eau de mer.

En eau douce, l'observation de ces ionocytes révèle un système tubulaire peu développé ainsi qu'un nombre réduit de mitochondries, traduisant une certaine hypoactivité des cellules.

En eau de mer, apparaît des cellules accessoires, toujours liées à des cellules à chlorure. Des jonctions lâches se forment alors entre ces cellules et les ionocytes. Les lacunes ainsi créées au niveau de ces jonctions vont permettre la sécrétion paracellulaire et passive du sodium suivant le gradient électrochimique, les charges positives étant en excès dans le milieu

intérieur par rapport au milieu extérieur (Eckert, 1999 ; Evans *et al.*, 2005 ; Wilson et Laurent, 2002). Lors de l'acclimatation à un milieu hyperosmotique, le nombre de cellules à chlorure va augmenter. Elles vont également prendre du volume et présenter de très nombreuses mitochondries ainsi qu'un système tubulaire très important (Degnan *et al.*, 1977 ; Payan *et al.*, 1984 ; Sardet, 1980). Cette configuration traduit une forte activité cellulaire liée à des processus de sécrétion.

Acclimatation fonctionnelle et morphologique à un changement de salinité

L'épithélium branchial est capable d'adaptation morphofonctionnelle. En effet, comme décrit précédemment, cet épithélium possède une composition cellulaire différente en eau de mer par rapport à l'eau douce avec l'apparition de cellules accessoires et l'augmentation du nombre et du volume des ionocytes (McCormick *et al.*, 2003). Au niveau fonctionnel, la branchie, qui devait absorber des ions en eau douce, devient excrétrice en eau de mer. Ainsi, dans le tissu, le passage d'un épithélium absorbant vers un épithélium excréteur s'effectue par l'intermédiaire de phénomènes d'apoptose et de multiplication cellulaire sous contrôle endocrinien (McCormick, 2001). Ce remodelage de l'épithélium inclut donc des changements du turnover des cellules branchiales (Conte et Lin, 1967 ; Chretien et Pisam, 1986 ; Uchida et Kaneko, 1996), des modifications dans les processus de différenciation cellulaire (Conte et Morita, 1968 ; Kültz *et al.*, 1995) et la régulation de l'activité des pompes et des transporteurs d'ions (Evans, 1993 ; Kültz et Somero, 1995).

Description des transports ioniques en ED et en EM: rôle primordial de la branchie

L'observation des échanges d'ions au niveau des organes osmorégulateurs (i.e. système rénal, intestinal et branchial) montre que la branchie joue un rôle clé dans le transport entre les milieux intérieur et extérieur du téléostéen. Il est intéressant de noter que les flux d'ions sont limités en eau douce alors qu'ils sont très importants en eau de mer, présentant la nécessité d'une mise en place rapide, chez le poisson, des mécanismes excréteurs lors d'un passage en eau salée.

Dans un milieu environnant hyperosmotique, le poisson va excréter des ions (Evans *et al.*, 2005). En eau de mer, au niveau de la membrane basale des ionocytes, la présence du cotransporteur $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (NKCC) permet de faire passer les ions chlorures et sodium du milieu intérieur (les capillaires sanguins) vers le milieu intracellulaire. La sortie de chlore vers le milieu extérieur (l'eau de mer dans la cavité operculaire) se fera ensuite par le biais d'un canal à chlorure CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) positionné

sur la membrane apicale des ionocytes. Cette sécrétion de chlore va induire une différence de potentiel importante entre le milieu extérieur, négatif, et le milieu intérieur, positif. Au niveau des membranes basolatérales des ionocytes, des pompes vont alors intervenir, ce sont les pompes Na^+ / K^+ ATPase (NKA). Grâce à l'utilisation d'ATP, elles vont permettre de véhiculer du sodium dans le milieu intérieur en échange de potassium. Le Na^+ va alors pouvoir être sécrété dans le milieu extracellulaire grâce au gradient électrochimique entretenu par les mouvements de chlore et à la présence de jonctions lâches entre cellules à chlorure et cellules accessoires. Une sécrétion de sodium est ainsi permise au niveau apical par voie paracellulaire. Le potassium accumulé dans la cellule par le fonctionnement des transporteurs NKA et NKCC va quant à lui être déplacé suivant son gradient de concentration dans le milieu intérieur par un canal K^+ (Kir) situé sur la membrane basale des ionocytes. Ces mécanismes, proposés par Marshall *et al.* (2002) sont représentés en figure 7.

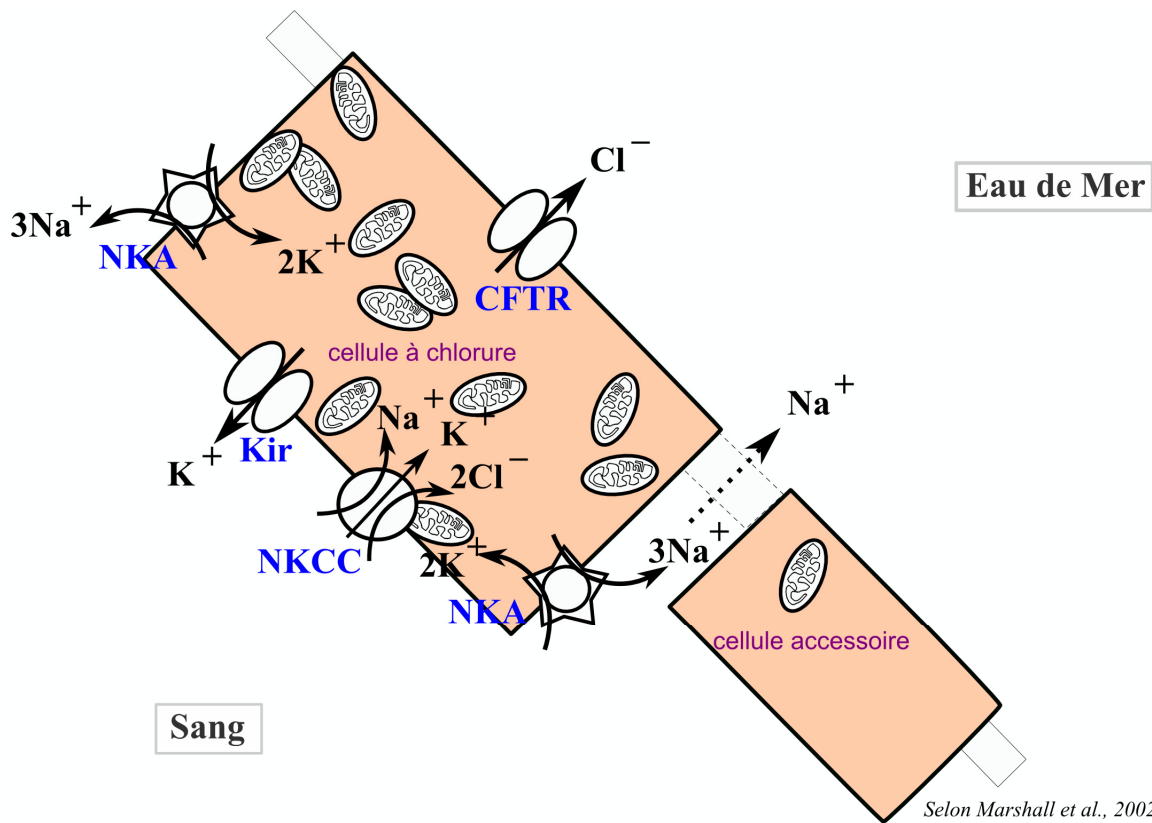
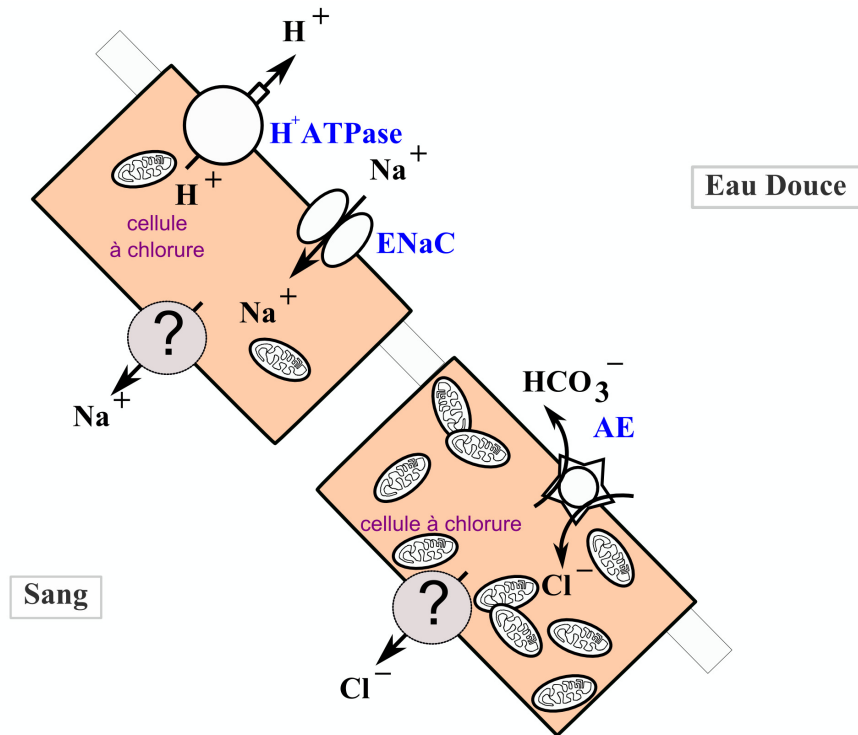


Figure 7: Mécanismes d'excrétion d'ions dans l'épithélium branchial de truite arc-en-ciel placée en eau de mer.

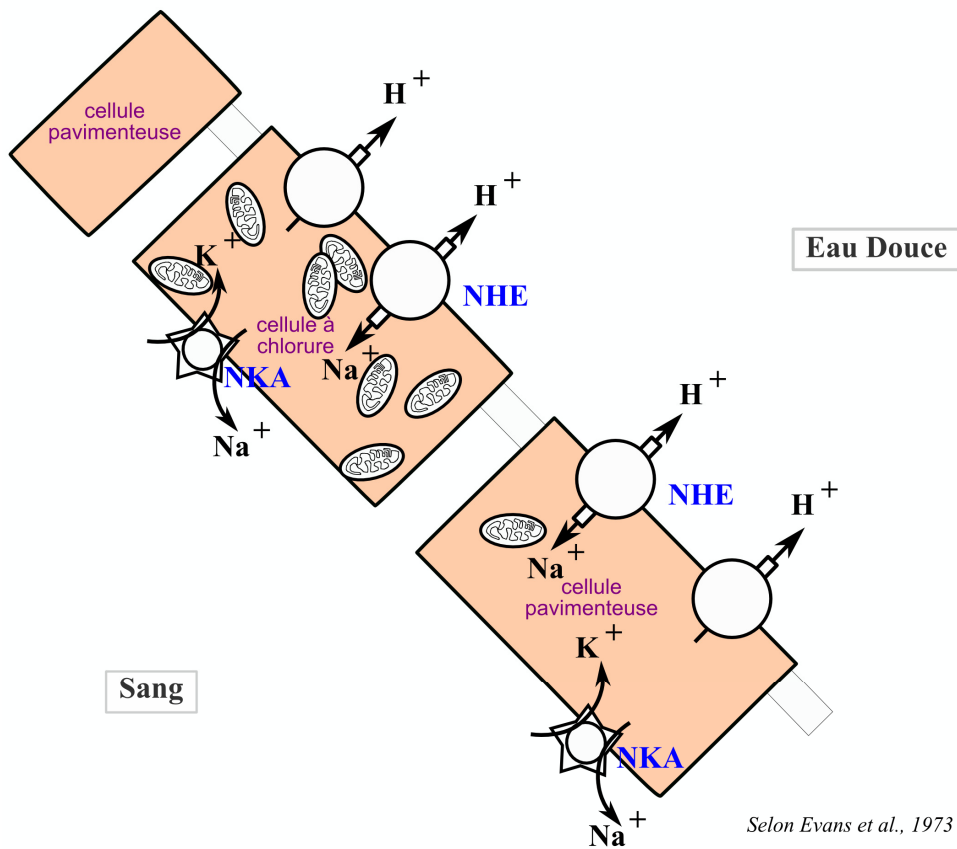
En eau douce, Smith (1930) et Krogh (1937) proposaient qu' au niveau de la branchie, la sécrétion d'acides (H^+ et / ou NH_4^+) était liée à l'absorption de sodium sans trouver de relation entre la sécrétion de bases (HCO_3^- et / ou OH^-) et l'absorption transépithéliale de chlore. Depuis, les relations existantes entre ces échanges de $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ et les mécanismes de transport acido-basiques ont été examinés, fournissant des résultats différents en fonction de

l'espèce considérée et des conditions environnementales testées (Evans *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, deux modèles de transport apical de sodium dans les cellules branchial sont proposés : (i) une pompe proton ATPase V-type électriquement liée à l'absorption de sodium via un canal sodique (ENaC) et (ii) un échange de sodium et de protons électriquement neutre via un échangeur Na^+ / H^+ (NHE). La mise en évidence moléculaire, de façon convaincante, de l'existence d'un échangeur NHE ou d'un canal ENaC dans les cellules branchiales fait toujours défaut (Hwang et Lee, 2007). Le modèle constitué d'un canal sodique électriquement lié à une pompe V-type H^+ -ATPase est actuellement toujours le modèle proposé chez le tilapia et la truite arc-en-ciel, notamment, suite aux résultats de l'étude immunologique de Wilson *et al.* (2000). La sortie basolatérale de sodium serait, quant à elle, assurée par une pompe Na^+ / K^+ ATPase (Evans *et al.*, 2005).

Les mécanismes impliqués dans l'absorption de chlore en eau douce sont encore moins bien connus. Si l'absorption de chlore est possible via des cotransporteurs tels que NKCC, seul l'échangeur $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ isoform 1 (AE1) a été caractérisé chez *Oncorhynchus mykiss* dans les cellules branchiales (Sullivan *et al.*, 1996). En ce qui concerne la sortie basolatérale de chlore, il est mentionné la possibilité qu'elle soit assurée par un canal chlore de type CFTR (Marshall *et al.*, 2002) ou CLC (Miyazaki *et al.*, 2002). La figure 8 présente ces différents mécanismes.



Selon Goss et al., 1992



Selon Evans et al., 1973 ; Avella & Bornancin, 1989

Figure 8: Les deux mécanismes proposés pour expliquer l'absorption d'ion dans l'épithélium branchial de truite arc-en-ciel placée en eau douce.

Le fonctionnement complexe des mécanismes mis en jeu lors de processus d'osmorégulation n'est pas gratuit pour l'animal. Il en découle en effet un coût non négligeable, notamment en énergie.

3. Osmorégulation et dépense d'énergie

La disponibilité en énergie est un facteur limitant pour les processus physiologiques. Les mécanismes employés par le poisson pour maintenir l'homéostasie ionique et osmotique interne permettant le fonctionnement normal des processus cellulaires et physiologiques sont complexes et sophistiqués (Evans *et al.*, 2005 ; Hwang et Lee, 2007). Ces processus iono et osmorégulateur s'achèvent par le biais de transporteurs et autres enzymes constituant les osmoeffecteurs. Leurs synthèses ainsi que leur fonctionnement sont particulièrement consommateurs en énergie.

La mesure indirecte du taux métabolique d'un individu est classiquement effectuée via la mesure de la consommation en oxygène de cet organisme (Randall *et al.*, 2002). De nombreuses études ont été menées sur la consommation d'oxygène lors de challenge osmotique mais les résultats sont très différents selon l'amplitude du challenge, sa durée ou l'espèce de téléostéen considérée (Tseng *et al.*, 2008). Cependant, différents points se retrouvent. Ainsi, le taux métabolique minimum est observé lorsque le poisson évolue dans un milieu isotonique et augmente en cas de modifications de salinité de l'environnement suivant une relation linéaire (Morgan et Iwama, 1991). De plus, si le taux métabolique est élevé en eau douce, c'est en eau de mer qu'il est le plus fort (Morgan et Iwama, 1991). Les mêmes auteurs mentionnent que chez les salmonidés, le taux métabolique minimum est associé à l'environnement de vie dans lequel l'espèce est le plus couramment rencontrée. Enfin, la part de l'énergie utilisée dans les processus d'osmorégulation chez le poisson est estimée comme variant de 20 à 68% de l'énergie totale dépensée (Boeuf et Payan, 2001).

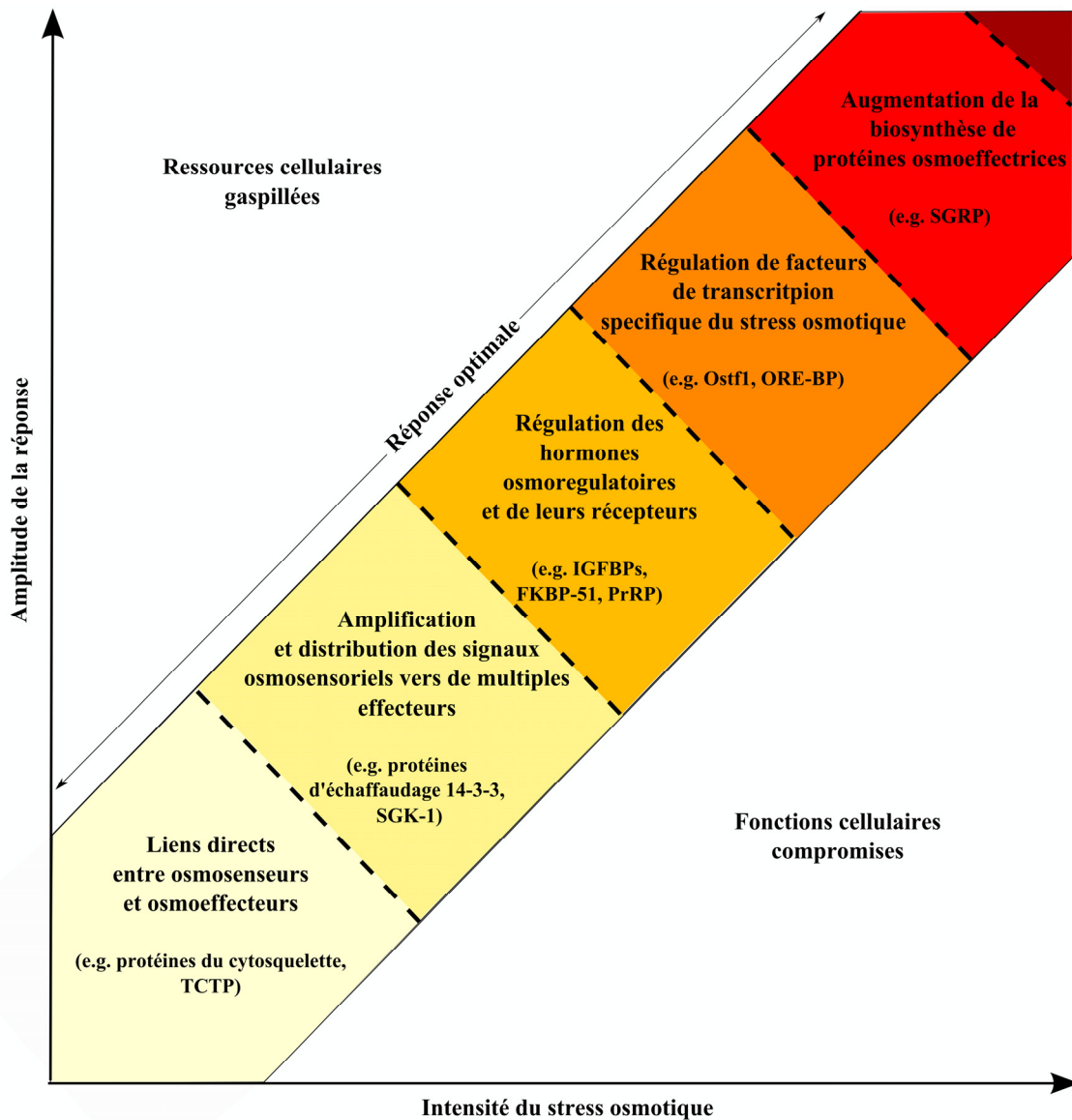
Si les mécanismes physiologiques de la réponse à un changement de milieu osmotique ont été très étudiés, les différents travaux menés récemment se concentrent plus particulièrement sur les composantes transcriptomiques et protéomiques des processus liés à l'osmorégulation.

1.3. Osmorégulation et expression de gènes

Les principales étapes depuis la perception des variations de salinité de l'environnement jusqu'à la régulation des paramètres physiologiques du poisson téléostéen peuvent être décrites selon trois niveaux. (i) La perturbation est perçue par des capteurs appelés osmosenseurs ; (ii) l'information est véhiculée par des voies de transduction du signal ; (iii) des effecteurs moléculaires, appelés osmo-effecteurs, situés au niveau des membranes cellulaires, vont contribuer au rétablissement de l'équilibre osmotique.

Par ailleurs, d'après Evans (2010), il existe une hiérarchie de réponses au niveau des processus mis en place après un stress osmotique (figure 9). Dans les premiers moments suivant un stress osmotique (quelques minutes à quelques heures), et si les compositions physico chimiques des milieux de provenance et de destination ne sont pas trop différentes, les protéines du cytosquelette, représentant alors des osmosenseurs étroitement liés aux membranes cellulaires, perçoivent les variations du volume cellulaire. Elles déclenchent alors une modification directe de l'activité des protéines de transports ioniques, constituant les osmo-effecteurs. Ce phénomène est sans doute le même chez un poisson sténohalin devant faire face à de faibles variations de la salinité environnementale. Dans un second temps, avec un niveau de stress osmotique plus important, se produit une amplification et une distribution du signal osmosensoriel intracellulaire vers les multiples protéines osmo-effectrices. Enfin, si le déséquilibre osmotique persiste, des mécanismes d'acclimatation agissent, via des facteurs de transcription spécifiques au stress détecté et des voies de signalisation régulées par les hormones, sur l'abondance des protéines effectrices ainsi que sur le turnover et la différenciation des ionocytes.

Diverses études ont montré, à ces 3 niveaux, l'implication de différents gènes dans les capacités d'osmorégulation chez un téléostéen subissant un stress osmotique.



Selon Evans, 2010

Figure 9: Hiérarchie de réponses des processus mis en place après un stress osmotique au niveau branchial chez le poisson téléostéen.

1. Les osmo-effecteurs

Les osmoeffecteurs sont des transporteurs ioniques responsables de l'équilibre osmotique existant entre le milieu intérieur de l'animal (sa circulation générale) et son environnement. Ils représentent, par leur identification et caractérisation fonctionnelle, la partie la plus étudiée des phénomènes suivant un stress osmotique chez le téléostéen. Leur présence augmente la vitesse et la sélectivité du transport par rapport à un phénomène de diffusion simple. Ainsi, les transporteurs permettent de véhiculer 10^2 à 10^8 molécules par seconde avec une grande spécificité d'action. Ils permettent également, en utilisant de l'énergie, de transporter des ions contre leur gradient de concentration. L'énergie nécessaire

est alors directement puisée en hydrolysant des molécules d'ATP (ATPase), ou en utilisant l'énergie libérée par le passage d'autres molécules (cotransports).

Il y a trois principales classes de protéines membranaires de transport:

i) Les canaux, véhiculant une molécule de façon passive, suivant son gradient de concentration ou électrochimique. Ce sont des pores qui permettent le mouvement passif d'ions ou de molécules de petites tailles (glucides, acides aminés, nucléotides ou H₂O). La figure 10 présente la structure du canal CFTR.

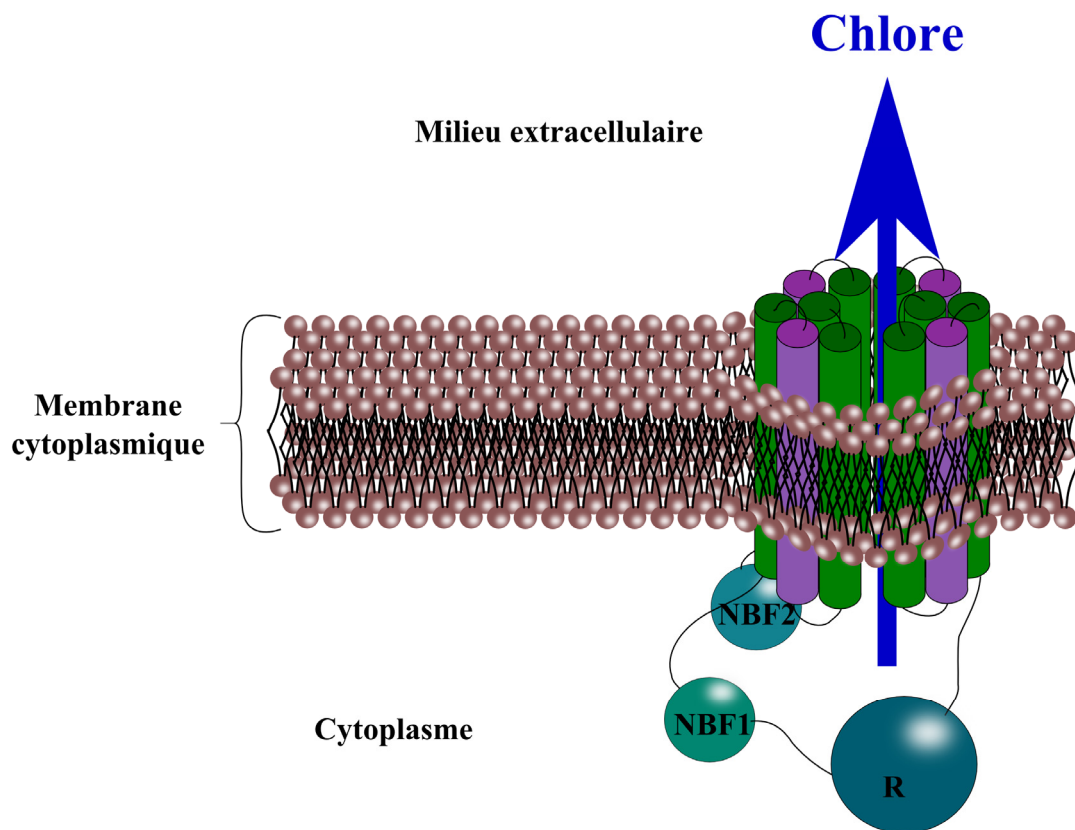


Figure 10: Structure et fonction du canal CFTR

ii) Les cotransports ou échangeurs utilisent la force motrice du transport passif d'une molécule suivant son gradient électrochimique pour permettre le passage transmembranaire d'autre(s) molécule(s) même contre leur(s) gradient(s) de concentration. Ces symports ou antiports nécessitent donc l'existence préalable d'un gradient ionique lié à l'activité d'une pompe. Ils sont pour cela également qualifiés de transports actifs secondaire.

iii) Enfin, les pompes qui utilisent de l'ATP pour faire passer des molécules d'un côté à l'autre de la membrane cytoplasmique. Ces protéines hydrolysant l'ATP sont qualifiées d'ATPases. Ce transport par pompe est dénommé transport actif primaire. La figure 11 présente le fonctionnement de la pompe Na⁺ / K⁺ ATPase.

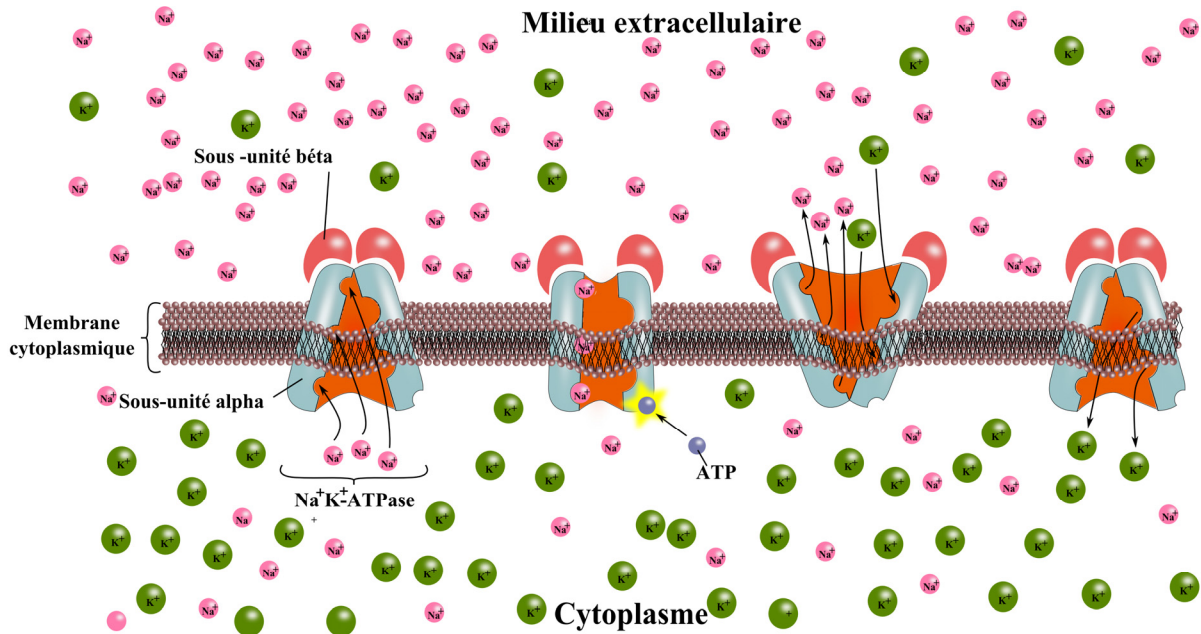


Figure 11: Fonctionnement de la pompe Na^+ / K^+ ATPase. Par l'utilisation d'ATP, la pompe permet de faire passer des ions sodium et potassium contre leurs gradients de concentrations.

Les travaux récents portant sur les osmo-effecteurs traitent particulièrement de l'expression de gènes et de la localisation des protéines correspondantes dans la branchie de poisson téléostéen. Il est ainsi possible d'observer une modification significative de l'expression des gènes codant pour les sous unités de la pompe Na^+ / K^+ ATPase lors d'un challenge hyperosmotique (Hiroi et McCormick, 2007 ; Mackie *et al.*, 2007 ; Tang et Lee, 2007 ; Tipsmark *et al.*, 2002 ; Tse *et al.*, 2007 ; Wilson *et al.*, 2007). Concernant cette pompe, il est également établi que son activité augmente après un stress osmotique mais aussi pendant la « préacclimatation » au milieu marin du saumon atlantique lors de sa smoltification (dévalaison du saumon du milieu dulcicole au milieu marin à l'âge de 1 ou 2 ans) (Tipsmark *et al.*, 2002). Plusieurs sous unités existent chez les salmonidés et l'expression des gènes codant pour ces dernières est différente en fonction du challenge osmotique subi. Ainsi, chez la truite arc-en-ciel, la sous unité $\alpha 1a$ est sous exprimée en eau de mer, surexprimée en eau douce et inversement pour la sous unité $\alpha 1b$ (Bystriansky *et al.*, 2006, 2007 ; Richards *et al.*, 2003).

Parmi les canaux, le canal chlore CFTR intervient en milieu hyperosmotique. La forte expression du gène le codant est démontrée en eau de mer par rapport à l'eau douce chez les salmonidés (Mackie *et al.*, 2007). Le même type de surexpression en eau salée est observé dans la branchie du Killifish *Fundulus heteroclitus* (Scott *et al.*, 2004) et de l'anguille japonaise *Anguilla japonicus* (Tse *et al.*, 2006). En eau douce, un homologue du canal sodique ENaC (Reid *et al.*, 2003), et à moindre mesure la pompe proton V-ATPase (Scott *et*

al., 2004), seraient responsables d'un couplage entre sortie de proton et entrée de sodium. Horng *et al.* (2007) montrent d'ailleurs qu'une inhibition de la traduction de la pompe proton V-ATPase par un morpholino spécifique entrave l'absorption de sodium chez le poisson zèbre *Danio rerio*.

Parmi les cotransports, nous pouvons citer le cotransporteur NKCC. Il inclut deux isoformes, NKCC1 et NKCC2, dont la première est considérée comme sécrétrice (Lytle *et al.*, 1995). Une augmentation de l'expression de NKCC, reflétant la stimulation de la sécrétion de chlore, a été observée dans la branchie d'anguilles européennes *Anguilla anguilla* transférées en eau de mer (Cutler et Cramb, 2002) ainsi que chez le killifish *Fundulus heteroclitus* (Scott *et al.*, 2004) et le bar rayé *Morone saxatilis* (Tipsmark *et al.*, 2004).

La pompe Na^+ / K^+ ATPase, le canal chlore CFTR et le cotransporteur NKCC représentent les trois grands acteurs liés aux processus d'osmorégulation dans la branchie des poissons téléostéens.

2. Perception des variations osmotiques environnementales : les osmosenseurs

Plusieurs travaux ont permis la mise en évidence de candidats impliqués dans la détection des variations osmotiques au niveau des cellules de l'épithélium branchial. Ces osmosenseurs placés en première ligne face aux répercussions cellulaires des changements environnementaux, vont alors être des récepteurs membranaires en lien avec le milieu extracellulaire, des senseurs de variations d'intégrité cellulaire et / ou des initiateurs précoces de signalisation. Ils vont agir sur les processus cellulaires pour maintenir la composition en eau et / ou en ions, mais également provoquer l'adaptation fonctionnelle du métabolisme de la cellule et influencer sur l'expression de gènes (Fiol et Kültz, 2007).

L'une des premières conséquences physiologiques d'un choc osmotique est la variation rapide du volume des cellules, induisant une désorganisation du cytosquelette étroitement lié aux membranes cellulaires. Des études menées chez les Mammifères ont mis en avant le rôle des protéines cytosquelettiques dans les processus d'osmosensing (Pedersen *et al.*, 1999 ; Pedersen *et al.*, 2001). Leur renouvellement témoigne alors d'un stress osmotique cellulaire important. Des travaux, également réalisés chez les Mammifères, suggèrent que la variation du volume cellulaire serait détectée par l'Aquaporine 4 qui pourrait ainsi être osmosenseur et osmoeffecteur (Venero *et al.*, 1999). Le rôle osmorégulateur des Aquaporines est également mentionné chez le poisson (Cerdeira et Finn, 2010 ; Tipsmark *et al.*, 2010).

Chez les téléostéens, différentes études sur les réponses intervenant rapidement après un stress osmotique (Fiol et Kültz, 2007 ; Kültz, 2005 ; Kültz et Burg, 1998) ont permis de suggérer différentes protéines candidates impliquées dans ce rôle d'osmosenseur. C'est notamment le cas des récepteurs au calcium CaSR (Calcium-Sensing Receptor). Il s'agit de protéines intégrées dans la membrane des cellules, sensibles aux modifications de la concentration en ions et de la densité en acides aminés. La détection de ces récepteurs dans les ionocytes branchiaux ainsi que dans les épithéliums transporteurs d'ions et de nutriments de l'intestin du *Tilapia Oreochromis mossambicus*, s'est faite récemment (Loretz et al., 2009). Les CaSR seraient impliqués dans la détection de variations de concentration en calcium dans l'environnement et la régulation directe du transport de calcium et des voies de signalisation hormonales (Nearing et al., 2002).

Une autre catégorie d'osmosenseur potentiel concerne l'adénylate cyclase. Il s'agit d'une enzyme membranaire qui est responsable de la production d'AMP cyclique à partir d'ATP. Son état d'activation est régulé par des protéines G, stimulatrices ou inhibitrices, elles-mêmes régulées par la ligature d'une molécule signal (hormone) à une protéine kinase A (PKA). Chez l'homme, l'adénylate cyclase soluble est décrite comme étant un senseur métabolique important impliqué dans les processus d'homéostasie acide / base (Tresguerres *et al.*, 2010). Après son étude chez les plantes, il est aujourd'hui proposé comme osmosenseur chez les eucaryotes (Saran et Schaap, 2004). May et Degnan (1984) étaient les premiers à montrer un effet osmorégulateur potentiel de l'adénylate cyclase chez le poisson. Ils ont ainsi montré que la Forskoline stimulait l'adénylate cyclase et provoquait la sécrétion de chlore à travers l'épithélium branchial chez *Fundulus heteroclitus*.

Parmi les récepteurs membranaires décrits comme senseurs, existe une superfamille remarquable par sa complexité et sa multifonctionnalité : celle des Transient Receptor Potential channels (TRP). Les TRP participent à presque toutes les réponses sensorielles connues chez l'homme. Plusieurs de ces protéines sont des canaux d'entrée de calcium et certaines ont le rôle de mécano / thermo senseurs (Corey, 2003 ; Corey *et al.*, 2004 ; Maroto *et al.*, 2005). Il a été montré des modifications de sécrétion de sels et d'hormones après activation de TRP, supposant un rôle dans les processus liés à l'osmorégulation (Liedtke *et al.*, 2000) notamment chez le téléostéen (Fiol et Kültz, 2007).

3. La transduction du signal

La transduction du signal suite à un stress de salinité s'effectue de l'osmosenseur vers l'osmoeffecteur. Son rôle principal est d'intégrer les signaux provenant des osmosenseurs pour générer un signal amplifié contrôlant les mécanismes effecteurs appropriés. Différents cas sont alors possibles (Evans, 2010).

Il peut ne pas exister d'étape de transduction du signal. C'est notamment ce qui est observé lorsqu'il y a un couplage direct entre osmosenseur et osmoeffecteur, comme quand les variations des conditions osmotiques de l'environnement vont provoquer une désorganisation du cytosquelette des cellules de l'épithélium branchial suite à la modification de leurs volumes. Cette désorganisation peut alors directement impliquer des réactions au niveau de la membrane plasmique et des transporteurs ioniques qui y sont présents (Evans, 2010). Ce type de réaction constitue la première étape de réponse suivant immédiatement un stress osmotique.

Dans la majorité des cas, lorsque le stress osmotique est important et / ou de durée plus longue, le signal perçu par les osmosenseurs doit être véhiculé vers les effecteurs (Evans, 2010). Ces voies de signalisation peuvent alors s'étendre non seulement dans le cytosol et / ou au niveau du noyau, mais également à un niveau systémique en se propageant via les voies hormonales entre les cellules et les organes.

Les principaux éléments connus de la transduction du signal osmosensoriel chez les poissons euryhalins sont les voies de signalisations calcium-dépendantes, les facteurs de transcriptions spécifiques et les hormones.

a) Les voies de signalisation cellulaires

Les seconds messagers, qui régulent l'activité de protéines cibles en s'y fixant et en changeant leurs formes, représentent des candidats importants de la réponse à un stress osmotique chez le poisson téléostéen. Les seconds messagers les plus fréquents, l'AMP cyclique (AMPC) et l'ion calcium, dont le mode de fonctionnement est décrit en figure 12, sont tous les deux impliqués dans la signalisation d'un stress osmotique (Fiol et Kültz, 2007). Un récepteur fixe une molécule signal et, par l'intermédiaire de protéines G, active l'adénylate cyclase. L'enzyme catalyse ensuite la synthèse d'AMPC qui se fixe à la protéine cible et active son fonctionnement. En ce qui concerne la voie de l'ion calcium, après fixation d'une molécule signal à son récepteur extracellulaire, d'autres protéines G activent la phospholipase C qui catalyse la synthèse d'inositol triphosphate et provoque l'ouverture d'un

canal calcique dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le calcium se fixe ensuite sur une protéine cible qui peut alors exercer son action.

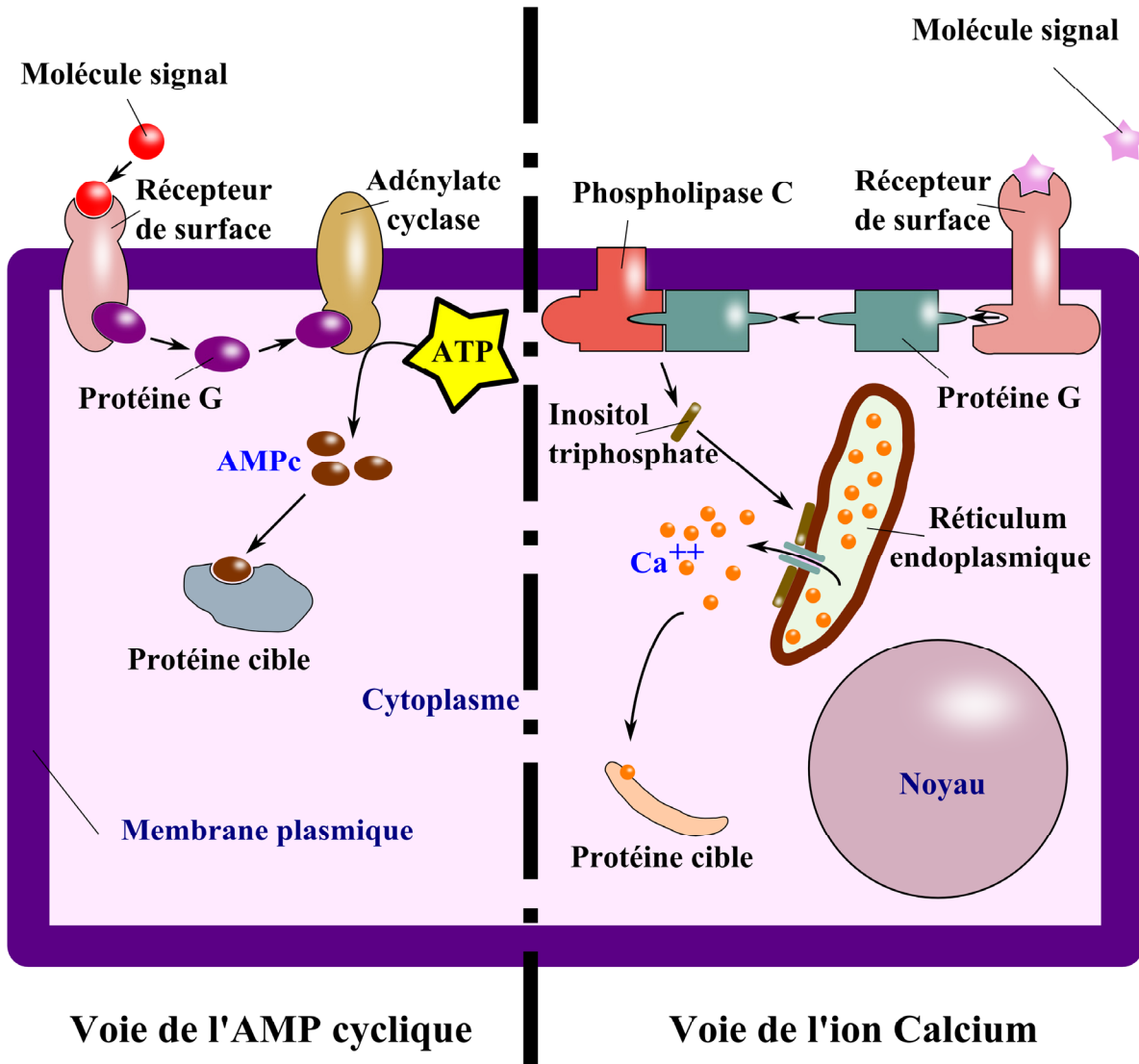


Figure 12 : Mode de fonctionnement des seconds messagers

Concernant les messagers dont l'activité est dépendante des niveaux d'AMP cyclique, nous retrouvons la protéine kinase A dont il a été démontré la capacité à phosphoryler le canal CFTR chez *Fundulus heteroclitus* en milieu hyperosmotique (Hoffmann *et al.*, 2002 ; Marshall *et al.*, 1995 ; Singer *et al.*, 1998). Parmi les autres kinases dont l'activité régulerait le transport d'ions chez le poisson téléostéen, nous pouvons citer les MAPKinase, la focal adhesion kinase, la myosin light chain kinase ainsi que la protéine kinase C (Hoffmann *et al.*, 2002 ; Marshall *et al.*, 2005 ; Marshall *et al.*, 2008). Elles sont impliquées dans les processus de prolifération, de migration, de mort cellulaire, mais agissent également sur la mise en forme du cytosquelette et la modulation des canaux ioniques (Toker, 1998).

Le calcium est un second messenger majeur dans les cellules eucaryotes. Wendelaar Bonga (1997) mentionne différents effets des changements en niveau de calcium, dans l'environnement ainsi que dans le plasma, sur la morphologie des cellules à chlorures branchiales et les fonctions de protéines osmoeffectrices chez le téléostéen. Chez le tilapia, Seale *et al.* (2003a et 2003b) ont montré qu'un choc hypoosmotique stimulait la sécrétion de prolactine, suite à l'activation de canaux ioniques et à l'augmentation des niveaux calciques intracellulaires. Les effets des hormones osmorégulatoires se déroulent au moins partiellement via l'utilisation de la signalisation calcique intracellulaire. Deux études chez les téléostéens le mentionnent, d'un côté, concernant l'intervention du cortisol dans la réduction du niveau cellulaire de calcium libre en cas de stress hyperosmotique (Hyde *et al.*, 2004), et de l'autre, lorsque Russel *et al.* (2001) affichent leurs résultats présentant l'angiotensine II comme pouvant augmenter ces niveaux de calcium libre dans les tissus de poisson. En plus de son effet sur le calcium intracellulaire, le cortisol inhibe l'activité de l'adénylate cyclase suggérant que le calcium et l'AMPc représentent les deux seconds messagers principaux de la signalisation d'un stress osmotique (Borski *et al.*, 2002).

Les voies de signalisation impliquant la famille MAPK régulent de nombreuses réponses cellulaires majeures comme la prolifération, la croissance, la différenciation et la mort cellulaire (Cowan et Storey, 2003 ; Karin, 1998). Suite à un stimulus, les MAPK sont phosphorylées par les MAPK kinases (MAPKK) elles mêmes activées par les MAPKK kinases (MAPKKK) (figure 13). La voie de signalisation des MAPK est activée par de nombreux types de récepteurs différents (i.e. intégrines, canaux ioniques, récepteur à la tyrosine kinase RTKs). Cette cascade de signalisation va ensuite très souvent être sollicitée via des protéines G proches de la membrane plasmique et de ses récepteurs. Les MAPK peuvent ensuite intervenir localement ou passer du cytoplasme vers l'intérieur du noyau où elles pourront interagir avec des facteurs de transcription. Kültz et Avila (2001) montrent d'ailleurs que l'activité des trois principaux MAPKs (ERK1, SAPK1 et SAPK2) est rapidement altérée dans l'épithélium branchial de *Fundulus heteroclitus* suite à un stress osmotique. De même la régulation osmotique de la phosphorylation des MAPK p38 et JNK est démontrée dans l'épithélium operculaire du killifish lorsqu'un inhibiteur de p38 provoque la diminution de la sécrétion de chlore (Marshall *et al.*, 2005). Ollivier *et al.* (2006) mentionnent également le fait que la p38 MAPK est essentielle pour diminuer la régulation du volume des hépatocytes de turbot *Scophthalmus maximus*. Enfin, Fiol *et al.* (2006a) proposent que le régulateur des cascades de MAPK, MAPKKK 7 interacting protein 2, dont le

gène est surexprimé dans les premières heures suivant un stress hyperosmotique chez *Oreochromis mossambicus*, ait un rôle dans la transduction du signal osmosensoriel chez les téléostéens.

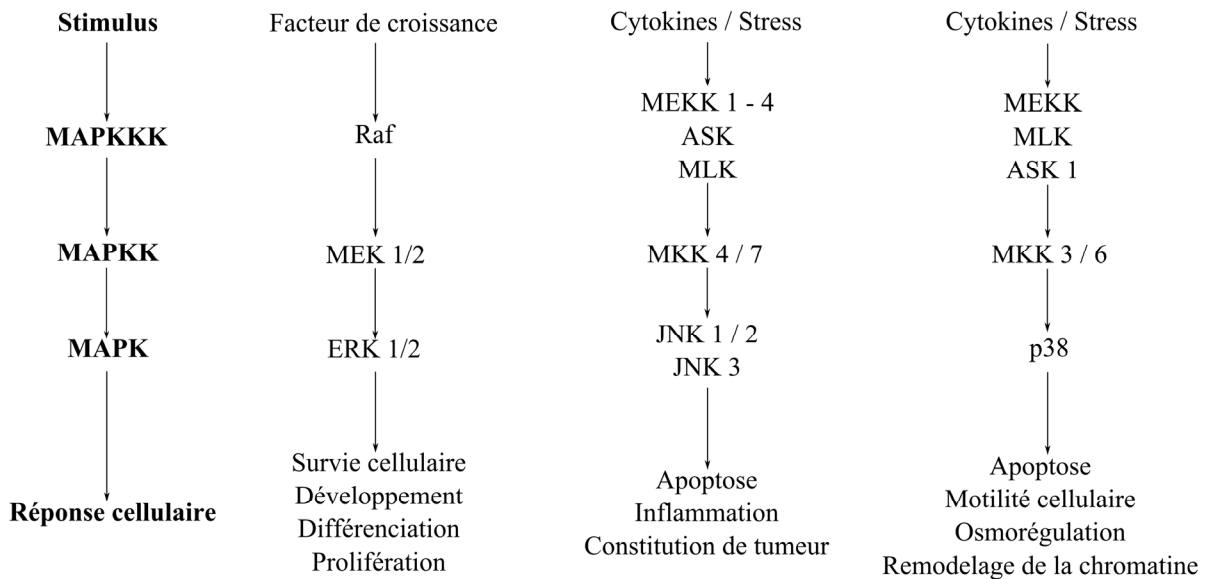


Figure 13: Représentation de la voie de signalisation des MAPK.

Les protéines 14-3-3 (Fu *et al.*, 2000 ; Koskinen *et al.*, 2004 ; Kültz *et al.*, 2001) représentent une famille de molécules régulatrices pouvant se lier à de très nombreuses protéines de signalisation (phosphatases, kinases, récepteurs transmembranaires, etc.). Il s'agit de protéines qui partagent le fait d'être essentielles pour l'acclimatation de cellules eucaryotes à des changements environnementaux (Finnie *et al.*, 1999). De telles protéines sont suspectées de moduler le transport d'ions en utilisant plusieurs voies et sont impliquées dans les processus de remodelage de l'épithélium branchial pendant la transition de téléostéens euryhalin entre milieux hyper et hypoosmotique (Kültz *et al.*, 2001). Elles agiraient en activant la pompe à protons ATPase qui fournirait alors l'énergie nécessaire au transport d'ions via la Na^+ / K^+ ATPase en diminuant l'activité de protéines kinase C dans la branchie de morue *Gadus morhua* (Crombie *et al.*, 1996). Cette étude mentionne même l'existence possible d'un rétrocontrôle négatif de ses protéines kinase C sur l'activité Na^+ / K^+ ATPasique de l'épithélium branchial. Un tel mécanisme serait également observable dans les processus d'activation du canal Chlore chez *Fundulus heteroclitus* (Kültz *et al.*, 2001).

Les dommages occasionnés à des macromolécules comme l'ADN et les protéines représentent également un signal important lors d'un stress osmotique fort (Kültz, 2005 ; Lamitina *et al.*, 2006). Suite à la détection de ces dommages cellulaires, des molécules chaperonnes vont jouer un rôle protecteur (Deane *et al.*, 2002 ; Evans et Somero, 2008 ; Smith et Bradley, 1999). Ainsi, concernant les protéines Translationally controlled tumour protein

(TCTP), il a été décrit leur rôle d'inhibiteur d'activité Na^+ / K^+ ATPasique (Kim *et al.*, 2008). La modification des protéines dénaturées lors de dommages cellulaires va solliciter l'action de type chaperon de la TCTP et provoquer l'augmentation indirecte de l'activité Na^+ / K^+ ATPasique par levée d'inhibition (Evans et Somero, 2008, 2009). Ce rôle potentiel dans la transduction du signal osmosensoriel est supporté par le fait que d'autres chaperonnes comme les HSP sont connues pour jouer un rôle de protection lors d'un stress osmotique chez le poisson téléostéen (Smith et Bradley, 1999) et que les dommages protéiques ont été montrés comme régulant les réponses à un stress osmotique (Lamitina *et al.*, 2006). D'autres molécules reconnaissent les dommages cellulaires. C'est le cas des ubiquitines E3 ligase, dont deux, Rbx1 et un homologue de Grail / Goliath, ont été mentionnées comme étant rapidement surexprimées pendant un stress hyperosmotique dans les branchies, respectivement chez le saumon atlantique *Salmo salar* (Pan *et al.*, 2002) et chez le tilapia *Oreochromis mossambicus* (Fiol *et al.*, 2006a).

b) Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription englobent toutes les molécules dont l'activité permet d'initier et / ou de réguler les phénomènes de transcription. De récents travaux ont démontré le rôle primordial de telles molécules dans les processus liés à l'osmorégulation en initiant de profonds changements dans l'expression de gènes (Fiol et Kültz, 2005 ; Lopez-Bojorquez *et al.*, 2007).

Le premier facteur décrit comme agissant spécifiquement lors d'un stress osmotique chez le poisson est le facteur de transcription de stress osmotique 1 (Ostf1) identifié chez le tilapia *Oreochromis mossambicus*. L'expression du gène codant ce facteur a été plusieurs fois confirmée comme fortement induite à court terme à la suite d'un stress hyperosmotique chez le pagre à tête noire *Acanthopagrus schlegeli* et le tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus* (Choi et An, 2008 ; Fiol et Kültz, 2005 ; Fiol *et al.*, 2006b ; Mc Guire *et al.*, 2010). De plus, les résultats indiquent que l'induction de son expression est indépendante de la présence de cortisol ou de tout autre facteur systémique mais est en étroite relation avec la détection de conditions hypertoniques (Fiol *et al.*, 2006b).

La protéine ORE-BP (Tonicity Response Element-Binding), aussi nommée TonEBP ou NFAT5, représente le seul réel facteur de transcription connu pour être sensible aux variations osmotiques et initier l'acclimatation cellulaire à un stress extracellulaire hypertonique chez les Mammifères (Tong *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2008). Les travaux de

Lopez-Bojorquez *et al.* (2007) sur le killifish fournissent des preuves expérimentales de l'implication de TonEBP dans la transduction du signal osmosensoriel chez les téléostéens.

Ces protéines impliquées dans la transduction du signal jouent sur l'activation des protéines effectrices (e.g. les transporteurs ioniques). Les réponses cellulaires induites par de tels mécanismes seront donc limitées par le nombre, ainsi que par les capacités (transport d'ions intra- et extra- cellulaire) des effecteurs concernés (Evans, 2010). En cas de stress osmotique de très forte magnitude et / ou durée des réponses seront mises en place à l'échelle de l'organisme, grâce à l'intervention conjointe d'hormones et de leurs récepteurs (Evans, 2010).

c) Les hormones et leurs récepteurs

Les principaux acteurs hormonaux impliqués dans le contrôle de l'osmorégulation chez le poisson sont les corticostéroïdes, la prolactine (Prl), l'hormone de croissance (GH) et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) (Evans, 2002).

Le cortisol possède un rôle clé dans la régulation de la différenciation, ainsi que dans la fonction cellulaire, pendant les processus d'osmorégulation. Il opère en synergie avec, d'un côté, la prolactine en eau douce, et de l'autre, IGF1 et la GH (Growth Hormone) en eau de mer, pour réguler la différenciation des cellules riches en mitochondries, respectivement de type eau douce et eau de mer, à partir d'un même type de cellules souches (McCormick, 2001 ; Sakamoto *et al.*, 2001). Le cortisol, classé parmi les hormones lipophiles, peut passer la membrane plasmique sans faire intervenir de récepteur pour pénétrer la cellule. Une fois dans le cytosol, il opère grâce à sa liaison à un récepteur aux glucocorticoïdes (GR, Glucocorticoid Receptor). Il existe chez la plupart des téléostéens deux sous types de GR, le GR1 et le GR2. Il a été montré que les niveaux d'ARNm de GR1 dans la branchie sont augmentés pendant la smoltification et le transfert en eau de mer de salmonidés (Kiilerich *et al.*, 2007 ; Mazurais *et al.*, 1998 ; Mizuno *et al.*, 2001 ; Nilsen *et al.*, 2008). Ceux de GR2 ne présentent aucune modification chez le saumon atlantique *Salmo salar* (Kiilerich *et al.*, soumis1) mais une autre étude sur la truite arc-en-ciel (Kiilerich *et al.*, soumis2) propose une légère diminution.

Chez les mammifères, la principale hormone mineralocorticoïde, l'aldosterone, joue un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie hydrique et sodique. Les poissons ne peuvent pas synthétiser l'aldosterone (Jiang *et al.*, 1998), mais sont capables de produire du 11-deoxycorticosterone (DOC) (Jiang *et al.*, 1998), un intermédiaire de la synthèse d'aldostérone.

Récemment, un récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) possédant une forte affinité pour la DOC a été caractérisé chez la truite arc-en-ciel (Sturm *et al.*, 2005) ainsi que chez d'autres espèces de téléostéens (Greenwood *et al.*, 2003 ; Kiilerich *et al.*, 2007 ; Stolte *et al.*, 2008). La récente découverte du MR et de sa haute affinité pour son ligand de type minéralocorticoïde, la DOC, suggère la présence d'un axe minéralocorticoïde fonctionnel chez le téléostéen (Sturm *et al.*, 2005). Ainsi, le système de signalisation hormonal serait constitué de MR et DOC, et des deux isoformes récepteurs aux glucocorticoïdes, GR1 et GR2, avec leur ligand à forte affinité, le cortisol. Le clonage chez la truite arc-en-ciel d'une 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2 (Kusakabe *et al.*, 2003)), une enzyme servant chez les mammifères à faciliter la signalisation dépendante de l'aldostérone via MR en convertissant le cortisol actif en cortisone inactive, peut intervenir aussi dans la signalisation DOC-MR chez les poissons. Une étude de Kiilerich *et al.* (2007) a d'ailleurs montré la surexpression de transcrite de 11 β HSD2 dans la branchie de salmonidés pendant les processus de smoltification et d'acclimatation à l'eau de mer. Cependant, il reste à identifier si le cortisol, la DOC ou les deux, sont spécifiquement utilisés comme ligand physiologique du MR.

Le cortisol agit sur la régulation de l'homéostasie ionique en agissant sur de nombreux transporteurs ioniques (Lin *et al.*, 1994 ; McCormick, 2001). Ainsi, l'activité Na⁺ / K⁺ ATPasique est démontrée comme régulée par les niveaux de cortisol dans la branchie et est positivement corrélée aux concentrations en GR (Madsen *et al.*, 1995 ; McCormick, 2001 ; Sheperd *et al.*, 2005 ; Shrimpton et McCormick, 1999). L'expression des gènes codant pour d'autres osmoeffecteurs, comme le CFTR et le NKCC, est également régulée par le cortisol (Pelis et McCormick, 2001 ; Singer *et al.*, 2007). Enfin, il a été démontré que le cortisol joue aussi un rôle clé dans la mobilisation de substrat énergétique améliorant la capacité métabolique du foie, étape importante à la mise en place des processus d'acclimatation à l'eau de mer (Laiz-Carrion *et al.*, 2002 ; Mommsen *et al.*, 1999 ; Vijayan *et al.*, 1996).

Les informations sur le rôle de la DOC et du MR dans l'osmorégulation chez le téléostéen sont très limitées. McCormick *et al.* (2008) ne relèvent aucun effet de la DOC ou d'un antagoniste aux MR, le spironolactone, sur l'activité de la Na⁺ / K⁺ ATPase, l'expression des gènes codant pour les sous-unités α 1a et α 1b de cette pompe, ou la tolérance générale de l'organisme pendant l'acclimatation à l'eau de mer. Cependant, récemment, Kiilerich *et al.* (soumis1) a montré un effet de la DOC sur les ARNm de transporteurs ioniques sur des explants de tissu branchial de saumon atlantique. En outre, un rôle de MR dans l'acclimatation à l'eau douce a été suggéré après la démonstration de son effet inhibiteur de

certaines paramètres osmorégulateurs branchiaux chez la truite arc-en-ciel et le killifish (Scott *et al.*, 2005 ; Sloman *et al.*, 2001).

Ainsi, même si le système cortisol-GR est considéré comme un mécanisme endocrine important d'acclimatation entre eau douce et eau de mer, le rôle exact du système DOC-MR dans les processus d'osmorégulation chez le téléostéen reste incertain.

L'implication de protéines chaperonnes, comme la FK51 binding protein (FKBP-51) ou les Heat Shock Protein (HSP), dans les processus liés à l'osmorégulation a été démontrée au niveau branchial chez le gobie *Gillichthys mirabilis* (Evans et Somero, 2008) et le pagre à tête noire *Acanthopagrus schlegeli* (Choi et An, 2008). Si leur rôle exact chez les téléostéens n'a pas été démontré, il est intéressant de noter que les protéines chaperonnes jouent un rôle de régulation de l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes chez les mammifères et peuvent moduler les capacités de recrutement du cortisol, et donc son effet (Grad et Picard, 2007 ; Westberry *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2008). Lors d'une modification de l'osmolalité interne de la cellule, des protéines vont être dénaturées et mobiliser les molécules chaperonnes. Ceci va empêcher ces protéines d'inactiver les récepteurs aux glucocorticoïdes et donc permettre la meilleure transmission des signaux relayés par le cortisol lors de la réponse à un choc osmotique (Evans, 2010 ; Grad et Picard, 2007). Le mode d'action des molécules chaperonnes et du cortisol est décrit en figure 14.

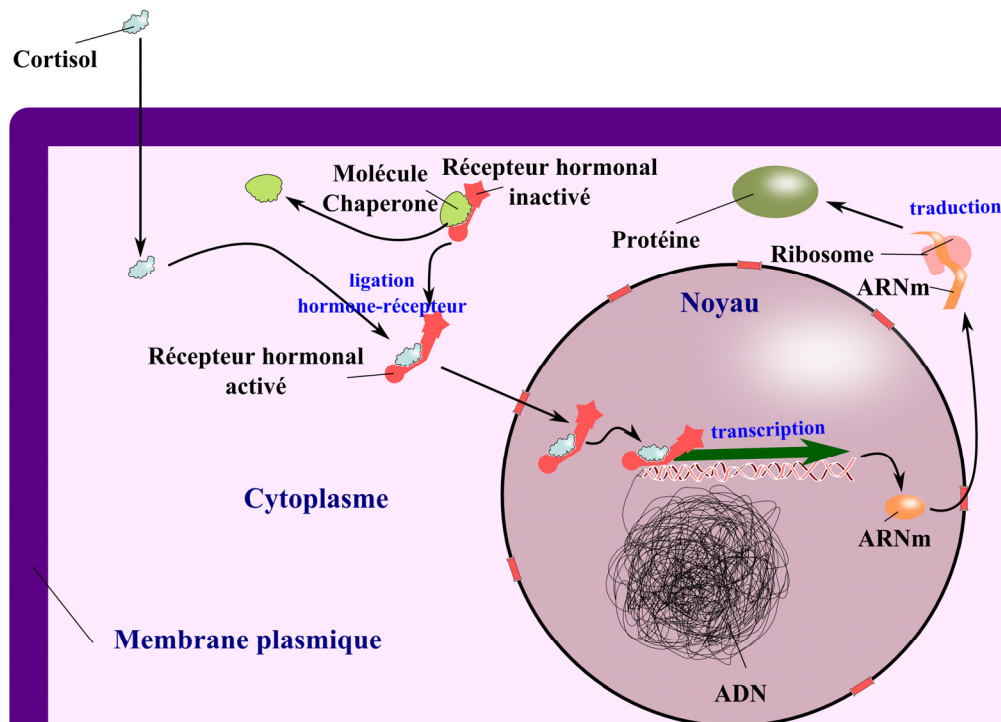


Figure 14 : Représentation du mode d'action des hormones comme facteur de transcription. Cas du cortisol, qui ne nécessite pas la présence de récepteurs sur la membrane plasmique de la cellule pour la pénétrer.

Les mécanismes impliqués dans les processus de réponse au stress osmotique, d'acclimatation ou d'adaptation à un environnement salin différent peuvent ainsi être caractérisés au niveau fonctionnel. Mais qu'en est-il réellement au niveau génétique? Quelles pistes laissent entendre l'importance de la composante génétique dans les variabilités de capacités osmorégulatoires chez le poisson?

1.4. Génétique de l'osmorégulation

La truite arc-en-ciel est un salmonidé anadrome non obligatoire, rendant possible l'existence de formes migratrices. Les différentes lignées existantes à travers le monde possèdent des particularités bien différentes, notamment en terme de capacité osmorégulatoire. Ainsi, certaines lignées ne tolèrent pas de transfert en eau salée quand d'autres supportent très bien d'être transférées directement en eau de mer, comme cela est le cas pour la souche INRA automnale décalée utilisée dans la deuxième partie de cette étude et des souches bretonnes (Harache et Bœuf, 1986). Si de nombreuses études ont clairement montré que la taille des poissons, de même que le protocole de transfert utilisé entre eau douce et eau de mer représentaient des paramètres clés pour une acclimatation réalisée avec succès (Fuentes *et al.*, 1996 ; Johnston et Cheverie, 1985), les facteurs génétiques peuvent également jouer leur rôle. De plus, Myers et Kohler (2000) montrent que la régulation de l'osmolarité plasmatique pendant l'acclimatation à un milieu salin différent présente des différences significatives entre deux populations de bars hybrides interspécifiques réciproques obtenus à partir de bars blancs *Morone chrysops* et de bars rayés *Morone saxatilis*. De même, Allegrucci *et al.* (1995) mentionnent des différences physiologiques, avant et après l'acclimatation à l'eau douce, entre des individus de lagunes et de mer chez le bar *Dicentrarchus labrax*.

L'hérédité de caractères liés à la smoltification a été examinée chez plusieurs espèces de salmonidés, incluant la forme migratrice de la truite arc-en-ciel (steelhead trout) (Johnsson *et al.*, 1994 ; Nichols *et al.*, 2008 ; Thrower *et al.*, 2004). Ces études, montrant l'effet d'adaptation différentes sur les capacités osmorégulatoires, suggèrent que ces paramètres sont sous contrôle génétique. Un autre exemple bien connu est la comparaison entre des populations de saumons migrateurs et non-migrateurs. L'observation de saumons atlantique non migrateurs (« landlocked ») et migrateurs du continent Nord Américain et d'Europe a démontré les différences dans la capacité de ces lignées à s'acclimater à l'eau de mer (Birt *et al.*, 1991 ; Birt et Green, 1993 ; Schmitz, 1995 ; Staurnes *et al.*, 1992).

Si de nombreuses études traitent de l'osmorégulation chez les téléostéens au niveau des mécanismes transcriptomique et protéomique, peu d'informations sont aujourd'hui disponibles au niveau génétique. La truite arc-en-ciel, par son euryhalinité, son importance économique de premier ordre en aquaculture et son statut d'espèce modèle dans le domaine scientifique constitue un modèle biologique de premier choix pour aborder le contrôle génétique des capacités d'osmorégulation.

2. La truite arc-en-ciel, un salmonidé d'aquaculture

La truite arc-en-ciel est un salmonidé. Cette famille apparaît au début du Quaternaire, au Pléistocène. Suite aux glaciations de l'ère Quaternaire et aux périodes postglaciaires, la séparation des continents a provoqué la différenciation en plusieurs genres. Après la dernière glaciation (Würm), certaines populations se sont retrouvées isolées pendant que d'autres confirmaient leur caractère migratoire (Baglinière, 1991). Pour certains scientifiques, les salmonidés représentaient des espèces marines qui avaient pénétré en eau douce. Certaines espèces s'y seraient définitivement installées et d'autres seraient devenus migratrices. Pour d'autres chercheurs, il s'agirait de téléostéens d'eau douce (Tchernavin, 1939).

La truite arc-en-ciel est originaire du continent nord-américain. Elle a été introduite dans de nombreux pays à la fin du 19^{ième} siècle, notamment en France en 1874. Les salmonidés sont alors originaires d'une pisciculture installée sur la Mc Cloud river en Californie (MacCrimmon, 1971). Ses températures optimales de vie s'étalent de 7 à 17°C quand des températures supérieures à 22-25°C deviennent létales. Sa maturité sexuelle est atteinte à l'âge de 2 ans pour les mâles et 3 ans pour les femelles. La truite arc-en-ciel est décrite comme étant anadrome non obligatoire.

Après son introduction en France, la culture de la truite arc-en-ciel a subi un très fort développement. Avec une production de 2000 tonnes en 1945 stabilisée entre 40 000 à 50 000 tonnes puis diminuant, depuis le début des années 2000, pour atteindre moins de 35 000 tonnes en 2005, la France est l'un des plus importants producteurs de truite arc-en-ciel dans le monde. Comme cela a été montré chez le saumon atlantique, le taux de croissance des salmonidés est meilleur en eau de mer qu'en eau douce (Saint-Gelais et Larrivee, 1986). Si au bout d'un an la truite arc-en-ciel atteint une taille tout juste commercialisable en eau douce (25 cm), elle peut atteindre plusieurs kilos en eau de mer (Harache et Fauré, 1986). Cette dernière constatation a poussé les Norvégiens à effectuer des tests dans les années 1950, pour finalement débiter l'élevage de truites arc-en-ciel en mer dans le début des années 1970.

D'autres pays ne tardent pas à suivre lorsque cette production en mer paraît constituer une réussite commerciale. La France, l'Irlande, l'Ecosse et le Canada se lancent également dans l'élevage de la truite arc-en-ciel en mer. Mais l'élevage marin a des limites. Durant la saison chaude, les limites physiologiques de l'élevage en mer apparaissent rapidement. La salinité trop élevée ainsi que les fortes températures (l'élevage est dit risqué à partir de 16°C), provoquent des mortalités atteignant 50 à 80 % dans les structures piscicoles (Harache et Bœuf, 1986).

3. Les objectifs

Ce travail de thèse a pour but d'explorer les composantes génétiques et génomiques de la variabilité de capacité d'osmorégulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Nous avons tout d'abord cherché à identifier des gènes candidats fonctionnels de l'acclimatation à un milieu hyperosmotique par une approche transcriptomique différentielle. Cette première approche nous renseignera également sur la cinétique de réponse et les grands groupes fonctionnels de gènes impliqués.

Dans une seconde étape, nous avons cherché à identifier des gènes ou locus gérant la variabilité de capacité d'acclimatation à un milieu hyperosmotique (approche QTL).

Nous avons enfin cherché à affiner les résultats obtenus en caractérisant le mode d'action des QTL détectés par la recherche de régions génomiques régulatrices de l'expression de gènes (approche eQTL).

Ces trois approches complémentaires permettront alors de proposer des gènes candidats impliqués dans la capacité de réponse à un stress osmotique (par leurs polymorphismes positionnels ou leurs niveaux d'expression) tout en décrivant leurs relations potentielles et leur mode de fonctionnement.

L'approche fonctionnelle différentielle, menée en première partie de ce travail de thèse, permettra de proposer des gènes candidats de la réponse à un challenge osmotique chez la truite arc-en-ciel et de déterminer la cinétique de réponse et les processus qui se mettent en place lors de l'acclimatation de ce salmonidé à un environnement hyperosmotique.

La seconde partie de cette étude sera consacrée à la recherche de QTL responsables de la variabilité des capacités osmorégulatoires chez la truite arc-en-ciel. C'est, à notre connaissance, la première fois que des candidats positionnels sont recherchés comme impliqués dans les processus d'acclimatation à un milieu hypersalin chez les téléostéens.

Dans une troisième partie, les résultats obtenus pour atteindre les deux premiers objectifs de ce travail seront précisés et appuyés par la comparaison des résultats obtenus en analyses positionnelles (QTL) et fonctionnelles (transcriptomie différentielle et eQTL). Cette étude présente à notre connaissance, l'application pour la première fois chez un animal d'aquaculture d'une approche de type QTL d'expression.

Chapitre II

Analyse transcriptomique

différentielle

Chapitre II. Analyse transcriptomique différentielle

Une très bonne façon d'identifier des gènes candidats impliqués dans un processus biologique tout en obtenant des informations sur leurs fonctions consiste en l'approche transcriptomique. Elle permet d'étudier l'expression simultanée de milliers de gènes et d'identifier ceux dont la régulation est fonction de conditions biologiques. En particulier, l'approche différentielle permet de détecter les gènes dont les valeurs de rapports d'expression entre plusieurs conditions biologiques différentes sont significativement élevées. Ces approches autorisent ainsi l'identification de nouveaux gènes, de nouvelles fonctions de gènes connus, et de nouveaux mécanismes d'intérêt au vu des traitements appliqués. Ces dernières années, les puces à ADN ont été utilisées avec succès pour étudier la génétique du développement, le fonctionnement des organismes mais également les impacts de pathogènes variés sur de nombreuses espèces modèles comme la drosophile *Drosophila melanogaster* (Furlong *et al.*, 2001), la souris *Mus musculus* (Reecy *et al.*, 2006) ou le poisson zèbre *Danio rerio* (Dahm et Geisler, 2006). Certains organismes modèles comme arabidopsis *Arabidopsis thaliana* (Seki *et al.*, 2001), *Echerichia coli* (Cheung *et al.*, 2003), ou la levure *Sacharomyces cerevisiae* (Hirasawa *et al.*, 2006) ont été particulièrement utilisés pour l'analyse à haut débit de l'expression de gènes lors de la réponse à un stress osmotique. Seules quelques études basées sur l'utilisation des puces à ADN ont été menées pour découvrir l'impact de changements de la salinité de l'environnement sur l'expression de gènes chez le poisson téléostéen (Evans et Somero, 2008 ; Fiol et Kültz, 2005 ; Kalujnaia *et al.*, 2007a ; Kalujnaia *et al.*, 2007b ; Larsen *et al.*, 2008 ; Lima et Kültz, 2004 ; Prunet *et al.*, 2008 ; Seear *et al.*, 2010). Quelques travaux ont déjà été menés avec succès chez la truite arc-en-ciel dans le domaine de la maturation et du développement (Darias *et al.*, 2008 ; Gohin *et al.*, 2010 ; Palstra *et al.*, 2010), du métabolisme (Aluru et Vijayan, 2007) de la réponse à des contaminations chimiques (Finne *et al.*, 2007 ; Hook *et al.*, 2008, 2010a, 2010b ; Walker *et al.*, 2008). Il s'agira ici d'étudier pour la première fois chez *Oncorhynchus mykiss*, la réponse transcriptomique au niveau du principal organe osmorégulateur, la branchie, de truites transférées en eau de mer. Cette étude permettra alors de proposer des candidats fonctionnels de l'acclimatation à un milieu hyperosmotique chez la truite arc-en-ciel et de discuter leurs rôles dans les processus liés à l'osmorégulation.

1. Article transcriptomie différentielle

Cette partie est présentée sous la forme d'un article. Il ne sera pas soumis en l'état à l'appréciation d'éditeurs de revues scientifiques car des expériences supplémentaires, notamment d'hybridation in situ, sont en cours afin d'affiner les résultats obtenus.

Time-course study of gill transcriptome during transfer of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from freshwater to seawater

Article en préparation

Yvan Le Bras^{1§}, Jérôme Montfort², Aurélie Le Cam², Isabelle Leguen¹ and Patrick Prunet¹

¹ INRA, UR 1037 SCRIBE, équipe physiologie de l'adaptation au stress chez les poissons, Rennes, France

² INRA, UR 1037 SCRIBE, plateforme transcriptome, Rennes, France

[§]Corresponding author

Email addresses:

YLB : Yvan.Lebras@rennes.inra.fr

JM : Jerome.Montfort@rennes.inra.fr

ALC : Aurelie.Lecam@rennes.inra.fr

IL : Isabelle.Leguen@rennes.inra.fr

PP: Patrick.Prunet@rennes.inra.fr

Introduction

Euryhaline fish such as the rainbow trout can live in both fresh and seawater. In freshwater, fish are hyperosmotic relative to their external medium. Passive exchange between freshwater and internal medium of the fish results in uptake of water and loss of salt. In seawater, fish are hypotonic relative to the external medium which result in a passive loss of water and uptake of salt. To compensate for these passive exchanges, animals in seawater must regulate their hydromineral balance through an active Na^+ and Cl^- excretion and drinking a lot of water and minimizing water loss by a reduced concentrated urine (Boeuf, 1987; Evans, 2002). Salt excretion occurs mainly in the epithelium of the gill, the major osmoregulatory organ in fish (Evans, 2002). Changes in blood salt composition following osmotic stress induce a cascade of numerous complex physiological reactions in the gill cell which we are just beginning to understand.

Evans (2010) proposes a specific three step hierarchical response after an osmotic stress. In case of a weak and short stress period, osmosensors detecting cell volume changes trigger a direct modification of ionic transport proteins activity, through cytoskeleton proteins (Evans and Somero, 2008; Fiol and Kültz, 2007; Pedersen *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2001). This phenomenon is probably parallel to a weak environmental salinity variation faced by a stenohaline fish. In the case of a more severe osmotic stress (in time and / or intensity), it occurs an amplification of the osmotic stress signal in the cells to initiate a greater response of osmoeffectors (Fiol and Kültz, 2007; Evans, 2010). Finally, if the osmotic disequilibrium persists, large scale adaptive mechanisms act, through osmotic specific transcription factors (Fiol et Kültz, 2005; Lopez-Bojorque *et al.*, 2007) and hormonal regulated signaling pathways (Evans, 2002; McCormick *et al.*, 2008), on the osmoeffector protein abundance as well as on ionocyte differentiation and turnover.

Based on hypothesis-driven approach related to the roles of specific candidate genes or proteins, numerous studies have identified major transporters involved in freshwater or

seawater osmoregulation (see reviews by Evans *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2002; Hwang et Lee, 2007; Marshall *et al.*, 2002). However, several genomic approaches have recently been developed in order to provide new information on the molecular mechanisms involved in sensing, signaling and acting pathways involved in response to salinity changes (Prunet *et al.*, 2008). Thus, Boutet *et al.* (2006) identified 136 cDNAs involved in osmoregulatory mechanism, cell-cycle regulation and immune system in gill and intestine of *Dicentrarchus labrax*. Working on the seawater transfer of freshwater eel, Kalujnaia *et al.* (2007) classified 95 differentially expressed genes from gill, kidney, intestine and brain between different functional groups such as immune system, energy metabolism, detoxification, transport, structural proteins and transcription / translation regulation. Just a few studies have investigated the kinetics of a salinity change response (Fiol and Kültz, 2005; Fiol *et al.*, 2006; Evans and Somero, 2008) but they only looked at early response processes.

In this study we investigate the hyperosmotic transcriptomic response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, an euryhaline model fish, by a 21 days time-course approach. This study will provide information about temporal step of salinity response as well as candidate genes and processes in rainbow trout and thus help to approach the complex osmoregulatory molecular mechanisms in rainbow trout.

Materials and methods

Experimental design

Ninety rainbow trout (INRA delayed-spawning trout line) were raised in freshwater tanks for several weeks. Breeding and challenge tank contains between 300 to 500 liters (fish density approx. 10 g.L⁻¹). Mean weight of the fish is estimated to 100g. Fish were kept at natural photoperiod (14h30 light and 9h30 dark) during the experiment. The challenge consists in a freshwater to seawater (32 PSU) transfer. At each time point, fish were removed from the tank and anesthetized in less than 1 minute in 10mL / 10L phenoxyethanol solution.

For each condition were sampled 2 mL blood (with a seringue in the cuverian vein) and 200 mg gills tissue on 6 fish before and 2, 8, 24, 48, 96 (4 days), 288 (11 days) and 552 (23 days) hours post transfer (PT).

Plasma analysis

Blood was centrifuged (10 min., 2500G, 4°C) and isolated plasma kept at -20°C. Cortisol concentration was determined by radio immunoassay as described by Auperin and Geslin (2008) and chloride using a colorimetric method (chlorides LDM SOBIODA®). Statistical analyses on plasma results were performed using Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, OK). Regarding data, differences between groups were analyzed using non parametric U Mann-Whitney test.

RNA purification, cDNA synthesis

Pieces of gills (near 200 mg), were removed, and total RNA was extracted by the single step guanidium isothiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) using 2mL TRIzol per sample. RNA integrity and concentration were controlled with an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent, Palo Alto, CA).

Microarrays processing. Methods for microarray experiments (cDNA microarrays production, cDNA target preparation, hybridization, signal processing, data analysis, identity of micro-array cDNA clones) were carried out as described in detail by Rescan *et al.* (2007) with a few changes. In brief, nylon micro-arrays (7.6 x 2.6 cm) were obtained from INRA-GADIE resource center (Jouy en Josas, France). This AGENAE nylon membrane contains 9024 distinct rainbow trout cDNA originating from pooled-tissues libraries (Govoroun and Guiguen, 2006) and finally have 9217 spots corresponding to 8345 different annotated contigs.

cDNA were prepared from 5 µg of total RNA of each sample by simultaneous reverse transcription and labelling. The first step of reverse transcription consist in mixing total RNA with 0.3ng of luciferase control RNA and 0.8µg of dT25, followed by a denaturation step at

70°C and annealing step at 42°C. Labelling was done for 2 hours at 42°C in the presence of 30 µCi [alpha-33P] dCTP, 2,4 µM dCTP, 400 µM each dATP, dTTP, dGTP and 200 units Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). RNA was degraded (20 min., 68°C, 0.3% SDS, 15mM µl EDTA and 250mM NaOH), and the remaining cDNA equilibrated at room temperature for 10 min. Neutralization was done by adding 200mM Tris and 0.12N HCL. To block polydT sequences, 2 µg of A80 were added (5 min. 99°C then 1 h at 65°C).

A first hybridization was performed using a 33P-labelled oligonucleotide (TAATACGACTCACTATAGGG) which is at the extremity of each PCR product to determine the amount of cDNA present in each spot. After stripping (3 hours 68°C, 0.1 SSC, 0.2% SDS), arrays were prehybridized (4 hours 65°C in 5x Denhardt's, 5 SSC, 0.5% SDS) and hybridized with denatured labelled cDNAs (48 h 68°C in 5x Denhardt's, 5 SSC, 0.5% SDS). After 3 washes (1 h 68°C, 0.1 SSC, 0.2% SDS), arrays were exposed to phosphor-imaging plates before scanning (FUJI BAS 5000).

Quantitative Polymerase Chain Reactions (Qpcr). For Qpcr, 5 µg of total RNA were reverse transcribed using 200 units of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 250 ng random hexamers (Promega) in a reverse transcription master mix containing 2 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, pH 8.3. Twenty-five units of RNase inhibitor (RNasin, Promega) were added to the reaction. RNA and dNTPs were denatured for 5 min at 65°C, and then chilled on ice before addition of reverse transcription master mix. Reverse transcription was performed at 25°C for 10 min then at 42°C for 50 min followed by a 15-min incubation step at 70°C. Control reactions were run without reverse transcriptase and used as negative controls in the real-time PCR study for all target genes. QPCR was performed on a Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Reverse transcription products were diluted to 2%. Triplicates were used for each sample. Real-time PCR was performed using a

real-time PCR kit provided with a SYBR Green fluorophore (Fast SYBR Green Master Mix, Applied Biosystem). Primer concentrations were 200 nM to 600 nM depending on the target genes (see Table 1 for details). The hot start enzyme was activated 20 seconds at 95°C, then the amplification was carried out using the following cycle: 95°C for 3 sec; 60°C for 30 sec; 40 times. A pool of reverse transcribed RNA was serially diluted and used to calculate a standard curve. For the choice of the housekeeping genes, we first selected several genes with a minimum expression variation between freshwater and seawater fish in the microarray results and 2 frequently used housekeeping genes (ef1 α and 18S). We thus defined 5 potential housekeeping genes (ef1 alpha, 18s, Ribonuclease P protein subunit p21, Serum paraoxonase / arylesterase 2 and proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src). These genes were tested under GeNorm (Vandesomple *et al.*, 2002) which revealed ef1 alpha and proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src to be the best internal standards to normalize the cDNA amount of candidate genes. After amplification, a melt curve was obtained according to the following protocol: 10 sec holding followed by a 0.05°C increase, repeated 80 times, and starting at 55°C. Primer sequences of studied genes are presented in Table 1. The control reactions were used to calculate background expression level for each gene. Statistical analyses on QPCR results were performed using Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, OK). Regarding data, differences between groups were analyzed using non parametric U Mann-Whitney test.

Microarray analyses. Transcriptomic data normalization consists on a centering by membranes creation groups and by sample add to a vector correction. After eliminating data with wrong signal, a final data set with 74 membranes and 7280 clones were kept for statistical analysis (3 to 6 samples by condition and by time). Statistical analysis consists in a time by time and global freshwater versus seawater Significance Analysis of Microarray performed with Sam Microsoft Excel package (SAM, Tusher *et al.*, 2001). To correct for multiple testing and have information concerning false positive findings, we used FDR (False

Discovery Rate) method (Benjamini *et al.*, 2001). Two levels of different stringency were then applied. A first SAM analysis with a FDR fixed to 0% provides us a core of the most significantly differentially expressed genes, from which relevant discussion about biological processes and functions occurring after a salinity transfer can be drawn. A second less stringent analysis with a FDR fixed to 5% will provide us a larger number of genes potentially involved in the hyperosmotic response. This gene set allows us to support some functional findings of the FDR 0 results as well as to investigate more global functional vision by Gene Ontology enrichment analysis.

Clustering using the Bootstrap method on TMev (Tigr MultiExperiment Viewer 4.1) allows us to reveal the existence of important genes groups, characterized by similar expression profiles. We here use this approach on the gene differentially found expressed by the *fd*r 5 SAM analyses. A minimum threshold for the bootstrap value on 90 with more than 2 entities by cluster is fixed.

Initial annotation used in this study is based on the rainbow trout SIGENAE s.om.10 assembly (<http://www.sigenae.org>). This database is based on Uniprot information with best description found in non-mammals and mammals database. Gene ontology was studied by using AMEN software (Chalmel and Priming, 2008) and a more specialized fish annotation described in Rolland *et al.* (2009). Briefly, genes / transcripts corresponding to the EST sequences, provided by [http://www.sigenae.org website](http://www.sigenae.org), of the 9024 clones spotted on the AGENAE microarray were annotated by searching for potential orthologous genes in the genome of sequenced model fish species (*Gasterosteus aculeatus*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes* and *Takifugu rubripes*). Overall, 8197 trout clones were successfully linked to a fish gene with at least 2 EST hits across all 4 genomes leading to the same Ensembl gene or to similar genes encoding proteins belonging to the same family. The 8197 clones finally corresponded to 6661 unique genes. Information from the Ensembl database is used to

associate clones with GeneOntology (GO) terms (the Gene Ontology project, 2008). GO terms associated with corresponding mammalian genes (rat, mouse and human) were also used. Thus, 7065 clones present associated fish genes with mammalian orthologous genes, as predicted by the Ensembl database (Compara, version 52). This strategy permits to annotate 88% of the spotted clones in terms of "biological process", "molecular function" or "cellular component".

Results and Discussion

As a first step in the analysis of our data, we propose to evaluate the physiological impact of the 32PSU osmotic transfer on rainbow trout osmoregulation. To characterize these effects, we have studied the kinetic plasma indicators response as well as the expression profiles of several key genes.

Physiological characterization of the kinetic reaction

The kinetic of the plasma indicator responses as well as the expression profiles of several key genes involved in salinity change response will provide information about the physiological response of rainbow trout to the salinity challenge.

Plasma indicators. Both chloride and cortisol concentrations (Fig. 1) showed significant increase in seawater versus freshwater samples (respectively $p < 0.01$ and $p < 0.01$). Whereas chloride values reveal a higher concentration 24, 48 hours and 23 days PT (respectively $p < 0.05$; $p < 0.01$ and $p < 0.05$), and cortisol levels have a peak at 2 and 48 hours PT in seawater (respectively $p < 0.08$ and $p < 0.05$). After 4 days of challenge, seawater and freshwater transferred trout recovered the same level of both cortisol and chloride concentrations.

In *Oncorhynchus mykiss*, Craig *et al.* (2005) observed a return of plasma osmolality to control value after 14 days in 33PSU seawater whereas Niu *et al.* (2008) and Grosell *et al.* (2007) reported significantly higher chloride values 2 and 3 weeks PT to 33PSU and 23PSU

salinity, respectively. Moreover, Richards *et al.* (2003) showed that plasma osmolality, chloride and sodium levels remain significantly high compared to freshwater fish for 26 PSU saltwater transferred rainbow trout after 15 days. In the present study, plasma chloride levels increased in seawater trout as expected after a saltwater challenge. We observe that these levels decreased from 48h PT to day 4 PT. For respectively 23 and 33 PSU seawater transfer of rainbow trout, Niu *et al.* (2008) and Grosell *et al.* (2007) indicate increase of plasma chloride levels up to 160, 170 mM. Our maximum level (140 mM) is more in agreement with results obtained by Richards *et al.* (2003) studying gradually transferred rainbow trout to 26 PSU salt water. Thus, the observed variation of the plasma chloride levels is here relatively low. This would indicate that trout have suffered from a low hydromineral balance disequilibrium and have recovered within 4 days PT. This may reflect a good acclimation capacity of trout used in this hyperosmotic transfer.

Accordingly, plasma cortisol levels after SW-transfer shown here are relatively low. For non-smolting rainbow trout transferred in 35 PSU salt water, Taylor *et al.* (2007) indicate an increase up to 250 ng.mL⁻¹ 2h PT and a high level of 120 ng.mL⁻¹ 12h PT. Transfer of trout from freshwater to salt water (26PSU to 32PSU) often leads to more important plasmatic values than those observed here (180-250 ng / mL for cortisol and 190mM for chloride (Boeuf, 1987; Tanguy *et al.*, 1994; Orozco *et al.*, 2002)). In this study, fish in seawater had higher cortisol levels at 2h and 48h PT than controls fish in freshwater, arguing the involvement of cortisol in osmoregulation in hyperosmotic environment (Madsen *et al.*, 1995; Redding *et al.*, 1984a, 1984b; Wendelaar Bonga, 1997). McCormick *et al.* (2008) mentioned that an elevation of the plasma cortisol value improved salinity tolerance and is associated with decreasing plasmatic chloride concentration. One hypothesis is that the 48h PT cortisol peak observed here induce the plasma chloride decrease observed after this time point.

The relatively low plasmatic values indicate that the fish had a salinity challenge without any or with a weak and short salinity stress response period in the first hours following the challenge. In order to characterize the physiological hyperosmotic response, we propose then to study the expression profiles of several key genes.

Gene expression of known candidate genes. First, we suggest to study the expression profiles of genes known to be involved in seawater acclimation in rainbow trout and Atlantic salmon. Mackie *et al.* (2007), in *Salmo salar*, suggests that CFTR mRNA levels and NaKATPase activity are the best indicators for evaluating osmoregulative performance. Moreover, Richards *et al.* (2003) indicate different roles of NaKATPase α 1a and NaKATPase α 1b isoforms in freshwater and seawater acclimation in rainbow trout. Accordingly, we show here expression profiles of CFTR, NaKATPase α 1a and NaKATPase α 1b by Qpcr (Fig. 2).

Both CFTR and Na⁺/K⁺-ATPase α 1b increased in seawater compared to freshwater after 8 hours PT and return under 1.5 fold over the FW transferred group after 11 days. Na⁺/K⁺-ATPase α 1a decreased in seawater compared to freshwater after 2 hours. Relative expression of CFTR and NKA subunits are in accordance with described salinity challenges in the literature (Richards *et al.*, 2003). Moreover, expression kinetics propose here that disturbance in the gene expression begins near 8 hours PT (Na⁺/K⁺-ATPase α 1a) and is accompanied by acclimation processes which occur until at least four days (CFTR, Na⁺/K⁺-ATPase α 1b).

Plasma indicators levels suggest that osmotic stress in this experiment was quite low. In order to understand if there is a hyperosmotic stress at cellular level in gill tissue, we analyzed the differential expression between seawater and freshwater of several genes known to be potential osmotic stress response genes. This includes the following genes aldose reductase, DNA-PK, PKA (Kültz, 2005); GADD45, ATMk (Kültz, 2001); enolase alpha, gelsolin,

Apolipoprotein D precursor, Annexin A11, Bone morphogenetic protein, TRPV4 or Aquaporin 4 (Fiol *et al.*, 2006). The expression of some of these genes is illustrated in Figure 3. The results show that there is no significant differences between freshwater and seawater transcript levels for all the considered genes, especially for the early sampling time-points (2h, 8h and 24h PT). This suggests that the early osmotic stress response mechanisms described by Fiol *et al.* (2006) have not occurred in our transfer experiment.

In a second step, we will analyze the microarray results and search for genes differential expression between freshwater- and seawater-transferred trout.

Differential transcriptomic study

We have determined the genes which are differentially expressed between freshwater and seawater, we will present analysis of these data by discussing i) first key genes which similar expression profiles ii) second the list of genes significantly different at each time points of our time-course study and their biological functions.

SAM results. A Significance Analysis of Microarray (SAM) was used to determine differentially expressed genes between samples from freshwater and seawater in a time by time analysis. Thus, using a FDR correction of 5% then 0%, this analysis allows us to determine respectively 249 and 39 unique transcripts differentially expressed between the 2 conditions (table 2). The first set of 249 genes is used to find significant clusters.

Clustering analysis

In this experiment, clustering analyses of the $fdr = 5$ results reveal 2 interesting gene groups (Fig. 4) that have very similar expression profiles. The first cluster is composed of a group of 3 genes founded differentially expressed mainly in long time PT. It will be discussed in a next paragraph about the long time differentially expressed genes. The second cluster consists also of a group of 3 genes corresponding to the three best candidates genes regarding

to their p-value in the SAM results. We thus observe upregulation of Cytochrome P450 1A3 (CYP1A3) at each time point from 8 hours PT to 23 days, sulfotransferase 2 (SULT2) at the same time points except at 2 days PT and sulfotransferase 3 (SULT3) from 4 to 23 days PT.

CYP1A is an isoform involved in biotransformation enzyme (Buhler and Wang-Buhler, 1998; Rifkind, 2006; Stegeman and Hahn, 1993). It acts through detoxification and often bioactivation of common environmental pollutant. Leguen *et al.* (2010) suggests that CYP1A could be involved in seawater acclimation of rainbow trout at the gill level. This finding allows our lab to investigate the gill expression localization of CYP1A and its role in the acclimation processes of Rainbow trout during seawater acclimation (Leguen *et al.*, 2010). We thus showed by gene expression, immunolocalization and enzyme activity analysis, that acclimation of rainbow trout to an hyperosmotic environment is associated with an upregulation of CYP1A. In the same way, Evans and Somero (2008) identified an increase in CYP1A1 gene expression in gill of *Gillichthys mirabilis* in a 70 PSU against a 35 PSU environment. In their paper, Leguen *et al.* (2010) suggested that the up-regulation of CYP1A gene expression could be linked to remodelling of the gill epithelium and to the gill function through retinoic acid or arachidonic acid metabolism. They conclude that this question deserves further study.

Sulfotransferases are involved in xenobiotic detoxification as well as biotransformation of endogens compound such as steroids and iodothyronines (Falany *et al.*, 1998). Sugahara *et al.* (2003) show that in zebrafish, sulfotransferases display different affinity for thyroid hormones. Moreover, sulfotransferases are suggested to be involved in the peripheral metabolism of thyroid hormones (TH) in *sparus auratus* exposed to low salinity (Klaren *et al.*, 2007). These authors have shown that salinity changes modify several enzyme activities related to this TH metabolism in tissues such as liver, kidney or gill: This include deiodase activity, conjugaison (which includes sulfotransferase, UDP-glucuronyltransferase) and

deconjugaison activities (arylsulfatase, b-glucuronidase). These authors mentioned a significant elevation of sulfotransferase activities in kidney and liver following salinity changes but not in the gill. These studies indicate that sulfotransferase is involved in thyroid hormones metabolism but, involvement of sulfotransferase in such process at the level of gill still need to be clarified and the implication of thyroid hormones in osmoregulation has never been clearly defined or validated.

If the relation between CYP1A and sulfotransferase is not clear, several studies mentioned it. Thus Yanagiba *et al.* (2009) show that Octachlorostyrene (OCS) regulates CYP1A via AHR and control Sulfotransferase1A (SULT1A) via Constitutive Androstane Receptor (CAR). Lie *et al.* (2009a) presented too that gene coding for the detoxification enzymes CYP1A and Sulfotransferase 2 were up regulated in *Gadus Moruha* exposed to different concentrations of pollutants mixtures. Another work of Lie *et al.* (2009b) showed increase of CYP1A and sulfotransferase1 after a xenobiotic exposure. On the contrary, Thibault *et al.* (2006) and Debusk *et al.* (2000) found independent regulation of CYP1A and sulfotransferase to xenobiotic compounds. These data may suggest that CYP1A and sulfotransferase can be co-regulated and involved in several similar processes like on hypo- and hyperosmotic environment acclimation.

Finally, regarding the plateau of the expression profiles between 4 days and 23 days PT (with a fold change near 2 between seawater and freshwater) for CYP1, SULT2 and SULT3, we can think that these enzymes are continuously over-expressed in seawater. Indeed, when the others parameters, chloride concentrations and CFTR mRNA expression, may indicate the end of the acclimation process between 4 and 11 days PT, CYP1A, SULT2 and SULT3 mRNA levels are still different 23 days PT between the two different environments. These findings suggest that these genes are involved in osmoregulation in hyperosmotic environment.

24 hours PT, an important time point.

Results obtained by a time by time SAM analysis with a FDR of 0 are illustrated in Figure 5. 24 hours PT appear to be a very interesting time point because of the relative high number of gene over- and under- expressed. Thus, 22 of the 39 unique genes found differentially expressed with a *fdr* of 0 are found at this time point. Gene Ontology enrichment studies on 210 genes differentially expressed between freshwater and seawater obtained with a FDR lower than 5% at 24h PT reveal that the most important biological processes or molecular functions over-represented were mainly implied in transport, binding, organ development and response to stimulus (Fig. 6).

A first attempt to classify the 22 genes identified as robust differentially expressed genes (*fdr* = 0) at 24h PT lead us to gather them into 4 main groups; This include protein metabolism; proliferation and apoptosis processes; ionic homeostasis; receptors, ligands and hormones. Some genes with a significance level of 5% are used here to give more weight of functional findings. Table 3 summarizes the gene composition of the 4 main functional groups and Figure 7 presents fold change mRNA relative abundance of some candidate genes tested by RT-PCRq.

-Protein metabolism-

Genes identified as differentially expressed in the case of different stress conditions as hypoxia (Ton *et al.*, 2003), low temperature exposition (Gracey *et al.*, 2004), pollutant exposure (Koskinen *et al.*, 2004) or divergent salinity (Kalujnaya *et al.*, 2007) are often related with the protein metabolism in different fish organs.

A first group of 3 Heat Shock Proteins, involved in protein metabolism including repair, biosynthetic and catabolism processes, consists in genes having a key role as molecular chaperones. They are identified to play a role in stress response and are responsible for regulation of protein folding, translocation, secretion and also catabolism. They act in binding

proteins and transporting them in the cell. The 3 HSP corresponding to HSP90-beta, GRP78 and HSP60 are overexpressed at 24h following the salinity transfer and belong to a very conserved protein family (Padmini and Rani, 2009). HSP90-beta and GRP78 are mentioned to be involved in cellular stress response in rainbow trout (Ojima *et al.*, 2005). Recent work of Choi and An (2008) shows an over-expression of HSP90 mRNA after a hypoosmotic stress in *Acanthopagrus schlegelii* when Sathiyaa *et al.* (2001) mentioned a regulation of HSP90 mRNA level by cortisol in trout hepatocyte in primary culture exposed to temperature stress. Increase of GRP78 gene expression following heat shock has also been observed in various tissues from rainbow trout or cod (Hori *et al.*, 2010; Ojima *et al.*, 2005). Finally, analysing HSP protein levels in trout exposed to acidosis stress or temperature shock, Martin *et al.* (1998) suggested that HSP70, HSP60 and others HSP could be involved in acidosis resistance.

These results show that these 3 HSP are stress responding proteins. If Grp78 and HSP90 are under control of osmosignalling transduction actors (Ca^{2+} intracellular content and cortisol), it is not surprising to detect their increased expression in seawater after hyperosmotic stress. Concerning HSP60, it can be associated with cellular respiratory processes or / and acid / base regulation.

A second set of genes is involved in protein synthesis. Thus, several genes are involved in protein translation: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, two elongation factors (Elongation factor 1-delta, Elongation factor 2), several ribosome proteins (60S ribosomal protein L12, 40S ribosomal protein S3, 28S ribosomal protein S18a) and a protein involved in tRNA maturation (tRNA guanosine-2'-O-methyltransferase TRM11) are up-regulated. Two others eukaryotic translation initiation factor are down regulated (Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3, Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3). Eukaryotic translation initiation factors (eIF) are involved in translation initiation

and act through capped mRNA recognition and stimulate the recruitment of mRNA by the ribosome. They thus are involved in translation initiation, a step representing the most important target of translational control (Gingras *et al.*, 1999). Elongation factor 2 (EF2) plays a role in the early development of embryos in the *Danio rerio* (Zhang *et al.*, 2008). By similarity, it seems to be involved in protein biosynthesis (Jurss *et al.*, 1992) and acts by binding ribosomes.

A last set of genes involved in protein turnover consists of 5 proteolysis related proteins. The first one, NEDD8-conjugating enzyme Ubc12, regulates Cullin RING ligases (CRLs) function (Pan *et al.*, 2004) which mediates ubiquitination of thousands of different targets in regulation of various processes. Thus, NEDD8 enhances cell ubiquitination whereas NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 is an inhibitor of Cullin neddylation (Chew *et al.*, 2007). Connected to this process, we also observed an up-regulation of Cullin-9 gene expression in the present study. One could also note that Ceremuga *et al.* (2003) studied expression of another cullin protein (cullin-5) in brain of rat exposed to osmotic stress and suggested that this protein may have a role in protein regulation (through proteasome mediated degradation) under conditions of osmotic stress. Three other genes, playing a role in cytoplasmic protein degradation processes, ubiquitin-protein ligase E3A and ubiquitin conjugation factors E2D2 and E4A, were found differentially expressed here. We also observed an up-regulation of a gene, an ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (FAF-X) which has been shown in mammals to be involved in the prevention of protein degradation through the removal of conjugated ubiquitin. This suggests in our study the possibility of complex regulation between ubiquitination and deubiquitinase activity in response to osmotic shock. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is a major route of protein degradation in mammals. In our study, increased expression of HSP60, HSP90, RN126, Ubiquitin protein ligase and other ubiquitin conjugation factor and carboxyl terminal hydrolase indicate here the existence of

significant changes in protein metabolism at 24h PT. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is a major route of protein degradation in mammals. Ubiquitination define the binding of several ubiquitin molecules to proteins by a multienzymatic system composed by three different enzymes: the ubiquitin-activating enzyme (E1), the ubiquitin-activating enzyme (E2) and the ubiquitin-ligating enzyme (E3). This ubiquitination step is essential for transporting proteins targeted for degradation by the 26S proteasome (Ciechanover *et al.*, 2000). These different mechanisms are described to play a key role in proteolysis and cell cycle regulation. Altogether, the present gene expression data analyzed in regards to the literature may be indicate that the system of protein degradation through different degradation mechanisms associated with ubiquitination or neddylation may be involved in the tissue responses to osmotic stress in fish and in other vertebrates.

-Developmental processes-

Freshwater and seawater gill epithelium morphology and function are very different. Thus, during acclimation to seawater, gill change occurred via apoptosis, proliferation and differentiation processes. In this study, we mentioned some main differentially expressed genes potentially involved in these processes. Two genes known to be involved in the regulation of cell cycle and DNA replication were identified in the first group. They consist of WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1 (WDHD1) and Origin recognition complex subunit 2 (ORC2) (Landis *et al.*, 1997). One Other gene, the centrosomal protein of 78 KDa, also possibly involved in microtubule organization and cell cycle progression, are found under-expressed in seawater 24 hours PT.

These results indicate that regulation of transcription which is linked to the regulation of cell cycle may be important for differentiation and proliferation in the gill epithelium response to salinity stress.

A second set of genes, involved in both apoptosis and anti-apoptotic events, plays a role in developmental process. To change osmoregulation function (absorption in freshwater to secretion in seawater), some gill cells have to be maintained and others have to be discarded. We found one gene potentially involved in apoptosis processes due to his down-regulation after seawater transfer: Tp53-regulated inhibitor of apoptosis 1 (TRIAP1). This gene is involved in the mediation of cell survival by prevent apoptosis induction by inhibition of caspase9 activation (Uniprot definition). Two anti-apoptotic genes were also found up-regulated: Histone acetyltransferase KAT5 which is involved in DNA repair and reduced apoptosis (Gomez *et al.*, 2008) and Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B, up-regulated at 24h.

The present data suggest that apoptosis processes regulation might be important during seawater acclimation initiation.

-Ionic homeostasis-

One of the well known processes in salinity stress response revolves around characterization of osmoeffectors and their function in freshwater or saltwater transferred fish. Indeed, maintainance of intracellular and systemic physiological osmotic values is finally ensured by ionic transmembrane and transepithelial transport. In this study, 7 transcripts, corresponding to 6 unique gene annotations are directly involved in ionic transport. The most important are the two Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1$ isoforms namely Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1a$ (ATP1a1a) and Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1b$ (ATP1a1b). The first one is found downregulated 24 hours post transfer, while the second is upregulated from 4 days to 23 days PT. This kind of differential expression of Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1$ isoforms during salinity acclimation is often mentioned in literature (Hiroi and McCormick, 2007; Madsen *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2003; Tang et Lee, 2007; Tse *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). A sodium / proton exchange regulatory cofactor NHE-RF3 (PDZK1) is found over-expressed in seawater 24 hours and under-

expressed 48 hours PT. While Edwards *et al.* (1999) confirmed the presence and involvement of NHE exchanger in gill epithelium acid / base regulation, Wilson *et al.* (2000) did not find NHE in rainbow trout gill cell by immunological approach. Its role in the osmoregulation process is debated (Evans, 2008) and seems to depend on the species as well as on environmental conditions. The expression profile of this candidate gene implies a transient regulation of NHE function near the 24 hour time. Another gene known to be involved in acid / base regulation in gill epithelium with different functions in fresh- and salt-water is the Sodium / bicarbonate cotransporter (Parks *et al.*, 2007, Perry *et al.*, 2003). We identified here an Electrogenic $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ cotransporter 1 (SLC4A4) under expressed in seawater 24 hours and 11 days post transfer. One gene involved in chloride transport, H^+ / Cl^- exchange transporter 5 (CLCN5), is found under-expressed. We can also mentioned that up-regulation of Claudin-11 (CLDN11) transcript, corresponding to a tight junction protein, illustrate the difference of ionic and water permeability of the epithelia between freshwater and seawater trouts (Tipsmark *et al.*, 2008).

-Receptor, ligands and hormones-

Regulation of gill functions by endocrine or autocrine factors have been shown to be important (review by Evans *et al.* 2005). In this study, several hormone or related hormone genes expression are discovered as differentially expressed: This include Growth Hormone 2 (GH2), cytosolic thyroid hormone binding protein (CTHBP) or Thyrotropin releasing-hormone (TRH). It is interesting to note that these data suggest a local synthesis of GH which is known to be normally synthesized and release by pituitary gland. Whether such local synthesis really exist and has physiological role would deserve further studies. In any case, previous studies showed that GH, through a rapid increase of its plasma concentration and turnover, act on seawater acclimation with a synergistic effect of IGF-1 (Sakamoto *et al.*, 1993). In the same experience, they underline, *in vivo*, the existing links between GH

concentration, NKA activity increase, mitochondrial rich cells proliferation and cortisol secretion. Type-2 Angiotensin II receptor (AGTR2) is also another gene related to endocrine control of osmoregulation which has been shown to be up-regulated after transfer to high salinity. Although these receptors have been already observed in gill tissue, the exact role of ANG-2 is still debated and this hormone appears as a putative agent controlling gill transport in fishes (Evans, 2002). Two other genes encoding for Prostaglandin G/H synthase 1 (Cox-1) and Prostaglandin E synthase 2 (PTGES2) appear to be up-regulated in the gills upon transfer of trout to seawater. Studies in fish have shown that prostaglandin may be acting as an endothelium-derived relaxing factor which regulates vascular resistance (Evans and Gunderson, 1998). Whether such effects do occur following salinity exposure in trout gill would deserve further studies. Along this regulation of vascular tonus, it is also interesting to observe the down-regulation of neuromedin-U receptor (NMUR1). Among various biological actions, this neuropeptide has been shown to regulate blood flow and blood pressure in mammals (Budhiraja and Chugh, 2009). Whether such regulation also exist in fish would deserve further studies.

Short time versus long time PT.

As mentioned before, most of the candidate genes are differentially expressed 24 hours PT. Thus, if we look at other time points, only five genes are differentially expressed with a FDR of 0 before 24h PT and 18 after 4 days PT.

At long time PT (after 24h), we obtained 18 interesting genes. A first group of three ionic transport proteins underline the importance of differential ionic exchange in the gill cells between fresh and sea water fish. The mRNA levels are down-regulate in seawater for chloride channel protein 2 and Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1a$ when we observe an up-regulation of the Na^+ / K^+ ATPase $\alpha 1b$ subunit.

A set of 4 genes related to cell damages and protein biosynthetic processes seems to confirmed differences of cell turnover and intracellular transport. Thus, in seawater are over-expressed a putative adenosylhomocysteinase 3 (AdoHcyase 3) involved in adenosine-induced apoptosis (Hermes *et al.*, 2008), a predicted protein c5orf24 homolog (Phosphorylated upon DNA damage) and 2 intracellular transport proteins. These two proteins are ras-related protein (Rab19), a key regulator of intracellular transport in eukaryotic cells (Lutcke *et al.*, 1995), and exportin 1-like (CRM1 like), an essential mediator of nuclear protein export (Stade *et al.*, 1997).

Several oxygen transporters such as Hemoglobin subunit coding genes (Hemoglobin subunit beta 1 (HBB1), 2 (HBB2) as 4 (HBB4) and Hemoglobin subunit alpha 4 (HBA4)) and one enzyme involved in energetic processes during cell respiration (cytochrome c oxydase VIa) are found over-expressed here in seawater from 48h to 23 days. Interestingly, clustering results (Fig. 4) gathering two haemoglobin subunits (HBA1 and HBB4) and an Ubiquitin-conjugating enzyme (Ubiquitin conjugating-enzyme E2 D2) indicating a possible co-regulation of the protein-degradation processes and oxygen delivery. Moreover, two hemoglobin potential linked protein coding genes are found. The first one consist on an ARL-6 (ADP-ribosylation factor-like protein 6 interacting protein 1), known to play a role in protein transport, membrane trafficking and cell signaling notably during hematopoietic maturation, and is also found differentially over-expressed at 23 days. The second is Serine protease 27 (Prss27), identified as under-expressed 48 hours PT. It belongs to a protease group acting by proteolysis and involved in blood clotting, immune system, inflammation, cell death or tissue remodelling (Ashton-Rickardt, 2010).

Surprisingly, 2 venom-related genes are found differentially expressed at 11 days PT. Toxin-1, characterize recently in trout (Georgaka *et al.*, 2007), under-expressed in seawater,

and cysteine-rich secretory protein (CRVP1), over-expressed. These two molecules are mentioned to be potential ionic / calcium channel inhibitors. It will be important to explore the role of these genes in seawater acclimation.

Conclusion

The use of microarray technology permits us to scan in an objective and fast way, some of the biological processes involved in osmoregulation related processes and functions. One first result in this study concern the fact that in our experiment, our trout line seems to been able to withstand easily salinity changes. The second important point is the fact that the major part of the differentially expressed genes are found at 24 hours PT. Kinetic results show that response to seawater challenge by rainbow trout begin here between 2 and 8 hours PT by a gene expression disturbance initiation, disturbance maximum at 24h PT, which correspond to the time of acclimation processes initiation. This acclimation initiation takes place through protein biosynthetic processes regulation, developmental processes, ionic homeostasis and endocrine signaling pathway activation. After 24h, we observed candidate genes expression differences between freshwater and seawater fish in several biological functions such as ionic transport, cell turnover, intracellular transport, and oxygen transport. Analysis of the data from this experiment allows us to propose or confirm several genes involved in the hyperosmotic acclimation and acclimation processes in fish. These processes are involved in energy management, ionic transport, or cellular changes. Finally, this study proposes new insight for the salinity change acclimation and adaption processes in terms of putative osmoeffectors (NHE-RF3, $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$, H^+ / Cl^- , Chloride channel protein 2), and robust candidates (CYP1A, sulfotransferases, toxin1, ENH1) in rainbow trout.

References

- Ashton-Rickardt PG: **Serine protease inhibitors and cytotoxic T lymphocytes.** *Immunol Rev* 2010, **235**: 147-158.
- Auperin B, Geslin M: **Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content.** *Gen Comp Endocrinol* 2008, **158**: 234-239.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: **Controlling the false discovery rate in behavior genetics research.** *Behav Brain Res* 2001, **125**: 279-284.
- Boeuf G. **Bases physiologiques de la salmoniculture : osmorégulation et adaptation à l'eau de mer.** La pisciculture française 87, 28-39. 1987.
- Boutet I, Ky CLL, Bonhomme F: **A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*.** *Gene* 2006, **379**: 40-50.
- Budhiraja S, Chugh A: **Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential.** *Fundam Clin Pharmacol* 2009, **23**: 149-157.
- Buhler DR, Wang-Buhler JL: **Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring.** *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998, **121**: 107-137.
- Ceremuga TE, Yao XL, Xia Y, Mukherjee D, McCabe JT: **Osmotic stress increases cullin-5 (cul-5) mRNA in the rat cerebral cortex, hypothalamus and kidney.** *Neurosci Res* 2003, **45**: 305-311.
- Chalmel F, Primig M: **The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**: 86.
- Chew EH, Poobalasingam T, Hawkey CJ, Hagen T: **Characterization of cullin-based E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells--evidence for cullin dimerization.** *Cell Signal* 2007, **19**: 1071-1080.
- Choi CY, An KW: **Cloning and expression of Na⁺/K⁺-ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress.** *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2008, **149**: 91-100.
- Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**: 156-159.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL: **The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications.** *J Cell Biochem Suppl* 2000, **34**: 40-51.

Craig PM, Al-Timimi H, Bernier NJ: **Differential increase in forebrain and caudal neurosecretory system corticotropin-releasing factor and urotensin I gene expression associated with seawater transfer in rainbow trout.** *Endocrinology* 2005, **146**: 3851-3860.

Debusk BC, Chimote SS, Rimoldi JM, Schenk D: **Effect of the dietary brominated phenol, lanasol, on chemical biotransformation enzymes in the gumboot chiton *Cryptochiton stelleri* (Middendorf, 1846).** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000, **127**: 133-142.

Edwards SL, Tse CM, Toop T: **Immunolocalisation of NHE3-like immunoreactivity in the gills of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the blue-throated wrasse (*Pseudolabrus tetrus*).** *J Anat* 1999, **195 (Pt 3)**: 465-469.

Evans DH: **Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium.** *J Exp Zool* 2002, **293**: 336-347.

Evans DH, Gunderson MP: **A prostaglandin, not NO, mediates endothelium-dependent dilation in ventral aorta of shark (*Squalus acanthias*).** *Am J Physiol* 1998, **274**: R1050-R1057.

Evans DH, Piermarini PM, Choe KP: **The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste.** *Physiol Rev* 2005, **85**: 97-177.

Evans DH: **Teleost Fish Osmoregulation: What have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys?** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 90337.

Evans TG, Somero GN: **A microarray-based transcriptomic time-course of hyper- and hypo-osmotic stress signaling events in the euryhaline fish *Gillichthys mirabilis*: osmosensors to effectors.** *J Exp Biol* 2008, **211**: 3636-3649.

Evans TG: **Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes.** *Journal of Fish Biology* 2010, **76**: 1903-1925.

Falany JL, Azziz R, Falany CN: **Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium.** *Chem Biol Interact* 1998, **109**: 329-339.

Fiol DF, Kultz D: **Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**: 927-932.

Fiol DF, Kultz D: **Osmotic stress sensing and signaling in fishes.** *Febs Journal* 2007, **274**: 5790-5798.

Fiol DF, Chan SY, Kultz D: **Identification and pathway analysis of immediate hyperosmotic stress responsive molecular mechanisms in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2006, **1**: 344-356.

Georgaka E, Nastopoulos V, Eleftheriou S, Zarkadis IK: **A toxin-like gene in rainbow trout: Cloning, expression, and gene organization.** *Toxicon* 2007, **49**: 1002-1009.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N: **eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation.** *Annual Review of Biochemistry* 1999, **68**: 913-963.

Gomez EB, Nugent RL, Laria S, Forsburg SL: **Schizosaccharomyces pombe histone acetyltransferase Mst1 (KAT5) is an essential protein required for damage response and chromosome segregation.** *Genetics* 2008, **179**: 757-771.

Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y: **Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries.** *BMC Genomics* 2006, **7**: 196.

Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J *et al.*: **Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 16970-16975.

Grosell M, Gilmour KM, Perry SF: **Intestinal carbonic anhydrase, bicarbonate, and proton carriers play a role in the acclimation of rainbow trout to seawater.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **293**: R2099-R2111.

Hermes M, Osswald H, Riehle R, Piesch C, Kloor D: **S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Overexpression in HEK-293 Cells: Effect on Intracellular Adenosine Levels, Cell Viability, and DNA Methylation.** *Cellular Physiology and Biochemistry* 2008, **22**: 223-236.

Hiroi J, McCormick SD: **Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*.** *J Exp Biol* 2007, **210**: 1015-1024.

Hoffmann EK, Hoffmann E, Lang F, Zadunaisky JA: **Control of Cl⁻ transport in the operculum epithelium of *Fundulus heteroclitus*: long- and short-term salinity adaptation.** *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2002, **1566**: 129-139.

Hori TS, Gamperl AK, Afonso LO, Johnson SC, Hubert S, Kimball J *et al.*: **Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques.** *BMC Genomics* 2010, **11**: 72.

Hwang PP, Lee TH: **New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **148**: 479-497.

Jurss K, Junghahn I, Bastrop R: **The role of elongation factors in protein synthesis rate variation in white teleost muscle.** *J Comp Physiol B* 1992, **162**: 345-350.

Kalujnaia S, McWilliam IS, Zaguinaiko VA, Feilen AL, Nicholson J, Hazon N *et al.*: **Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*.** *Physiol Genomics* 2007, **31**: 385-401.

Kaufman RJ: **Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls.** *Genes Dev* 1999, **13**: 1211-1233.

Klaren PHM, Guzman JM, Reutelingsperger SJ, Mancera JM, Flik G: **Low salinity acclimation and thyroid hormone metabolizing enzymes in gilthead seabream (*Sparus auratus*).** *General and Comparative Endocrinology* 2007, **152**: 215-222.

Koskinen H, Krasnov A, Rexroad C, Gorodilov Y, Afanasyev S, Molsa H: **The 14-3-3 proteins in the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *J Exp Biol* 2004, **207**: 3361-3368.

Kultz D: **Cellular osmoregulation: beyond ion transport and cell volume.** *Zoology (Jena)* 2001, **104**: 198-208.

Kultz D: **DNA damage signals facilitate osmotic stress adaptation.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2005, **289**: F504-F505.

Landis G, Kelley R, Spradling AC, Tower J: **The k43 gene, required for chorion gene amplification and diploid cell chromosome replication, encodes the Drosophila homolog of yeast origin recognition complex subunit 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 3888-3892.

Leguen I, Odjo N, Le Bras Y, Luthringer B, Baron D, Monod G *et al.*: **Effect of seawater transfer on CYP1A gene expression in rainbow trout gills.** *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 2010, **156**: 211-217.

Lie KK, Meier S, Olsvik PA: **Effects of environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production on Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009, **150**: 141-149.

Lie KK, Lanzen A, Breilid H, Olsvik PA: **Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray.** *Environ Toxicol Chem* 2009, **28**: 1711-1721.

Lopez-Bojorquez L, Villalobos P, Garcia G, Orozco A, Valverde R: **Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (FhDio2).** *J Exp Biol* 2007, **210**: 3126-3132.

Lutcke A, Olkkonen VM, Dupree P, Lutcke H, Simons K, Zerial M: **Isolation of a murine cDNA clone encoding Rab 19, a novel tissue-specific small GTPase.** *Gene* 1995, **155**: 257-260.

Mackie PM, Gharbi K, Ballantyne JS, McCormick SD, Wright PA: **Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR gill expression after seawater transfer in smolts (0+) of different Atlantic salmon (*Salmo salar*) families.** *Aquaculture* 2007, **272**: 625-635.

Madsen SS, Kiilerich P, Tipsmark CK: **Multiplicity of expression of Na⁺,K⁺-ATPase {alpha}-subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change.** *J Exp Biol* 2009, **212**: 78-88.

Madsen SS, Jensen MK, Nhr J, Kristiansen K: **Expression of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1995, **269**: R1339-R1345.

Marshall WS, Lynch EM, Cozzi RR: **Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water.** *J Exp Biol* 2002, **205**: 1265-1273.

Martin M, Hernandez C, Bodega G, Suarez I, Boyano MC, Fernandez B: **Heat-shock proteins expression in fish central nervous system and its possible relation with water acidosis resistance.** *Neurosci Res* 1998, **31**: 97-106.

McCormick SD, Regish A, O'Dea MF, Shrimpton JM: **Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon.** *General and Comparative Endocrinology* 2008, **157**: 35-40.

Niu CJ, Rummer JL, Brauner CJ, Schulte PM: **Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008, **148**: 437-444.

Ojima N, Yamashita M, Watabe S: **Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **329**: 51-57.

Orozco A, Villalobos P, Valverde R: **Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver, kidney and gill in the rainbow trout.** *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2002, **131**: 387-395.

Padmini E, Rani MU: **Seasonal influence on heat shock protein 90 alpha and heat shock factor 1 expression during oxidative stress in fish hepatocytes from polluted estuary.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2009, **372**: 1-8.

Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K: **Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction.** *Oncogene* 0 AD 2004, **23**: 1985-1997.

Parks SK, Tresguerres M, Goss GG: **Interactions between Na⁺ channels and Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: a model for transepithelial Na⁺ uptake.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**: C935-C944.

Pedersen SF, Mills JW, Hoffmann EK: **Role of the F-actin Cytoskeleton in the RVD and RVI Processes in Ehrlich Ascites Tumor Cells.** *Experimental Cell Research* 1999, **252**: 63-74.

Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW: **The cytoskeleton and cell volume regulation.** *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2001, **130**: 385-399.

Perry SF, Furimsky M, Bayaa M, Georgalis T, Shahsavarani A, Nickerson JG *et al.*: **Integrated responses of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters and V-type H⁺-ATPases in the fish gill and kidney during respiratory acidosis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003, **1618**: 175-184.

Prunet P, Cairns MT, Winberg S, Pottinger TG: **Functional Genomics of Stress Responses in Fish.** *Reviews in Fisheries Science* 2008, **16**: 157-166.

Redding JM, Schreck CB, Birks EK, Ewing RD: **Cortisol and its effects on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in fresh water and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.** *Gen Comp Endocrinol* 1984, **56**: 146-155.

Redding JM, Patino R, Schreck CB: **Clearance of corticosteroids in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh water and seawater and after stress.** *Gen Comp Endocrinol* 1984, **54**: 433-443.

Rescan PY, Montfort J, Ralliere C, Le CA, Esquerre D, Hugot K: **Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule.** *BMC Genomics* 2007, **8**: 438.

Richards JG, Semple JW, Bystriansky JS, Schulte PM: **Na⁺/K⁺-ATPase alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer.** *J Exp Biol* 2003, **206**: 4475-4486.

Rifkind AB: **CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates.** *Drug Metab Rev* 2006, **38**: 291-335.

Rolland A, Lareyre JJ, Goupil AS, Montfort J, Ricordel MJ, Esquerre D *et al.*: **Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis.** *BMC Genomics* 2009, **10**: 546.

Sakamoto T, McCormick SD, Hirano T: **Osmoregulatory Actions of Growth-Hormone and Its Mode of Action in Salmonids - A Review.** *Fish Physiology and Biochemistry* 1993, **11**: 155-164.

Sathiyaa R, Campbell T, Vijayan MM: **Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001, **129**: 679-685.

Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K: **Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor.** *Cell* 1997, **90**: 1041-1050.

Stegeman JJ, Hahn ME, Weisbrod R, Woodin BR, Joy JS, Najibi S *et al.*: **Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells.** *Mol Pharmacol* 1995, **47**: 296-306.

Sugahara T, Liu CC, Carter G, Govind PT, Liu MC: **cDNA cloning, expression, and functional characterization of a zebrafish SULT1 cytosolic sulfotransferase.** *Arch Biochem Biophys* 2003, **414**: 67-73.

Tang CH, Lee TH: **The effect of environmental salinity on the protein expression of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **147**: 521-528.

Tanguy JM, Ombredane D, Bagliniere JL, Prunet P: **Aspects of Parr Smolt Transformation in Anadromous and Resident Forms of Brown Trout (*Salmo-Trutta*) in Comparison with Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*).** *Aquaculture* 1994, **121**: 51-63.

Taylor JF, Needham MP, North BP, Morgan A, Thompson K, Migaud H: **The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout.** *General and Comparative Endocrinology* 2007, **152**: 314-325.

The Gene Ontology project in 2008: *Nucleic Acids Res* 2008.

Thibaut R, Schnell S, Porte C: **The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an in-vitro study.** *Environ Sci Technol* 2006, **40**: 5154-5160.

Ton C, Stamatiou D, Liew CC: **Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development.** *Physiol Genomics* 2003, **13**: 97-106.

Tse WK, Au DW, Wong CK: **Effect of osmotic shrinkage and hormones on the expression of Na⁺/H⁺ exchanger-1, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺ -ATPase in gill pavement cells of freshwater adapted Japanese eel, *Anguilla japonica*.** *J Exp Biol* 2007, **210**: 2113-2120.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**: 5116-5121.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD *et al.*: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**: research0034.

Wendelaar Bonga SE: **The stress response in fish.** *Physiol Rev* 1997, **77**: 591-625.

Wilson JM, Laurent P, Tufts BL, Benos DJ, Donowitz M, Vogl AW *et al.*: **NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization.** *J Exp Biol* 2000, **203**: 2279-2296.

Wilson J, Leitúo A, Gonçalves A, Ferreira C, Reis-Santos P, Fonseca AV *et al.*: **Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L.).** *Marine Biology* 2007, **151**: 1633-1645.

Yanagiba Y, Ito Y, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T: **Octachlorostyrene induces cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase via the aryl hydrocarbon receptor and constitutive androstane receptor.** *Toxicol Sci* 2009, **111**: 19-26.

Zhang SH, Yao JH, Song HD, Wang L, Xue JL: **Cloning and expression of translation elongation factor 2 (EF-2) in zebrafish.** *DNA Seq* 2008, **19**: 1-7.

Tables

Table 1 - Presentation of the genes used in qPCR. The grey lines indicate the 5 tested housekeeping genes.

Oligo Name	Best Description		Sequence 5' to 3'	concentration (nM)	Accession Number
1rt130d18_d_b09	SL9A8_MOUSE (Q8R4D1) Sodium/hydrogen exchanger 8 (Na ⁺)/H ⁺ exchanger 8) (NHE-8) (Solute carrier family 9 member 8)	FW RV	AAGGCACCAATGAATGTCTG TCCCAGCAACAAATAAAATGAA	600	CU067872
1rt149k02_c_f01	CLCN2_MOUSE (Q9R0A1) Chloride channel protein 2 (ClC-2)	FW RV	GGAGTGGTGTCCCTCAAAGA TCTCTGGCCTTGTCTCGTT	600	CU070186
tcak0001.a.17	HBA4_ONCMY (P14527) Hemoglobin alpha-4 subunit (Hemoglobin alpha-4 chain) (Alpha-4-globin)	FW RV	TTGTGTGCCAGGATCTTGAA GTTGGCAACTTGGACGATCT	600	CU068508
tcam0001.f.15	CPNS1_PIG (P04574) Calpain small subunit 1 (CSS1) (Calcium-dependent protease small subunit 1)	FW RV	CCTACGCTAAGCCGAACAAG TTTGCCAATGATCCTGTTGA	600	CU068021
tcay0026.g.05	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV	FW RV	GACCAACCACTCCAAGAAGA GAACCACAAGCAGACCACAA	600	CU066478
tcay0010.l.23	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1	FW RV	ACAGGCTGTGCTCCTTCCTA TTCCAGTACCAACCTTTCC	600	CU069536
tcah0002.k.12	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2	FW RV	TCGTCTTATTACGGGGCATC CCTGTTGTCTTTGTCTGCTCA	600	CU070134
tcay0003.p.11	(sp:O97862) Cystatin-C OS=Oryctolagus cuniculus GN=CST3 PE=2 SV=1	FW RV	GTCCTGTGTTCTGGGGAAAA CTTCTGGCAAGAGGAGTTGG	600	CU067264
tcba0009.m.06	/	FW RV	TCCGTGCAATGTTCACTAGC GCCTCCCCAGTGTAGACAAA	600	CU071857
1rt24b11_b_a06	PREDICTED: reverse transcriptase-like protein-like [Saccoglossus kowalevskii]	FW RV	CCCAGAGCCAACAGAGAGAC TGGTCAACAGTCAGGAATGC	600	CA383486
1rt41a12_c_A06	(sp:P70083) Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS=Makaira nigricans GN=atp2a1 PE=2 SV=2	FW RV	ATGGCGGTAATCTCGTCTTG CAAAGCGATGCTGTCCAGAAA	600	CU068279
tcbk0010.e.12	(sp:Q5TM57) Ribonuclease P protein subunit p21 OS=Macaca mulatta GN=RPP21 PE=3 SV=1	FW RV	TAGAAACCGCATGACTGTGC ACGTGGCTGTGATTGGTTCT	400	CU072785
1rt31c08_c_b04	(sp:Q90952) Serum paraoxonase/arylesterase 2 OS=Gallus gallus GN=PON2 PE=2 SV=1	FW RV	TAGCCGTTGGGTCTCTCTGT CCTTTGCTCCATTAGGGTGA	400	CU068700
1rt99c24_c_b12	(sp:Q9WUD9) Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src OS=Rattus norvegicus GN=Src PE=2 SV=3	FW RV	CCGAGCACAGATAGGAGGAG CACGCACACAGACACAAGTG	400	CU067386
ef1 α	Elongation factor 1-alpha	FW RV	GCTGGACAAGCTGAAGGCTGAG AGCGCAATCAGCCTGAGAGGTA	400	
18S	18S ribosomal RNA	FW RV	CGGAGGTTCTGAAGACGATCA TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG	200	
Na ⁺ ,K ⁺ ATPase α 1a	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2	FW RV	GCAGACGCCTCTCGGAATT CAATGAGAAAAGATGATGGATGG	600	
Na ⁺ ,K ⁺ ATPase α 1b	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2	FW RV	GGAAGACGCCTATAGCCAAA CGATGAGGAAGATGACAGCTTC	200	
CYP1A	Cytochrome P450 1A3	FW RV	GTTCAACATCCCACACTGC GCCATCAGCACTCAGGAAA	200	
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	FW RV	CAAGGCCCGCATACTGCT GCAGTGGTTCCACTCTGTGTT	400	

Table 2 - Details of the results of the time by time SAM. For each gene differentially expressed is mentioned the corresponding clone mane, number accession, contig and description according to Sigenae assembly s.om.10 as the significance level (fdr=0).

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description
2 hours				
tcay0018.l.10	0	BX309261	BX309261.s.om.10	[BBH] PSF1_HUMAN (sp:Q14691) DNA replication complex GINS protein PSF1 OS=Homo sapiens GN=GINS1 PE=1 SV=1
tcbk0034.n.16	0	CU073536	CU073536.s.om.10	(sp:Q6GLW8) Apoptosis-inducing factor 2 OS=Xenopus laevis GN=aim2 PE=2 SV=1
8 hours				
tcay0023.a.19	0	BX310197	BX310197.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcay0010.l.23	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
1RT47H11_B_D06	0	CA379523	CA387790.s.om.10	ref[NP_001139846.1] Zinc finger CCCH domain-containing protein 15 [Salmo salar]
24 hours (1/2)				
1RT120G22_C_D11	0	CA362233	CU069974.s.om.10	Oncorhynchus mykiss toxin-1 (LOC100135970), mRNA
1RT39D23_B_B12	0	CA377594	CA346323.s.om.10	[BBH] EIF3D_DANRE (sp:Q6TH15) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Danio rerio GN=eif3d PE=2 SV=1
1RT55D21_B_B11	0	CA381160	CA354351.s.om.10	[BBH] MED10_DANRE (sp:Q0VIA1) Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10 OS=Danio rerio GN=med10 PE=2 SV=1
tcac0004.a.22	0	BX083957	BX083956.s.om.10	(sp:A6NN14) Zinc finger protein 729 OS=Homo sapiens GN=ZNF729 PE=2 SV=3
tcac0004.o.05	0	BX084437	BX084437.s.om.10	(sp:Q9UJW8) Zinc finger protein 180 OS=Homo sapiens GN=ZNF180 PE=1 SV=2
tcad0002.p.17	0	BX075597	BX075597.s.om.10	(sp:Q5JTW2) Centrosomal protein of 78 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP78 PE=1 SV=1
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcch0002.k.12	0	CT962667	FYV3OTN01BVNE O.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcav0001.j.20	0	BX085582	BX085582.s.om.10	(sp:Q9BXX0) EMILIN-2 OS=Homo sapiens GN=EMILIN2 PE=1 SV=2
tcav0004.b.11	0	BX087315	BX087314.s.om.10	(sp:Q99MK2) Histone acetyltransferase KAT5 OS=Rattus norvegicus GN=Kat5 PE=1 SV=2

Chapitre II - Analyse transcriptomique différentielle

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description
24 hours (2/2)				
tcav0004.f.06	0	BX086372	BX310251.s.om.10	(sp:Q3T144) Transmembrane protein 106C OS=Bos taurus GN=TMEM106C PE=2 SV=1
tcay0003.p.11	0	BX297901	BX297900.s.om.10	(sp:Q15828) Cystatin-M OS=Homo sapiens GN=CST6 PE=1 SV=1
tcce0015c.f.10	0	CU070049	CU070049.s.om.10	Salmo salar NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 (ubc12), mRNA
tcay0016.p.14	0	BX308015	BX308015.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcay0026.g.05	0	BX313035	BX313035.s.om.10	(sp:P06761) 78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1
tcba0001.o.24	0	BX857505	BX859454.s.om.10	[BBH] PARP4_HUMAN (sp:Q9UKK3) Poly [ADP-ribose] polymerase 4 OS=Homo sapiens GN=PARP4 PE=1 SV=2
tcba0003.d.20	0	BX856445	CU071578.s.om.10	[BBH] SGK2_HUMAN (sp:Q9HBY8) Serine/threonine-protein kinase Sgk2 OS=Homo sapiens GN=SGK2 PE=1 SV=1
tcba0018.p.09	0	BX864334	CA387160.s.om.10	[BBH] AMP1D_DANRE (sp:Q4VBS4) Methionine aminopeptidase 1D, mitochondrial OS=Danio rerio GN=map1d PE=2 SV=1
tcbk0010.l.08	0	BX873389	BX885361.s.om.10	(sp:Q3SYU2) Elongation factor 2 OS=Bos taurus GN=EEF2 PE=2 SV=3
tcbk0024.h.21	0	BX875321	BX875321.s.om.10	(sp:Q9HB89) Neuromedin-U receptor 1 OS=Homo sapiens GN=NMUR1 PE=2 SV=1
tcbk0030.l.05	0	BX886340	BX886340.s.om.10	[BBH] NOCT_MOUSE (sp:O35710) Nocturnin OS=Mus musculus GN=Cern4l PE=2 SV=3
tcbk0040.h.23	0	BX879105	BX305206.s.om.10	(sp:P15429) Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3
IRT108C22_C_B11	0	CA363333	BX862694.s.om.10	(sp:Q9D0E1) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnrmmp PE=1 SV=3
tcay0021.g.10	0	BX310003	CA344558.s.om.10	[BBH] NHRF3_RAT (sp:Q9JJ40) Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdzk1 PE=1 SV=2
tcce0003.o.17	0	CU070136	CU070136.s.om.10	(sp:Q6P819) Cell differentiation protein RCD1 homolog OS=Xenopus tropicalis GN=rqcd1 PE=2 SV=1
tcce0004.j.04	0	CU066754	BX082871.s.om.10	CU068339 BX080225.s.om.10
tcce0012.c.02	0	CU068339	BX080225.s.om.10	CU073097 CX149178.s.om.10
tcce0022.b.04	0	CU073097	CX149178.s.om.10	CU071857 CA349629.s.om.10
tcba0009.m.07	0	CU071857	CA349629.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcce0015.l.21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	

Chapitre II - Analyse transcriptomique différentielle

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description
48 hours				
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcay0027.f.19	0	BX313510	BX313509.s.om.10	[BBH] PPR1B_BOVIN (sp:P07516) Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B OS=Bos taurus GN=PPP1R1B PE=1 SV=1
tcay0033.a.08	0	BX317005	BX317005.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tce0003.o.17	0	CU070136	CU070136.s.om.10	[BBH] NHRF3_RAT (sp:Q9JJ40) Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdzk1 PE=1 SV=2
tce0004.j.04	0	CU066754	BX082871.s.om.10	(sp:Q6P819) Cell differentiation protein RCD1 homolog OS=Xenopus tropicalis GN=rqcd1 PE=2 SV=1
tce0004.p.08	0	CU066753	CX030763.s.om.10	(sp:Q6BEA2) Serine protease 27 OS=Rattus norvegicus GN=Prss27 PE=2 SV=1
1RT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
4 days				
1RT93D06_D_B03	0	CA346182	CA342041.s.om.10	[BBH] HBB4_ONCMY (sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.a.15	0	CT962636	CT962636.s.om.10	(sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcal0001.g.09	0	CT962927	CT962927.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcay0003.p.11	0	BX297901	BX297900.s.om.10	(sp:Q15828) Cystatin-M OS=Homo sapiens GN=CST6 PE=1 SV=1
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcay0033.a.08	0	BX317005	BX317005.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tce0015.l.21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
11 days (1/2)				
1RT120G22_C_D11	0	CA362233	CU069974.s.om.10	Oncorhynchus mykiss toxin-1 (LOC100135970), mRNA
1RT149K02_C_F01	0	CA350801	CA348639.s.om.10	(sp:Q9WU45) Chloride channel protein 2 OS=Cavia porcellus GN=CLCN2 PE=2 SV=1
1RT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
1RT79D04_D_B02	0	CA355095	CA355095.s.om.10	[BBH] CRVP1_ENHPO (sp:Q2XXQ3) Cysteine-rich secretory protein ENH1 OS=Enhydryis polylepis PE=2 SV=1
tcac0006.b.03	0	BX084907	U83980.s.om.10	[BBH] COX6A_ONCMY (sp:O13085) Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1

Chapitre II - Analyse transcriptomique différentielle

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description
11 days (2/2)				
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcag0002.k.12	0	CT962667	FYV3OTN01BVNE O.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcay0026.g.05	0	BX313035	BX313035.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcay0030.j.21	0	BX316785	BX073791.s.om.10	(sp:P30042) ES1 protein homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C21orf33 PE=1 SV=3
1RT148G11_A_D06	0	CU069663	CU069663.s.om.10	(sp:Q68FL4) Putative adenosylhomocysteinase 3 OS=Mus musculus GN=Ahcy12 PE=1 SV=1
tcce0015.l.21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
1RT129G21_A_D11	0			
tcbk0016.d.04	0	BX871706	BX304275.s.om.10	[BBH] RAB19_MOUSE (sp:P35294) Ras-related protein Rab-19 OS=Mus musculus GN=Rab19 PE=2 SV=3
23 days				
1RT129L03_B_F02	0	CA383772	CA383772.s.om.10	[BBH] AR6P1_PONAB (sp:Q5R454) ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1 OS=Pongo abelii GN=ARL6IP1 PE=2 SV=1
1RT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcac0006.b.03	0	BX084907	U83980.s.om.10	[BBH] COX6A_ONCMY (sp:O13085) Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1
tcag0002.a.15	0	CT962636	CT962636.s.om.10	(sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcag0002.n.03	0	CT962742	CB494976.s.om.10	PREDICTED: Danio rerio exportin 1-like (LOC100331410), mRNA
tcak0001.a.17	0	CU068508	CX136447.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcag0001.g.09	0	CT962927	CT962927.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcag0001.i.08	0	CT962881	CT962881.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcag0001.k.08	0	CT962918	CA347919.s.om.10	[BBH] HBB1_ONCMY (sp:P02142) Hemoglobin subunit beta-1 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb1 PE=1 SV=1
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcba0014.d.23	0	BX863016	BX299376.s.om.10	(sp:Q80X32) UPF0461 protein C5orf24 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=1
tcce0003.k.09	0	CU070569	CU070569.s.om.10	
tcce0015.l.21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcag0001.o.16	0			

Table 3 - Composition in genes of the 4 mains functional groups defined in 24h PT.

<i>Protein biosynthetic processes regulation and energy saving</i>	cellular stress and stimuli response		HSP90-beta	HSP60	GRP78	
	protein biosynthetic processes	ARL1	PARP4 eIF-4E type 3	EF2 eIF 4γ3	MAP1D eIF-4E	eIF-3D
	protein turnover	Ubc12	Cu9 (fdr 5)	UBE3A (fdr 5)	UB2D2 (fdr5)	UBE4A (fdr5)
<i>Developmental processes</i>	regulation of cell cycle and DNA replication		WDHD1		ORC2	
	proliferation and differentiation	Cox-1	PTGES2	Mybbp1a (fdr 5)	Rqcd1	Sox11
	apoptosis events		KAT5	AT2	TRIAP1	
<i>Ionic homeostasis</i>		ATP1a1a	ATP1a1b	PDZK1 CLDN11	SLC4A4	CLCN5
<i>Signaling</i>	related IP3 genes	NMUR1	PLEKHA3	PITPNM2	IP3R1	
	hormonal signal		GH2	CTHBP	TRH	

Figures

Figure 1 - Effect of SW transfer on plasma chloride (A) and cortisol (B) concentrations after a seawater transfer. ~*, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.08). *, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.05). **, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.01).

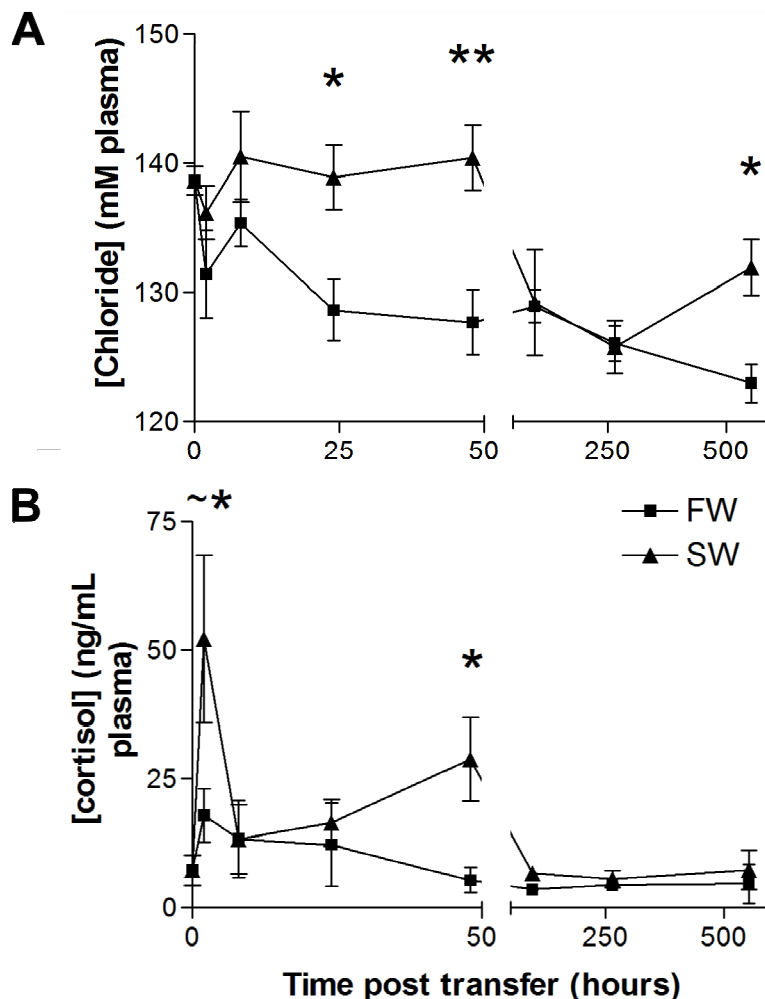


Figure 2 - fold change representation of CFTR (A), Na⁺/ K⁺-ATPase α1a (B) and Na⁺/ K⁺-ATPase α1b (C) mRNA relative abundance between seawater and freshwater fish (SW /

FW) at each time PT with standard error of the mean. *, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.05). **, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.01).

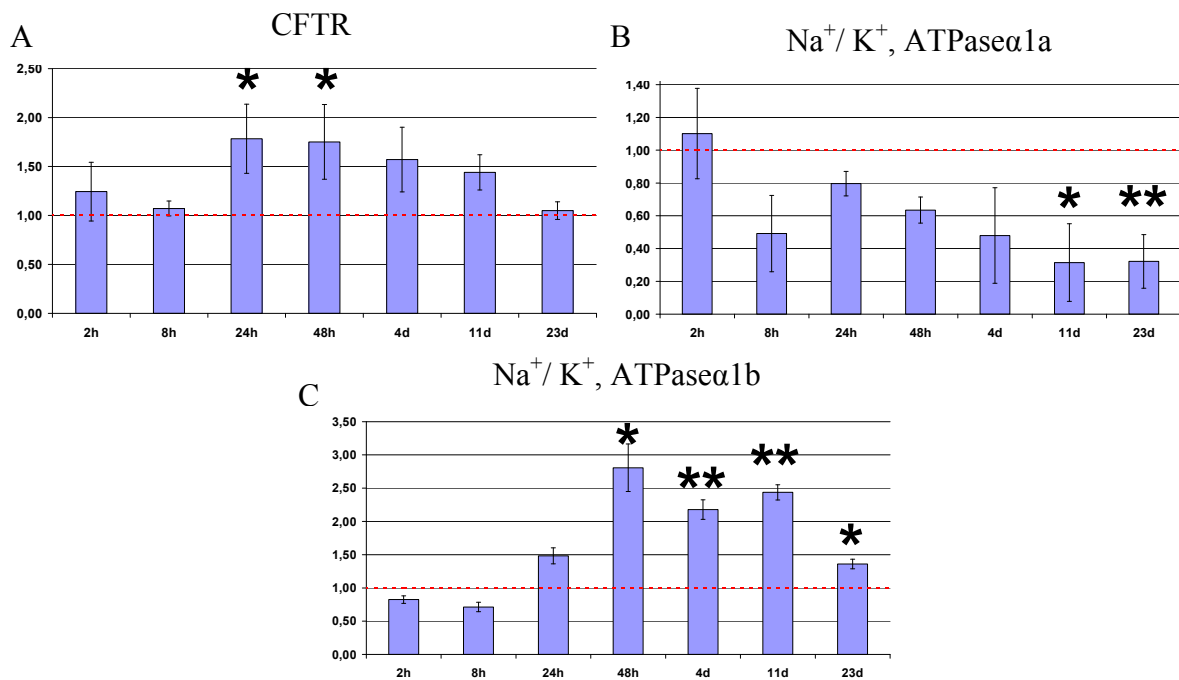
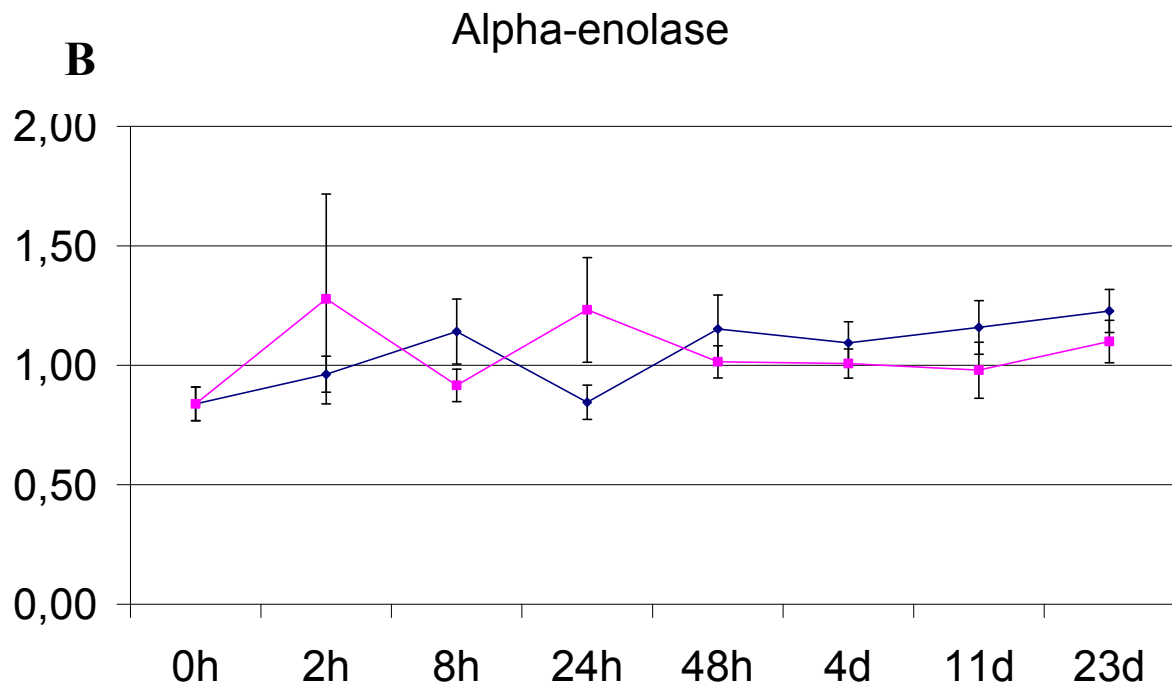
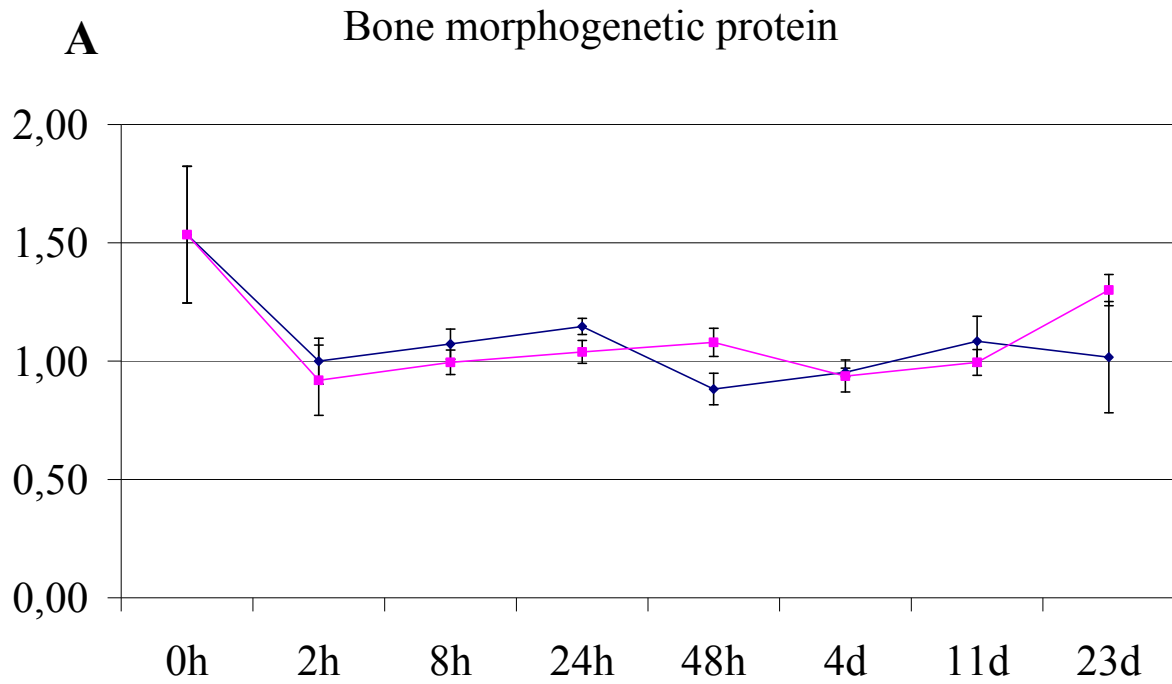
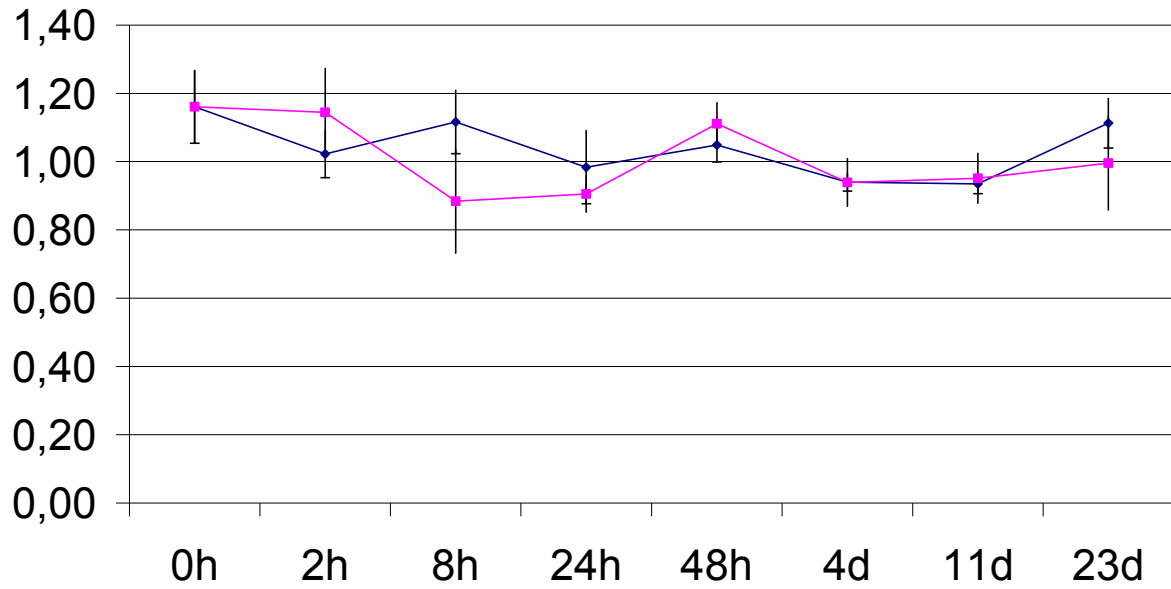


Figure 3 - Expression profiles of some known hyperosmotic early warning genes (identified in Tilapia) in freshwater and seawater during the 23 days following the transfer. A : Bone morphogenetic protein gene. B: Dual specificity mitogen-activated. C: Alpha-enolase. D: Apolipoprotein D precursor. E:Gelsolin precursor. F: Annexin A11.



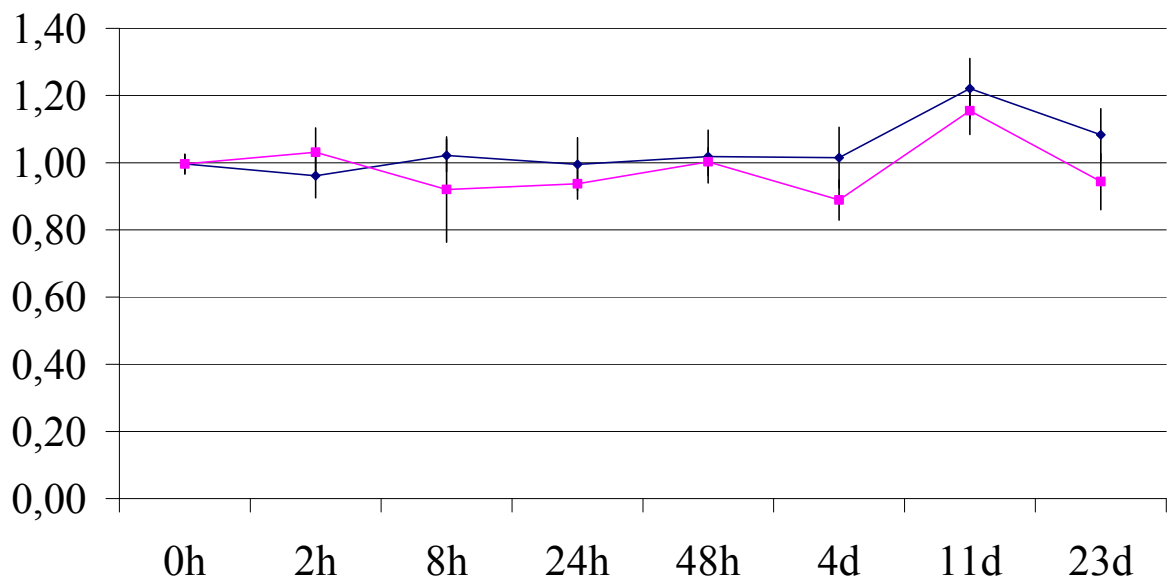
C

Apolipoprotein D precursor



D

Gelsolin precursor



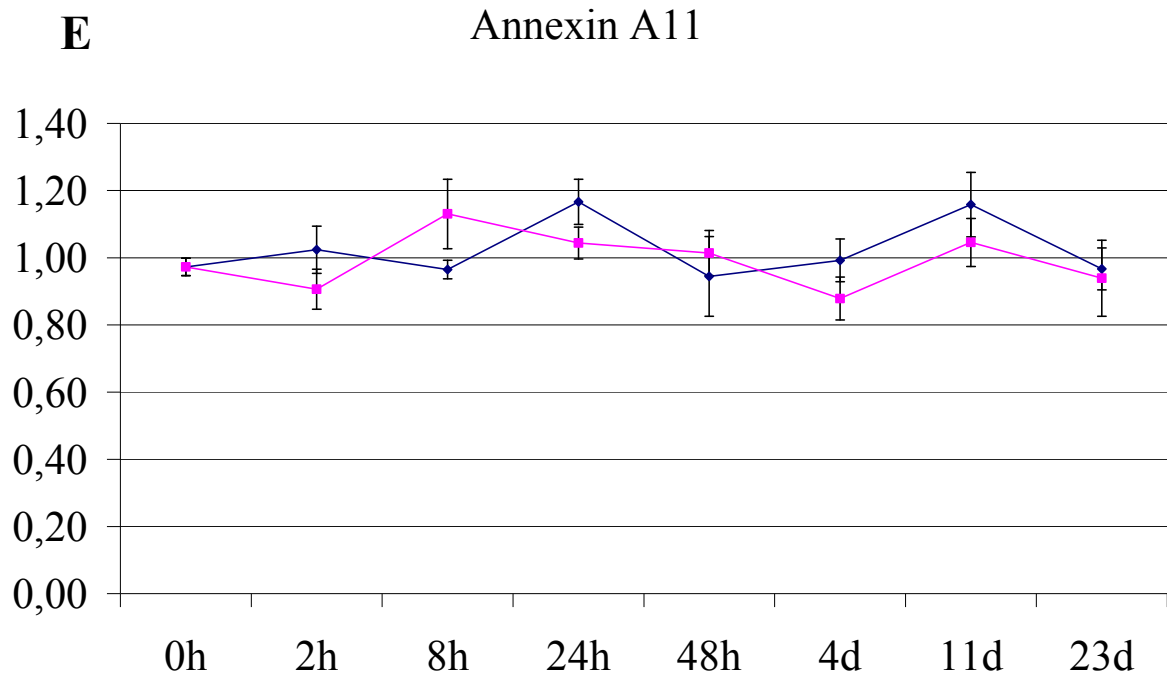
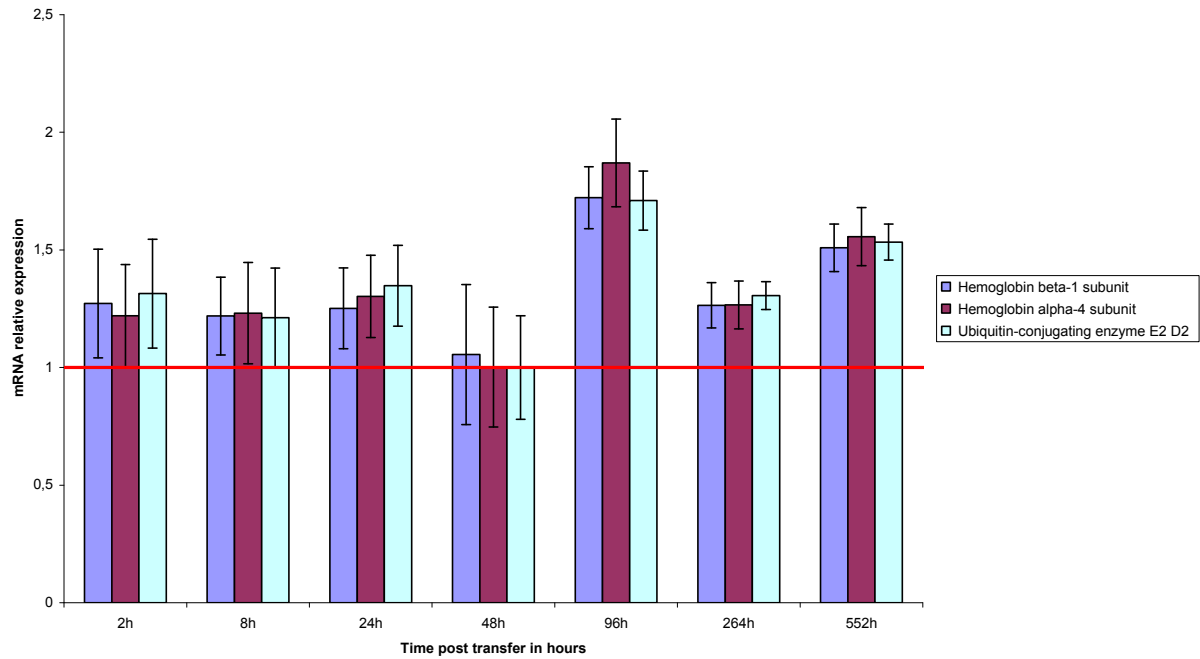


Figure 4 - Fold change representation of the mRNA relative abundance between seawater and freshwater fish (SW / FW) for 2 interesting clusters with standard error of the mean.

Cluster 1 (Bootstrap = 96)



Cluster 2 (Bootstrap = 93)

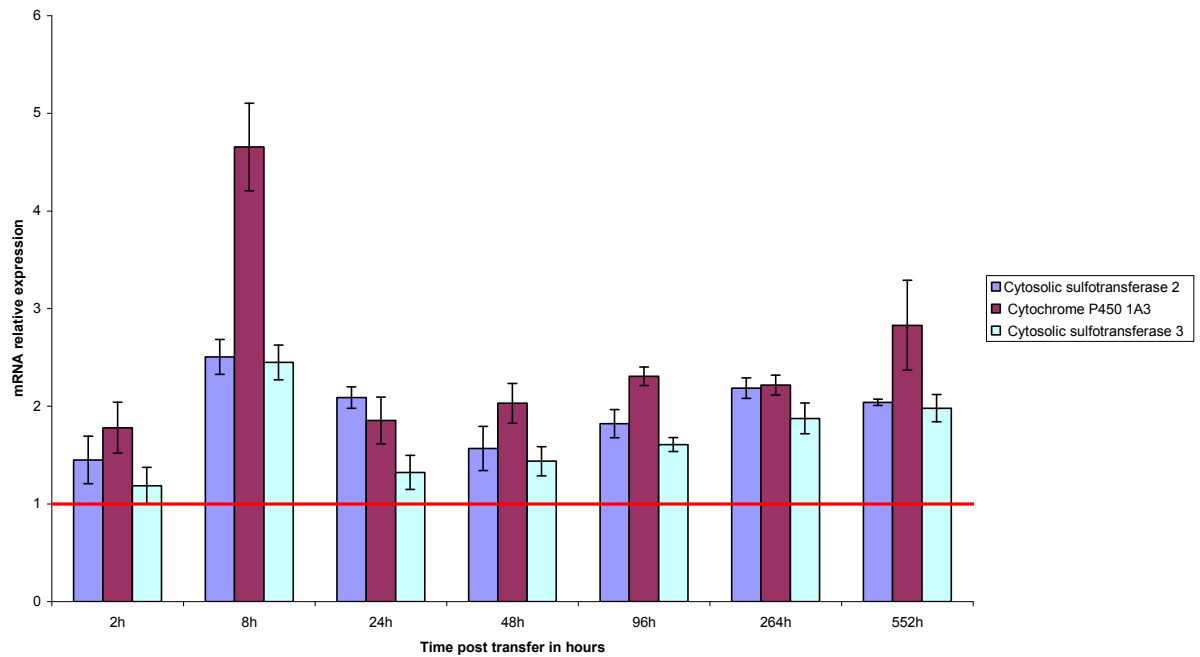


Figure 5 - Number of differentially expressed genes with a FDR of 0 for each time point.

Differentially expressed genes number by time point

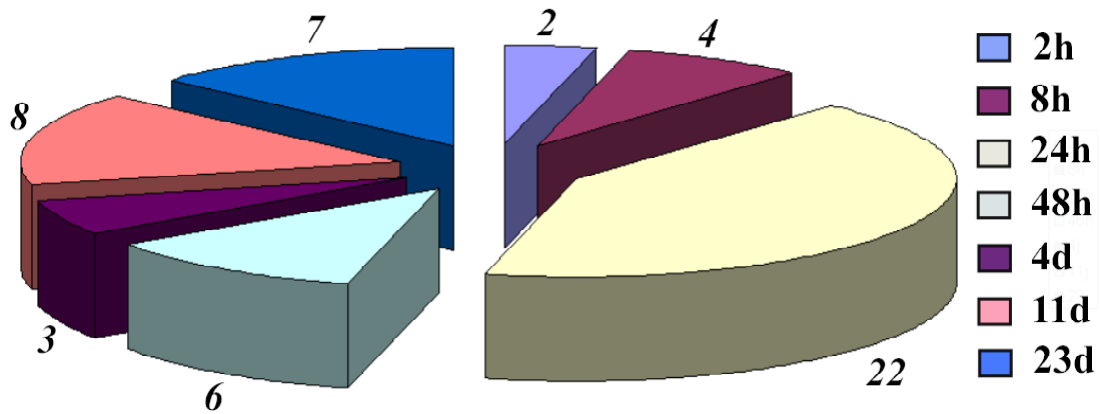


Figure 6 - Representation of the most important biological processes where genes found differentially expressed at a fdr below 5 % are involved 24h post salinity transfer.

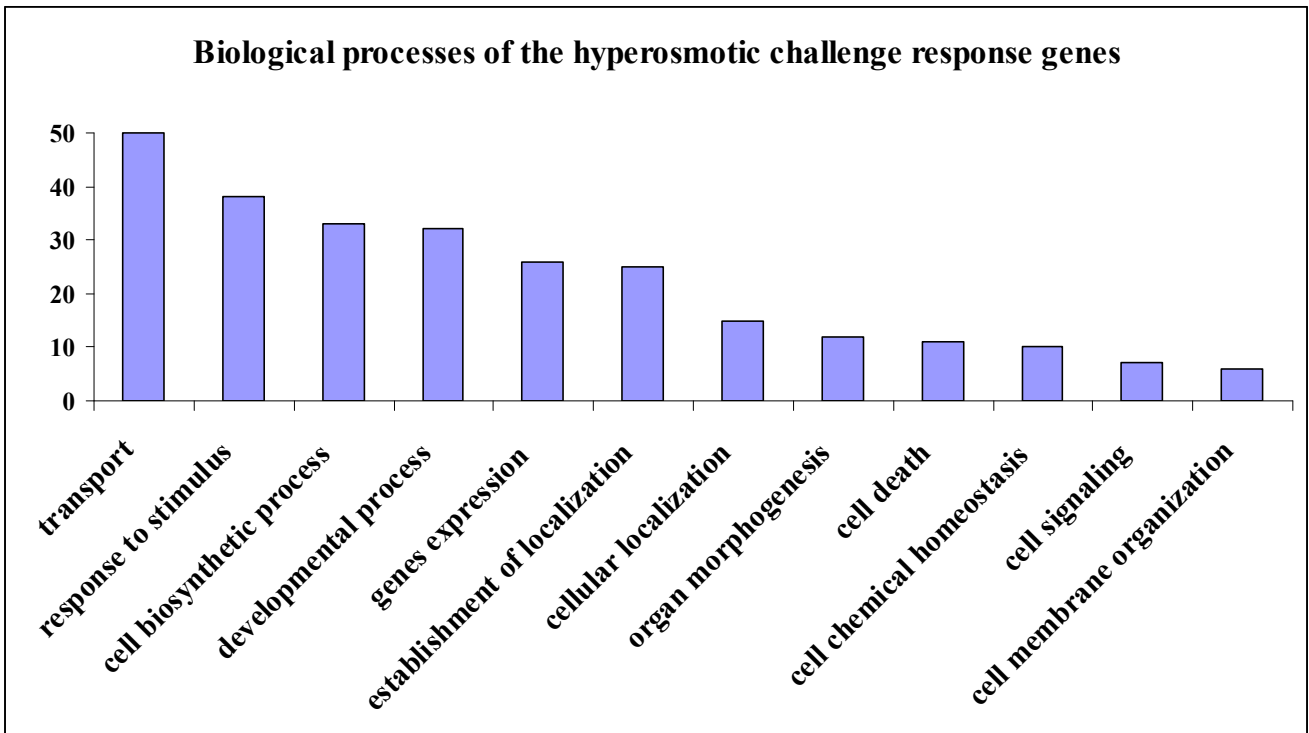
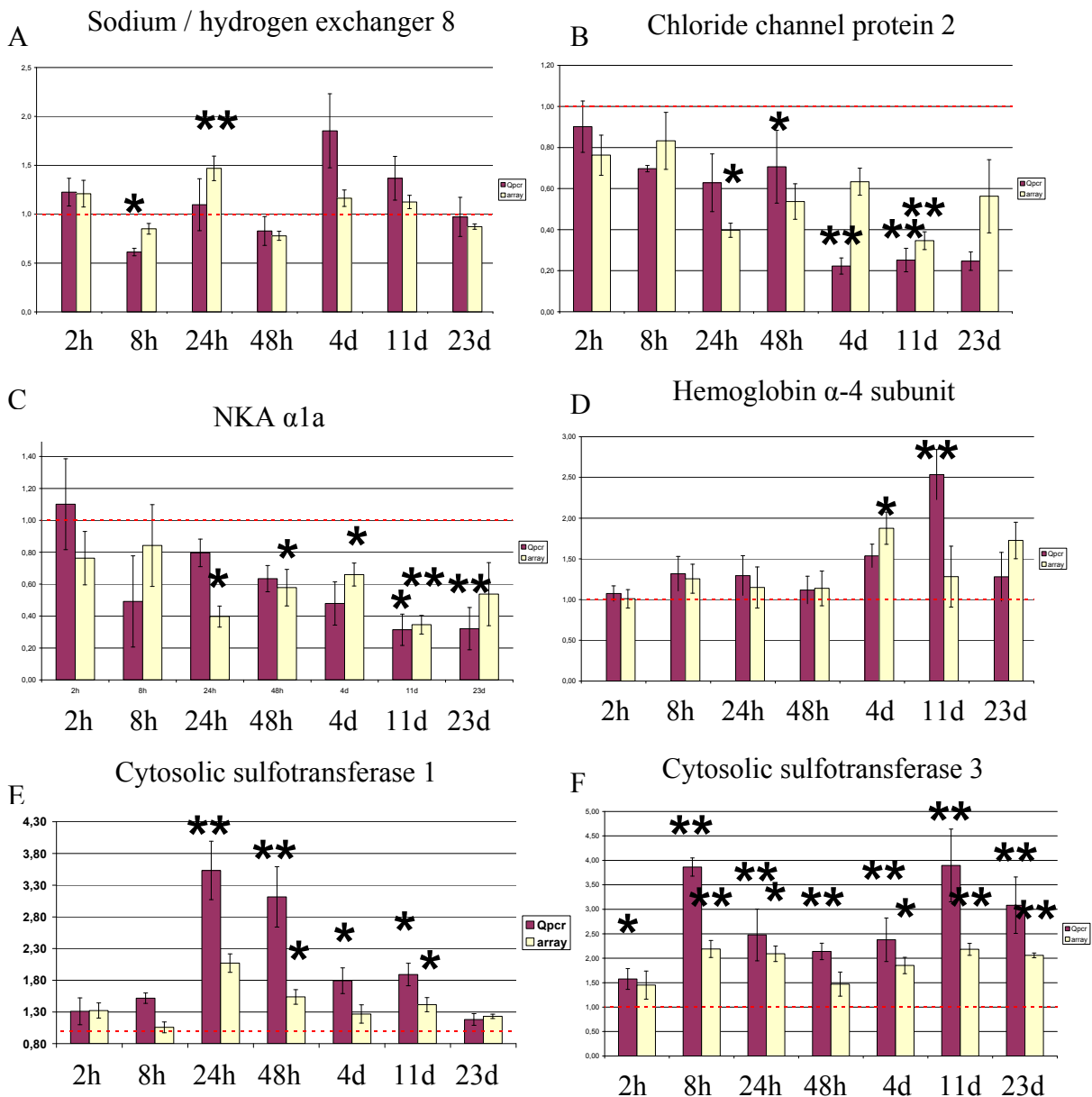


Figure 7 - Fold change representation of the mRNA relative abundance (microarray and qPCR) between seawater and freshwater at each time PT with standard error of the mean of some candidate genes. *, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.05). **, significant difference between SW-transferred and FW-transferred fish as determined by Mann-Whitney test (n=8-12; p<0.01). Horizontal red lines indicate a fold change of 1.



2. Discussion

De nombreux problèmes ont ralenti et complexifié cette étude transcriptomique. Ainsi, la qualité des données de puces nous a contraints à ignorer 16 des 90 individus testés. Cela a occasionné des pertes importantes de significativité des tests statistiques. Un autre paramètre important, influençant la précision des tests statistiques concerne l'hétérogénéité des données. Comme nous pouvons le constater au regard des données de chlore et de cortisol plasmatique mais également des profils d'expression de gènes, les erreurs types observées pour chaque groupe d'individus étaient globalement élevées. Finalement, de nombreux travaux mentionnent la forte différence de régulation d'expression de gènes entre les tissus et les types cellulaires (Beuvink *et al.*, 2007 ; De Gobbi *et al.*, 2007 ; Dittmar *et al.*, 2006 ; Grosso *et al.*, 2008 ; Pennacchio *et al.*, 2007). De ce fait, chez la truite, il est possible que l'obtention d'une partie des gènes différentiellement exprimés entre eau douce et eau de mer soit due à la différence de composition cellulaire de l'épithélium branchial dans les deux milieux.

Un premier résultat concerne les taux plasmatiques de chlore et de cortisol, relativement faibles chez les individus placés en eau de mer par rapport à ce qui est décrit dans la littérature (Bœuf, 1987 ; Tanguy *et al.*, 1994 ; Orozco *et al.*, 2002). Ces résultats, ainsi que ceux concernant l'expression de gènes précoce de stress osmotique, permettent d'émettre l'hypothèse que le challenge hyperosmotique subi par nos truites était faible.

Les résultats observés au niveau des paramètres plasmatiques et transcriptomiques permettent de proposer une cinétique de réponse physiologique de la truite arc-en-ciel exposée à un milieu hyperosmotique. Ainsi, une période de stress de salinité semble intervenir vers 2h PT (post transfert), puis une perturbation de certains paramètres physiologiques clés est observée à partir de 8h PT. Cette perturbation devient maximum à 24h, temps de l'initiation des processus d'acclimatation. Ces processus d'acclimatation semblent alors se manifester à travers diverses fonctions biologiques liées à la morphogenèse, au turnover des cellules (différenciation, apoptose, etc.), à la régulation de l'expression de gène, de la synthèse et maturation des protéines mais également à la signalisation hormonale et au transport ionique. En découlerait une régulation de l'homéostasie ionique traduite par la réduction des concentrations en chlore plasmatique qui débiterait après 48h PT pour atteindre les niveaux des truites d'eau douce 4 jours PT. Le cortisol étant impliqué dans les processus osmorégulateurs chez les téléostéens (Madsen *et al.*, 1995 ; Wendelaar Bonga, 1997),

pouvant jouer un rôle dans la diminution des niveaux de chlore plasmatique dans un environnement hyperosmotique chez le saumon Atlantique (McCormick *et al.*, 2008), cette régulation pourrait être initiée par le pic de cortisol observé à 48h après transfert. Les temps longs suggèrent, quant à eux, des fonctions liées au transport d'ions, au transport intracellulaire, au renouvellement cellulaire et au transport d'oxygène. Ces fonctions pourraient alors être représentatives du fonctionnement différentiel des organismes d'eau douce et d'eau de mer.

Cette première approche fonctionnelle a permis d'identifier un certain nombre de candidats de l'acclimatation des truites à un milieu hyperosmotique. Parmi eux, une attention toute particulière doit être accordée à CYP1A, aux SUT2 et 3, mais également à NHE-RF3, Na⁺ / HCO₃⁻ cotransporter1, H⁺ / Cl⁻ cotransporter 5 et chloride channel protein 2, qui représentent ici nos candidats fonctionnels principaux.

Les gènes candidats fonctionnels identifiés dans cette expérience de transfert constituent une base intéressante dans l'amélioration des connaissances des mécanismes physiologiques liés aux processus d'osmorégulation. Ainsi, un certain nombre d'entre eux est déjà utilisé afin de déterminer leurs rôles dans les processus de prolifération, division des ionocytes lors de l'ontogénèse chez *Danio rerio*, ou encore lors de la modification morphofonctionnelle de la branchie suite à un changement de salinité de l'environnement chez la truite arc-en-ciel. Il s'agit alors d'identifier et de mieux comprendre les phénomènes de prolifération, différenciation, transdifférenciation concernant les ionocytes de téléostéens et permettant le passage d'un type cellulaire à un autre. Ce phénomène est observé lors de l'acclimatation de poissons téléostéens adultes à l'eau de mer ou lors de la maturation d'individus.

Enfin, les candidats fonctionnels identifiés ici, que je nommerai par la suite candidats différentiels, représentent une liste de base des candidats positionnels et fonctionnels recherchés dans la suite de ce travail de thèse.

Chapitre III

Détection de QTL en lien avec l'acclimatation à l'eau de mer

Chapitre III. Identification de QTL en lien avec l'acclimatation à l'eau de mer

Comme mentionné dans le premier chapitre de ce travail, de nombreuses approches transcriptomiques ont récemment permis d'identifier des gènes candidats fonctionnels impliqués dans les trois étapes de la réponse à un choc osmotique (i.e. osmosensing, transduction du signal et mobilisation d'effecteurs osmotiques) chez plusieurs espèces de téléostéens euryhalins. Pour autant, peu d'informations existent concernant l'existence de candidats positionnels responsables de la variabilité de réponse à un stress osmotique. L'existence de loci régulant la réponse à des changements de salinité de l'environnement a déjà été montrée chez les plantes comme l'orge, le riz et le tournesol (Flowers *et al.*, 2000 ; Kiani *et al.*, 2007 ; Lilley *et al.*, 1996). Chez le poisson, seuls certains travaux mentionnent les différences dans la capacité osmorégulatoire de populations ou lignées, sans proposer de gènes candidats. Dans cette deuxième partie, nous proposons de détecter, pour la première fois, à notre connaissance, chez le poisson téléostéen, la présence de QTL en lien avec les capacités osmorégulatrices. Le développement récent d'outils génétiques chez la truite arc-en-ciel, incluant la détermination de marqueurs pour l'établissement de cartes génétiques de moyenne densité (Guyomard *et al.*, 2006 ; Nichols *et al.*, 2003 ; Rexroad *et al.*, 2008), mais également de bases d'EST (Expressed Sequence Tag, correspondant à la portion séquencée d'un ADNc), fournit les fondements nécessaires à la meilleure connaissance biologique des phénotypes.

Alors que plusieurs études QTL ont déjà été menées pour certains caractères chez la truite arc-en-ciel, comme la croissance (Wringe *et al.*, 2010), la résistance aux maladies (Khoo *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2003 ; Ozaki *et al.*, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2004 ; Zimmerman *et al.*, 2004), la tolérance à la température (Perry *et al.*, 2005), la réponse au cortisol (Drew *et al.*, 2007) et la maturation précoce (Haidle *et al.*, 2008), très peu se sont intéressées aux capacités osmorégulatrices. Le travail s'en approchant le plus consiste en la recherche de QTL pour des caractères en relation avec la smoltification en utilisant un croisement entre truites migratrices et sédentaires (Nichols *et al.*, 2008). Cependant, cette étude se focalise principalement sur des caractères morphologiques (croissance, condition, reflet de la peau) et aucun QTL significatif n'a été détecté pour le caractère étudié lié à l'osmorégulation : l'activité Na^+ / K^+ ATPase.

Une première partie de ce chapitre présente les principes régissant l'identification de loci affectant un caractère quantitatif (définition du QTL) ainsi que l'intérêt de l'utilisation de données transcriptomiques dans les protocoles de détection de QTL. Un regard est ensuite porté sur la détection de QTL en aquaculture. Enfin, les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés et discutés dans une troisième partie constituée notamment d'un article soumis dans la revue BMC Genetics.

1. La détection de QTL

Le modèle classique en amélioration génétique chez les animaux d'élevage est le modèle polygénique, basé sur la théorie infinitésimale de Fisher (Fisher, 1930). Il définit le fait qu'un caractère est influencé par une infinité de loci ayant chacun un très faible effet, ces effets s'additionnant. Les schémas génétiques utilisent alors uniquement les informations généalogiques et phénotypiques pour sélectionner les meilleurs individus. Or, une importante partie de la variabilité de nombreux caractères est contrôlée par un petit nombre de gènes. Lorsqu'un seul gène à fort effet est concerné, il est qualifié de gène à effet majeur ou gène majeur. Son effet est alors suffisamment important pour être détecté avec la seule information phénotypique (Goffinet *et al.*, 1994). Nous pouvons citer le gène halothane, un gène majeur identifié chez le porc et qui affecte la qualité de la viande en influant sur la résistance au stress et le développement musculaire (Fujii *et al.*, 1991 ; Ollivier *et al.*, 1975 ; Otsu *et al.*, 1991) ou le gène RN dont l'allèle dominant RN- a un effet négatif sur le rendement à la cuisson du jambon blanc de même que sur la qualité de la viande (Le Roy *et al.*, 1990). Des gènes majeurs ont également été identifiés chez la poule (gène du nanisme), la chèvre (gène du cornage), le bovin (gène de l'hypertrophie musculaire) et le mouton (gène de prolificité Booroola). Dans le cas plus général où le caractère est contrôlé par une région chromosomique d'effet individualisable, sans savoir si un ou plusieurs gènes à effets plus ou moins importants sont concernés, nous utilisons le terme QTL (Goffinet *et al.*, 1994) (figure 15). La mise en évidence de ces QTL repose sur l'exploitation d'informations moléculaires sur le génome, ce qui permet la détection d'un QTL est son effet, la variabilité du phénotype, la variabilité environnementale ainsi que la variabilité génétique du caractère due à d'autres loci.

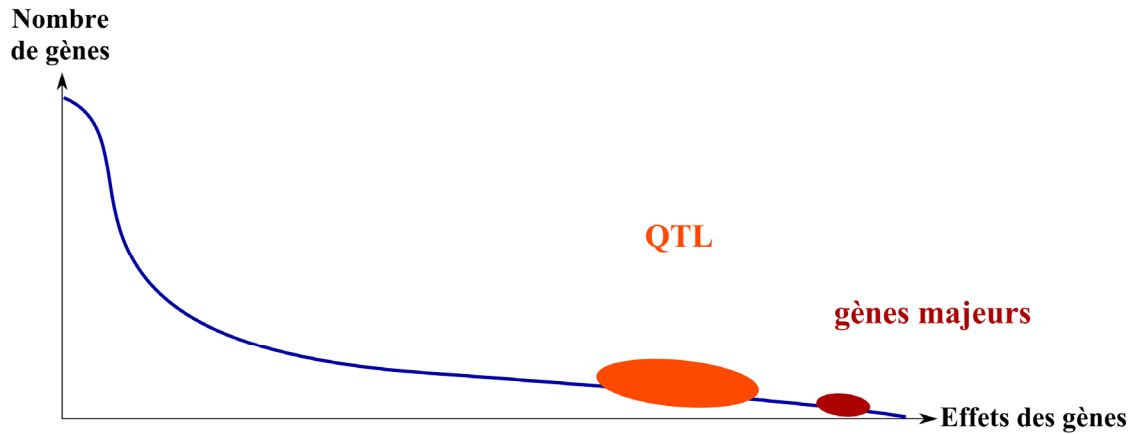


Figure 15: Représentation de l'importance relative du nombre de gènes en fonction de leurs effets et de la situation des QTL par rapport aux gènes majeurs.

1.1. Principe

Pour détecter des QTL, plusieurs méthodes et types de protocoles existent mais le principe de base reste le même. Il s'agit d'observer dans la descendance d'un reproducteur hétérozygote M / m pour un marqueur donné M , s'il existe une différence de performance moyenne entre les individus ayant reçu l'allèle M et ceux ayant reçu l'allèle m . Si cette différence est prouvée, un QTL génétiquement lié à ce marqueur M est détecté. Il y a donc eu coségrégation des allèles au marqueur (M et m) et à un locus (un ou plusieurs gènes représentant le QTL) responsable de la variabilité du caractère phénotypique étudié (figure 16).

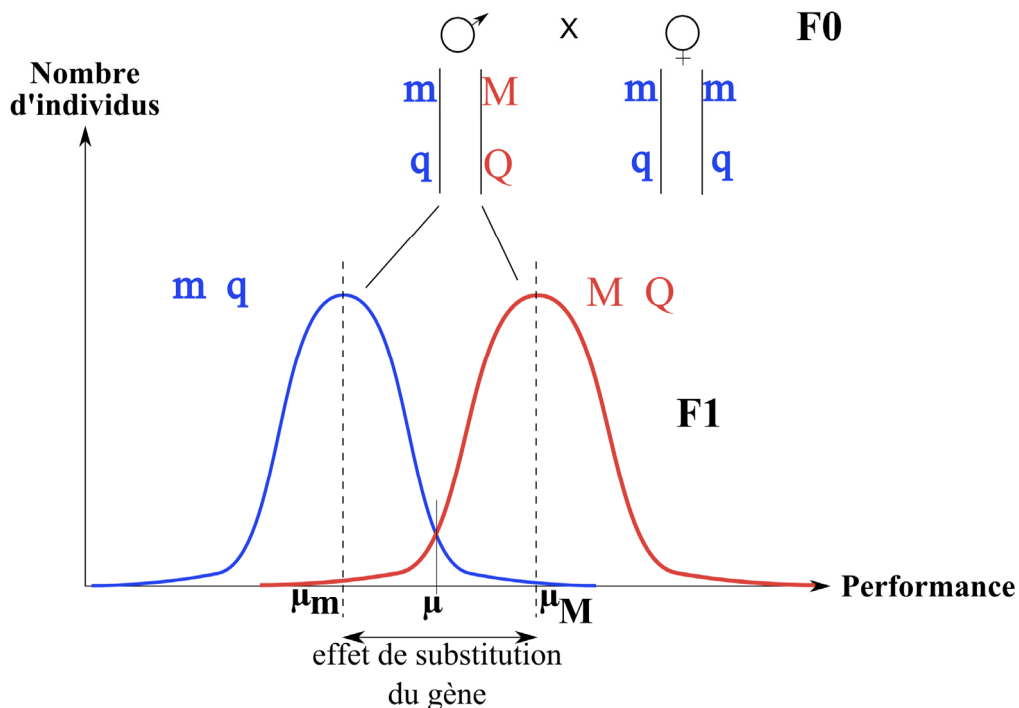


Figure 16: Détection d'un QTL grâce à l'utilisation de l'information au marqueur M .

La détection de QTL se résume par l'exploitation, sur un grand nombre d'individus, de la liaison génétique existante entre un QTL et les marqueurs génétiques proches. Le séquençage étant coûteux (aux alentours de 4 Euros la séquence), notamment si de nombreux loci sont testés, il est classiquement utilisé l'information de marqueurs génétiques. Ces marqueurs sont choisis en fonction de leur informativité. Ils doivent couvrir au mieux le génome et présenter un certain polymorphisme dans les populations étudiées pour conférer une puissance statistique suffisante. Lorsque le nombre de marqueurs est très important, comme cela peut être le cas chez l'homme, la forte liaison génétique certaine entre un marqueur et le QTL rend possible des analyses d'association. Il s'agit alors d'observer si le classement des performances est statistiquement lié à la présence d'allèles particuliers à chacun des marqueurs utilisés. Quand le génome de l'espèce étudiée est mal connu, et que le nombre de marqueurs disponibles est faible, il faut avoir recours à d'autres méthodes comme l'analyse de liaison génétique (LA).

Trois paramètres jouent alors sur la puissance de détection de QTL: (i) le nombre de marqueurs, (ii) la taille et la structure de l'échantillon analysé, (iii) les caractéristiques du QTL (effet, interactions, etc.). En effet, plus le nombre de marqueurs est important et moins la probabilité qu'un marqueur soit éloigné du QTL recherché est forte. De plus, il est essentiel d'observer assez d'événements de recombinaisons de méiose chez les parents pour améliorer l'estimation des distances génétiques entre marqueurs et QTL.

1.2. Cartographie d'intervalle

Pendant la méiose se déroule une phase d'appariement des chromosomes homologues. Ils peuvent alors se chevaucher sur une portion chromosomique plus ou moins importante : c'est le crossing-over. Ce chevauchement provoque l'échange de fragments de brins de chromosomes entre ceux d'origine paternel et maternel. Les allèles des gènes portés par ce fragment sont caractérisés par une proximité physique. Ainsi, plus un gène est éloigné d'un autre, plus les événements de crossing-over entre ces deux loci sont probables. Quand deux gènes sont très éloignés, la probabilité de crossing-over est très importante impliquant une forte probabilité de ségrégation des allèles aux deux gènes considérés. Si deux gènes sont très proches, cette probabilité est nulle. Ces événements de recombinaison génétique sont la base du calcul de la distance séparant deux loci. Il existe trois principales fonctions de distance génétique. La distance de Morgan, supposant une interférence complète, ignorant donc la possibilité qu'il existe plusieurs événements de recombinaison entre deux marqueurs. La distance de Kosambi, basée sur une interférence partielle ($d = \frac{1}{2} \log \left(\frac{1+2\theta}{1-2\theta} \right)$), et la

distance d'Haldane, supposant l'absence d'interférence. Cette dernière sera utilisée dans les analyses QTL de cette étude.

L'analyse de liaison consiste en la recherche de coségrégation d'un marqueur et d'un QTL. Il s'agit, à une position x du génome, de tester l'hypothèse d'absence de QTL contre celle de la présence d'un QTL à cette position. La statistique de test utilisée peut être (i) une analyse de variance (Haley et Knott, 1992 ; Knapp *et al.*, 1990 ; Martinez et Curnow, 1992), robuste et rapide, mais présentant l'inconvénient d'une diminution rapide de l'effet apparent du marqueur avec l'augmentation de la distance le séparant du QTL ; (ii) un test du maximum de vraisemblance, plus lent mais plus puissant que l'ANOVA quand la distance séparant marqueur et QTL est relativement importante ($\theta \geq 20$ cM) et / ou que l'effet du QTL est faible. Au début de la recherche de QTL, Neiman-Sorenson et Robertson (1961) proposaient une méthode d'analyse marqueur par marqueur. Cependant, ces analyses deux points ne permettent pas de discriminer l'effet du QTL de son éloignement par rapport au marqueur. Pour remédier à ce problème, a été proposé la méthode de cartographie d'intervalle. Cette méthodologie (IM, pour « Interval Mapping ») permet dans un premier temps d'estimer la probabilité qu'un descendant ait reçu l'un ou l'autre des allèles au QTL à une position x , sachant les allèles reçus aux marqueurs informatifs flanquants. Cette probabilité est ensuite utilisée pour tester statistiquement, par régression ou maximum de vraisemblance, la différence de moyennes de performance entre les 2 groupes d'individus ayant reçu l'un ou l'autre allèle au QTL (Lander et Botstein, 1989). L'information apportée par les données généalogiques, phénotypiques (performance des individus) et génotypiques (génotypes aux marqueurs) est résumée dans une statistique de test l . L'hypothèse alternative d'existence d'au moins un QTL sera acceptée après rejet de l'hypothèse d'absence de QTL lorsque la valeur estimée de l dépasse un seuil dépendant du risque α , déterminé par l'utilisateur, d'identifier un QTL alors qu'il n'y en a pas.

Dans cette étude, la méthodologie de cartographie d'intervalle et les analyses statistiques consisteront en des tests de maximum de vraisemblance réalisés avec le logiciel QTLMap. La cartographie d'intervalle consiste à balayer le génome en testant, à chaque position x située entre chaque couple de marqueurs, la possibilité qu'il existe un QTL. Ainsi, à chaque position, va être calculée la probabilité de transmission des parents aux descendants des allèles au QTL (Q et q) sachant les haplotypes reçus aux marqueurs flanquants la position considérée. Cette probabilité est fonction du taux de recombinaison r observé entre chacun des deux marqueurs flanquants et la position x supposée du QTL. La vraisemblance du

phénotype considéré sera une fonction des observations pondérées par ces probabilités de transmission des allèles au QTL. Le résultat de ces analyses consiste en une position la plus probable du QTL associée à l'effet de substitution de ses allèles (Falconer, 1960 ; Fisher, 1918).

Diverses stratégies ont été envisagées pour améliorer les méthodes de détection de QTL. Notamment lorsque des QTL ont été détectés par le biais d'analyses unicaractères et uniQTL, certains QTL sont détectés pour le même caractère mais à différentes positions du génome alors que d'autres, influençant plusieurs caractères sont localisés au même endroit. L'une des façons d'améliorer la détection de QTL consiste alors en l'utilisation d'approches multidimensionnelles, multiQTL et multicaractères.

1.3. Approche multiQTL

La présence de QTL autre que celui testé, sur le même groupe de liaison ou non, a des conséquences négatives sur la robustesse et la puissance des méthodes de détection ne considérant qu'un seul QTL à la fois ainsi que sur l'estimation des paramètres le caractérisant. En particuliers, si deux QTL sont situés sur le même groupe de liaison, les estimations de la position, et de l'effet de chacun des QTL seront affectés (Dizier *et al.*, 1993 ; Martinez et Curnow, 1992). En effet, si les deux QTL sont génétiquement liés, la présence sur un même haplotype de deux allèles influençant le caractère dans le même sens, positif ou négatif, risque d'aboutir à la détection d'un QTL qualifié de fantôme. A l'inverse, si les allèles sont en répulsion, le risque est de ne pouvoir identifier aucun des deux QTL (Gilbert et Le Roy, 2007).

1.4. Analyses multicaractères

Les premières approches multicaractères, développées chez les végétaux, reposaient essentiellement sur des adaptations multivariées de méthodes unicaractères (Jiang et Zeng, 1995 ; Korol *et al.*, 1995). L'une des difficultés rencontrées alors est le fait que le nombre de paramètres à estimer devient d'autant plus important qu'il y a de caractères. Ceci peut limiter la puissance de détection tout en augmentant considérablement les temps de calcul. Cette difficulté a motivé la recherche de méthodes alternatives permettant de limiter le nombre de paramètres à estimer comme par exemple l'utilisation de combinaisons linéaires des caractères regroupant l'information du QTL considéré (Gilbert et Le Roy, 2003). Si l'utilisation de variables synthétiques permet de conserver le gain de puissance et de précision de l'estimation de la position par rapport aux méthodes univariées, l'estimation des effets du

QTL est moins précise qu'avec une approche multivariée. C'est pourquoi cette dernière méthode est utilisée dans cette étude (Gilbert et Le Roy, 2003).

1.5. Seuils et intervalles de confiance

La démarche de cartographie d'intervalle exposée ci-dessus pose le problème du choix du seuil de rejet de l'hypothèse nulle d'absence de QTL sur le groupe de liaison testé. En effet, l'analyse d'un groupe de liaison correspond dans les faits à l'enchaînement de n tests d'hypothèse, un test par position x , ces tests étant corrélés les uns aux autres. Il existe alors deux façons d'estimer les seuils statistiques à partir des données simulées. Il s'agit dans tous les cas de supprimer les relations entre phénotypes et génotypes aux marqueurs. Ceci peut s'effectuer, soit en tirant les performances des individus de manière aléatoire dans une distribution gaussienne, soit en permutant les performances existantes entre les individus. Ensuite, des analyses de détection de QTL sont lancées sur les k nouvelles structures du jeu de données, k étant fixé par l'utilisateur (par exemple 10 000). Une distribution empirique de la statistique de test ainsi obtenue et les quantiles à 5%, 1%, etc. peuvent être déterminés.

En ce qui concerne l'intervalle de confiance de la position du QTL, des méthodes utilisant des calculs complexes existent (Mangin *et al.*, 1994) mais ne sont pas applicables à des structures de population familiales. Des méthodes basées sur des simulations (Visscher *et al.*, 1996) sont quant à elles souvent décevantes en pratique (intervalles très longs). Une solution empirique, acceptée par la communauté scientifique, est alors d'utiliser la méthode du « Lod Drop-off » décrite par Lander et Kruglyak (1995). Elle permet de déterminer un intervalle de confiance au QTL en retranchant à la valeur de l_{rt} maximale obtenue à la position du QTL, celle de la statistique de test du χ^2 pour 1 degré de liberté et une p -value déterminée. Ainsi, si nous désirons l'intervalle de confiance d'un QTL à 95%, il suffira de se placer à une p -value de 5%, ce qui renvoie 3,84, de soustraire cette valeur à celle du maximum de rapport de vraisemblance pour tracer une droite horizontale à cette ordonnée, puis de déterminer les positions en cM correspondantes aux croisements de cette droite avec la courbe d'évolution du l_{rt} (figure 17). Cette méthode issue de la théorie asymptotique a été montrée comme étant valable dans les cas d'effet QTL fort (Mangin *et al.*, 1994).

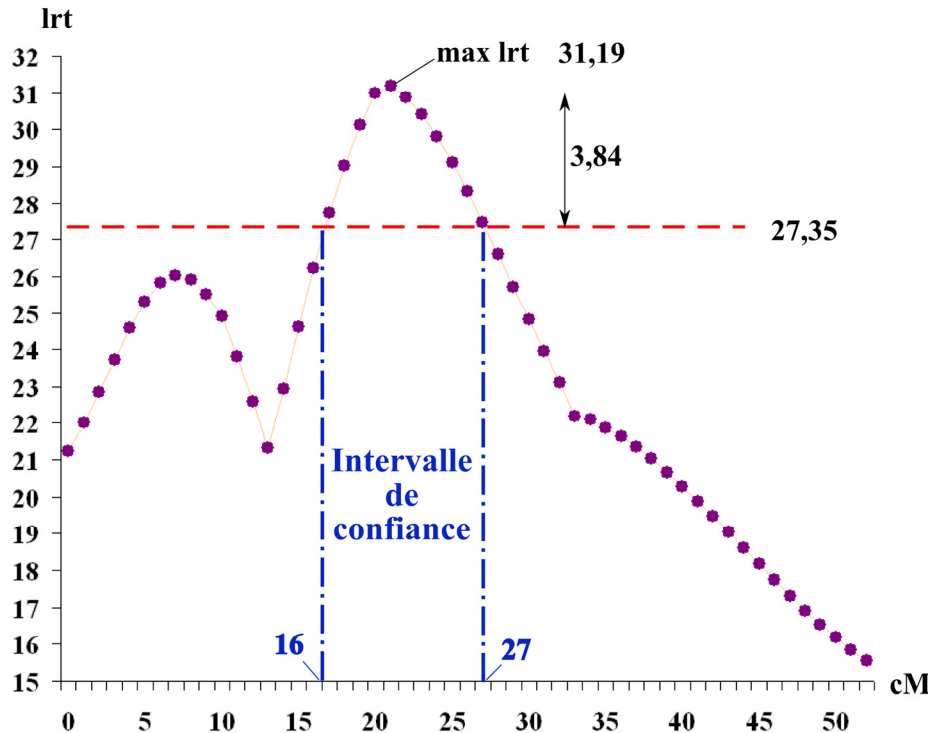


Figure 17 : Représentation de la détermination de l'intervalle de confiance au QTL par la méthode du "Lod drop-off" (Lander et Kruglyak, 1995) pour un QTL détecté dans cette étude.

1.6. Densité des cartes génétiques et nombre de recombinants, des facteurs limitants

Lors de l'établissement d'un protocole de détection de QTL, il est important de définir les facteurs limitant la localisation fine des loci. Cela permet par la suite de connaître l'existence de leviers manipulables pour des études complémentaires.

La notion de densité en marqueurs est très importante. Alors qu'une densité maximale chez les animaux d'élevage est estimée à un marqueur tous les 10 kilobases (nécessitant une puce de 300 000 marqueurs pour le génotypage), un dispositif comme le nôtre présente une distance moyenne entre marqueurs de l'ordre de 20cM. Cela suggère que chaque région QTL qui sera détectée ici sera couverte par 3 marqueurs maximum, sans être sûr de l'informativité de ces derniers aux positions considérées.

Mais posséder une bonne couverture en marqueurs n'est pas suffisant, le nombre de recombinaisons informatives l'est tout autant (Darvasi *et al.*, 1993). En effet, le nombre de recombinaisons observées joue directement sur l'efficacité de la détection de QTL. Par définition, il se produit une recombinaison toutes les 100 méioses entre deux marqueurs séparés de 1 cM. Ainsi, un dispositif avec 1000 descendants ne permet d'espérer qu'une petite dizaine de recombinaisons par cM. Dans un protocole de 5 familles de plus de 200 individus

comme c'est le cas ici, nous nous attendons à n'observer que quelques recombinaisons par cM, ce qui limite la précision de la localisation de QTL à des segments de plusieurs dizaines de cM. Pour des méthodes de cartographie fine, il est essentiel de disposer de nombreuses recombinaisons et de pouvoir les identifier. Afin d'augmenter le nombre de méioses observées sans modifier les effectifs, il est possible de se servir de familles de plein-frères permettant l'utilisation de l'information des deux méioses parentales pour chaque famille et ainsi de doubler la proportion théorique de recombinants. Le fait d'utiliser comme modèle biologique un poisson téléostéen pouvant générer de très nombreux descendants par couple est ici un atout majeur. Enfin, afin d'augmenter l'informativité des méioses, il est souvent proposé de maximiser la proportion de parents hétérozygotes au QTL. Pour cela, des croisements entre animaux divergents *a priori* pour les caractères étudiés sont effectués pour produire des F1, parents d'un dispositif F2. C'est dans cette optique que nous avons choisi d'utiliser les descendants de deux lignées de truites arc-en-ciel divergentes. Ces deux lignées, nommées HR et LR, présentent respectivement de forts et faibles niveaux de cortisol plasmatique après un stress (Pottinger et Carrick, 1999a, 1999b). Le cortisol est connu pour être l'hormone du stress. Cependant, elle possède la particularité chez le poisson téléostéen d'être impliquée dans les processus d'acclimatation à l'eau de mer (McCormick, 2001 ; Sakamoto *et al.*, 2001). Ces deux lignées, et leur descendance, représentent donc un matériel biologique de premier choix pour la détection de QTL en lien avec les capacités de réponse à un challenge osmotique chez la truite arc-en-ciel.

Dans cette étude, nous décidons de nous focaliser sur les niveaux d'ions plasmatiques en chlore et sodium pour classer nos individus en fonction de leurs capacités de réponse à un challenge hyperosmotique. D'un autre côté, comme la branchie représente le principal organe osmorégulateur, nous utiliserons également comme caractère le poids branchial afin de voir si les résultats obtenus avec ce paramètre morphologique peuvent être reliés à ceux obtenus avec les caractères plasmatiques.

Ces caractères seront ici exploités pour identifier la présence de QTL de l'acclimatation à l'eau de mer suite à un challenge hyperosmotique. Le génome de la truite n'étant pas séquencé, et la couverture en marqueurs génétiques polymorphes étant assez réduite (à savoir moins de 1300 marqueurs potentiels décrits), l'utilisation d'analyses de liaison par cartographie d'intervalle semble la méthode la plus appropriée pour identifier des candidats positionnels (gènes ou groupes de gènes) impliqués dans l'acclimatation à un changement de salinité.

2. *QTL et aquaculture*

La détection de QTL en lien avec des caractères économiquement intéressants est un défi pour les généticiens. Pas moins de 10 000 travaux traitant de la recherche de QTL dans les règnes végétal et animal ont été menés ces 15 dernières années. Il s'agit aujourd'hui d'une pratique courante pour analyser la composante génétique responsable de la variabilité d'un caractère chez de nombreuses espèces, même si les connaissances de ces dernières sont parfois limitées. Bien sûr la très grande majorité de ces caractères est liée à une notion directe (croissance, proportion de muscle) ou indirecte (résistance aux maladies) de productivité. L'approche QTL peut ainsi aider des professionnels à sélectionner des reproducteurs. L'approche génétique est utilisée depuis longtemps avec succès chez les animaux d'élevage pour améliorer les productions. L'aquaculture, dont les activités sont en constante augmentation depuis les années 70, se tourne de plus en plus vers ce type d'approche. Le développement du nombre des études de type QTL permettra de mieux avancer dans la détermination de l'intérêt et de la faisabilité de ces approches dans les schémas aquacoles.

Nous avons la chance en aquaculture de profiter des enseignements de l'agriculture qui a été pionnière en recherche de QTL. Quand 3347 travaux ont été publiés en QTL animal depuis 1995, seulement 142 étaient en lien avec l'aquaculture dont près des $\frac{3}{4}$ avec les salmonidés (ISI WOK, Septembre 2010). Le développement des connaissances liées à la sélection d'espèces terriennes (utilisation des biotechnologies, évolution des schémas de sélection) ayant commencé très tôt et évolué très vite, cela profite au secteur aquacole dont beaucoup de principes de domestication restent encore très contemporains. Le fait que de nombreuses technologies (séquençage d'ADN, puce à ADN, etc.) aient fait leur preuve et se soient fortement développées dans le domaine agricole, implique une baisse des tarifs liée à l'intensification de leur utilisation. Ceci rend alors possible leur application chez des espèces de moindre importance économique comme le téléostéen.

3. *Article QTL*

Cette troisième partie consiste en un article soumis pour une parution dans la revue BMC Genetics.

Detection of QTL with effects on osmoregulation capacities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Yvan Le Bras^{1*}, Nicolas Dechamp^{2*}, Francine Krieg², Olivier Filangi^{5,6}, René Guyomard², Mekki Boussaha², Henk Bovenhuis³, Tom G. Pottinger⁴, Patrick Prunet¹, Pascale Le Roy^{5,6}, Edwige Quillet^{2§}

¹ INRA, UR1037 SCRIBE, IFR 140, F-35000 Rennes, France

² INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France

³ Animal Breeding and Genetics Group, Wageningen University, P.O. Box 338, NL-6700AH, Wageningen, The Netherlands

⁴ Centre for Ecology and Hydrology, Lancaster Environment Centre, Bailrigg, Lancaster LA1 4AP, United Kingdom.

⁵ INRA, UMR0598 Génétique Animale, F-35000France

⁶ Agrocampus Ouest, UMR0598 Génétique Animale, F-35000 Rennes, France

* These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

YLB : Yvan.Lebras@rennes.inra.fr

ND : Nicolas.Dechamp@jouy.inra.fr

FK : Francine.Krieg@jouy.inra.fr

OF : Olivier.Filangi@rennes.inra.fr

RG: Rene.Guyomard@jouy.inra.fr

MB: Mekki.Boussaha@jouy.inra.fr

HB : Henk.Bovenhuis@wur.nl

TGP : tgp@ceh.ac.uk

PP: Patrick.Prunet@rennes.inra.fr

PLR: Pascale.Leroy@rennes.inra.fr

EQ: Edwige.Quillet@jouy.inra.fr

1 **ABSTRACT**

2 **Background**

3 There is increasing evidence that the ability to adapt to seawater in teleost fish is modulated
4 by genetic factors. Most studies have involved the comparison of species or strains and little
5 is known about the genetic architecture of the trait. To address this question, we searched for
6 QTL affecting osmoregulation capacities after transfer to saline water in a nonmigratory
7 captive-bred population of rainbow trout.

8 **Results**

9 A QTL design (5 full-sib families, about 200 F2 progeny each) was produced from a cross
10 between F0 grand-parents previously selected during two generations for a high or a low
11 cortisol response after a standardized confinement stress. When fish were about 18 months
12 old (204 g body weight), individual progeny were submitted to two successive hyper-osmotic
13 challenges (30g of salt/L) at a 14 d interval. Plasma chloride and sodium concentrations were
14 recorded 24h after each transfer. After the second challenge, fish were sacrificed and gill
15 index (weight of total gill arches corrected for body weight) was recorded. The genome scan
16 was performed with 196 microsatellites and 85 SNP markers. Unitrait and multitrait QTL
17 analyses were carried out on the whole dataset (5 families) through interval mapping methods
18 with the QTLMap software. A total of 15 and 7 QTL was detected ($P < 0.10$) for plasma ion
19 concentrations and gill index respectively. Among the most significant QTL, three affected
20 concentrations of both chloride and sodium during both challenges, two were specific to
21 either chloride or sodium concentrations, three QTL were specific to gill index, and three
22 affected both gill index and ionic concentrations in plasma. Altogether, allelic effects were
23 consistent for QTL affecting chloride and sodium concentrations but inconsistent for QTL
24 affecting ionic concentrations and gill morphology. There was no systematic lineage effect
25 (grand-parental origin of QTL alleles) on the recorded traits.

26 **Conclusions**

27 For the first time, genomic loci associated with effects on major physiological components of
28 osmotic adaptation to seawater in a nonmigratory fish were revealed. The results pave the way
29 for further deciphering of the complex regulatory mechanisms underlying seawater adaptation
30 and genes involved in osmoregulatory physiology in rainbow trout and other euryhaline
31 fishes.

32

33

34 **Background**

35 The expansion of intensive aquaculture for salmonids in seawater net pens in Europe
36 and western North America has heightened interest in genetic studies of a number of
37 production traits in these species. Particularly well studied are aquacultured species such as
38 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which include both migratory and nonmigratory forms.

39 Specific attention is paid to the development of rainbow trout aquaculture in the
40 marine environment in estuarine or coastal areas as various studies have shown better growth
41 in such environments compared to freshwater [1,2,3]. Strains that naturally smoltify, a
42 complex physiological and behavioural change that pre-adapts the fish to a high salinity
43 environment, can be used for such purposes. However, nonmigratory populations can also be
44 successfully reared in seawater.

45 The ability of rainbow trout to adapt to seawater (SW) depends on the development of
46 branchial ionoregulatory mechanisms. In a hyperosmotic environment (SW), teleost fish tend
47 to lose water through osmosis and gain ions (essentially Na⁺ and Cl⁻) through diffusion.
48 Active re-equilibrium of the fish hydromineral balance mainly relies on ingestion of SW and
49 active excretion of Na⁺ and Cl⁻. In freshwater (FW), the reverse mechanisms occur (see
50 review by Evans *et al.* [4]). Numerous studies have investigated the activity of ion-
51 transporters during acclimation to SW, particularly at the gill epithelium. They recorded the
52 development of an active excretion of Na⁺ and Cl⁻, the resulting large Na⁺ and Cl⁻ efflux
53 finally leading to the regulation of plasma Na⁺ and Cl⁻ plasmatic levels. These effluxes rely
54 on branchial epithelial transporters such as Na⁺/K⁺-ATPase and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ for Na⁺ and
55 CFTR for Cl⁻ (see review Hwang and Lee [5]; Evans *et al.* [4]). The mechanisms underlying
56 euryhalinity, and their regulation, have been widely studied in fish species including rainbow
57 trout which is a model fish species for the study of osmoregulation in fish.

58 Several studies have clearly shown that the size of the fish and protocol of transfer (for
59 example the salinity gradient) from FW to SW are key parameters for successful adaptation of
60 rainbow trout to hyperosmotic environment [3,6]. Genetic factors can also contribute to the
61 ability of fish to adapt to SW environment. Differences among two reciprocal interspecific
62 hybrid bass populations between white bass (*Morone chrysops*) and striped bass (*Morone*
63 *saxatilis*) were shown for plasma osmolality during acclimatation to salinity [7]. Differences
64 between lagoon and marine sea bass before and after freshwater acclimation have also been
65 reported by Allegrucci *et al.* [8]. The inheritance of smoltification has been examined in
66 several salmonid species including steelhead trout (the migratory form of rainbow trout)
67 [9,10,11]. These studies suggest that both the timing and propensity to smoltification are
68 under genetic control. Another well known example is the comparison between migratory
69 (anadromous) and nonmigratory populations of Atlantic salmon. Surveys of landlocked
70 Atlantic salmon from North America and Europe have shown differences in the capacity of
71 these strains to adapt to SW [12,13,14,15]. Comparison of the osmoregulatory mechanisms
72 has been also carried out between a landlocked and an anadromous Atlantic salmon strains
73 and has highlighted differences in SW tolerance. Moreover, the analysis of osmoregulatory
74 mechanisms at the level of gill has shown that differential expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase
75 1a, -α1b and -α3 isoforms associated with Na⁺/K⁺-ATPase activity may be important for
76 osmoregulatory differences observed between these two strains [16,17].

77 The recent development of genetic resources in rainbow trout, including genetic
78 markers and medium density genetic maps [18,19,20] provides the foundation for deeper
79 biological understanding of phenotypic patterns of importance for farming. The identification
80 of QTL (Quantitative Trait Loci) paves the way for a precise investigation of the molecular
81 genetic basis of traits. While many QTL studies have already been implemented for a range of
82 traits, including growth [21], disease resistance [18,22,23,24,25], temperature tolerance [26],

83 cortisol responsiveness [27] and early maturation [28], very little has been done regarding
84 osmoregulation capacities in this species. Nichols *et al.* [10] performed a QTL study for
85 smoltification-related traits using a cross between nonmigratory (rainbow) and migratory
86 (steelhead) trout lines. However, the study mainly focused on growth and morphological traits
87 (body shape, skin reflectance) while no significant QTL was detected for the gill Na^+/K^+ -
88 ATPase activity, a key branchial epithelial Na^+ transporter.

89 In this study, we worked with rainbow trout individuals that were transferred from FW to SW
90 and performed a QTL analysis for plasma Na^+ and Cl^- levels, which are the standard
91 physiological parameters used as reference in fish osmoregulatory studies aiming at
92 characterizing ability for fish to adapt in hyperosmotic environment ([29], [30], [31]). In
93 addition, we were also interested in gill size which could be related to salinity adaptation. A
94 QTL design was produced using rainbow trout lines previously selected for high (HR) or low
95 (LR) cortisol responsiveness to an acute confinement stressor ([32]). Cortisol is a major
96 hormone regulating stress responses but also a major osmoregulatory hormone. Though
97 mechanisms induced by confinement and salinity stressors may not be the same, the HR and
98 LR lines are expected to differ for the responsiveness of the corticotrope axis and thus
99 represented highly relevant biological material for this QTL experimental design.

100 **Methods**

101 **Experimental design and fish rearing conditions**

102 Grand-parental brood stock belonged to two *O. mykiss* lines (HR and LR), previously selected
103 for divergent plasma cortisol responsiveness to a standardized confinement stress [32,33]. F1
104 parents were produced by mating single individuals within the second generation of selected
105 HR and LR individuals, one from each line. The next generation, 5 F1 males and 5 F1 females
106 were single pair mated in order to produce the 5 F2 full sib families used for QTL detection

107 (X3, X4, X8, X14 and X17). All fish (F0, F1 and F2 families) were maintained at the CEH
108 experimental fish facilities (Windermere, UK).

109 Fertilization was performed in January, 2006, employing standard stripping and fertilization
110 methods. When the fish were about 11 months old, 215 individuals per family were randomly
111 sampled, individually tagged with passive integrated transponders (PIT; Trovan ID100A), fin
112 clipped for further DNA extraction and distributed into ten holding tanks (1000 litre), with
113 each family held in two tanks. Each tank was supplied with a constant flow of lake water (25
114 l/min) at ambient temperature. The fish were monitored closely and fed approx 2% body
115 weight, 3 days per week (Skretting Standard Expanded 40). As part of the EU Aquafirst
116 project, fish were submitted to two successive rounds of confinement stress when they were
117 about 15 months old. At the end of the confinement challenge, each family was distributed
118 into holding tanks of similar density (around 40 to 50 fish per tank, i.e. 5 to 6 tanks per family
119 depending on the family size). Fish were allowed to recover until the commencement of the
120 osmotic challenge (18 months old).

121 The experimental work at Windermere was carried out under the UK Animals (Scientific
122 Procedures) Act 1986, Project Licence no. 40/2600.

123 **Osmotic challenge and measurements**

124 Each fish was tested twice with a 14 days interval. Exposure to salt water was carried out in a
125 series of 20 plastic tanks that were filled with 150 litres of lake water containing 4500g Red
126 Sea Coral Reef Salt (30 g/litre) and continuously aerated and fitted with an opaque lid. The
127 contents of a single holding tank (40 to 50 fish) were accommodated in four salinity test tanks
128 allowing the contents of four holding tanks to be tested on each working day. The fish were
129 transferred on day 1 and, as osmotic stress acclimation is a temporal process, they were
130 sampled exactly 24h later, on day 2, corresponding to the maximum expected level of ionic
131 content response time. Fish were netted from the salinity test tanks and anaesthetized in

132 buckets containing 2-phenoxyethanol (1:2000) before being blood sampled and identified by
133 PIT tag. Blood was collected from the Cuvierian sinus into heparinised syringes and plasma
134 was stored frozen until required for determination of plasma chloride and sodium
135 concentrations. Fish were returned to their holding tanks to recover. During the first test, body
136 weight and fork length were recorded for each fish.

137 Plasma sodium and chloride levels were measured by flame photometry (VWR international,
138 Fontenay-sous-bois, France) and colorimetry (chlorure LDM SOBIODA[®]) [34]. Sodium and
139 chloride samples were diluted respectively to 1/400 and 1:2 with distilled water. Sodium and
140 chloride measurements were performed in duplicate and triplicate respectively. Sodium values
141 from the first and second challenge were named Na⁺¹ and Na⁺² respectively, as for the
142 chloride values named Cl⁻¹ and Cl⁻².

143 Fish were sacrificed about 2 months after the end of the second challenge. At that time, the
144 whole body weight, the weight of gill archs (including gill filaments, limb and gill rakers) and
145 sex (macroscopic examination of the gonads) were recorded for the remaining individuals.
146 The relative gill weight (gill weight corrected for body weight, named gill index) was
147 included in the present study, with the intention of investigating possible links between gill
148 size and osmoregulation capacities. Indeed, a preliminary survey of gill morphology in 40 fish
149 from HR and LR lines revealed that LR individuals had larger gill arches in term of weight
150 and surface area. It was assumed that the individual relative gill weight remains stable across
151 short periods of time and at the time of terminal sampling was still representative of the
152 morphology at the time of osmotic challenge.

153 **Genotyping and genetic map**

154 The genome scan was performed using microsatellites and SNP markers. Microsatellites were
155 chosen from the INRA reference linkages maps [19]. In a first step, 201 microsatellites
156 chosen on the basis of their map position were screened for polymorphism in the original HR

157 and LR lines, and a sub-set of 138 was retained for further genotyping. In a second step, in
158 order to improve the genome coverage within every family, additional markers were selected
159 in genomic regions still poorly covered and were tested for polymorphism in the 5 QTL
160 families. In the end, a set of 196 microsatellites, including 13 duplicated markers, was used.
161 Among those, 49 were genotyped by LABOGENA (Jouy-en-Josas, France) while the others
162 were genotyped at INRA-GABI. SNP markers designed by Krieg *et al.* (in preparation) were
163 screened for polymorphism in the QTL families and 85 (see GenBank dbSNP submission
164 numbers in Additional file 1) were retained for the genome scan and genotyped by Genoscope
165 using SNPlex Genotyping System (Applied Biosystem). The overall polymorphism
166 information content (PIC) of markers was 0.51 for microsatellites and 0.30 for SNP. The
167 mean PIC per linkage group ranged from 0.32 to 0.65.

168 Genetic consensus linkage maps were rebuilt for the families of the QTL design including the
169 whole set of markers and using the Carthagene software [35]. The total length of the map was
170 3182 cM, so that the mean overall spacing for genome coverage was about 16 cM (3 to 16
171 markers per linkage group; 179 to 206 informative markers per family). Linkage groups were
172 named according to Guyomard *et al.* [19].

173

174 **Statistical analyses**

175 ***Description of traits***

176 We first provided some description of the raw data, *i.e.* for the five traits of interest (Na^+1 ,
177 Na^+2 , Cl^-1 , Cl^-2 and gill index), we checked whether the rank of challenge (first vs second
178 challenge) on one hand and the different families on the other hand significantly affected the
179 traits. The significance of these two factors was tested using linear model SAS version 9 [36]
180 GLM procedure at the 5% level.

181

182 **Sources of variability**

183 In order to choose a model for further analyses, the effects of several fixed effects and co-
 184 factors were tested for every trait. The SAS 9 [36] GLM procedure was applied to an overall
 185 model which included tested factors and the full-sib family effect. For plasma ion values
 186 (Na+1, Na+2, Cl-1, Cl-2) the overall model was:

$$187 \quad Y_{ijklmn} = \mu + \text{Sex}_i + \text{Date}_j + \text{Htank}(\text{date})_{jk} + \text{Ctank}_l + \text{Cross}_m + \beta_1 * \text{weight} + \beta_2 * \text{length} + e_{ijklmn}$$

188 (1)

189 where

190 Y_{ijklmn} is the progeny phenotype (plasma ion values)

191 μ is the general mean of the model

192 Sex_i is the fixed effect of sex i with 2 levels (male and female)

193 Date_j is the fixed effect of the date j of challenge (6 levels)

194 $\text{Htank}(\text{date})_{jk}$ is the fixed effect of the holding tank k within date j (21 levels)

195 Ctank_l is the fixed effect of the challenge tank l (20 levels)

196 Cross_m is the fixed effect of the full-sib family m (5 levels)

197 weight is the body weight at the first challenge considered as a covariable

198 length is the fork length at the first challenge considered as a covariable

199 and e_{ijklmn} is the residual of the model supposed normally distributed with a mean 0 and

200 a variance σ_e^2 .

201 For gill weight, the model was adapted to take into account further changes in the
 202 management of fish between the end of challenge and measurements of sex and gill weight.

$$203 \quad Y_{ijklm} = \mu + \text{Sex}_i + \text{Group}_j + \text{Htank}_k + \text{Cross}_l + \beta_1 * \text{weight} + \beta_2 * \text{length} + e_{ijklm} \quad (2)$$

204 where

205 Y_{ijklm} is the progeny gill weight value

206 μ is the general mean of the model

207 Sex_i is the fixed effect of sex i with 2 levels (male and female)
 208 Group_j is the fixed effect of the date j at weighing (2 levels, as after challenge 2, fish
 209 were redistributed in 2 groups that were slaughtered with several weeks delay)
 210 Htank_k if the fixed effect of the holding tank k (12 levels)
 211 Cross_l is the fixed effect of the full-sib family l (5 levels)
 212 weight is the body weight at the date of measurement considered as a covariable
 213 length is the fork length at the date of measurement considered as a covariable
 214 and e_{ijklm} is the residual of the model supposed normally distributed with a mean 0 and
 215 a variance σ_e^2 .

216 Factors having a P-value equal or under 0.2 in these pre-analyses were kept in the final
 217 models. Model (1) for ion plasmatic concentrations revealed that all effects but sex and fork
 218 length were significant at the 0.20 level. Model (2) for gill index indicated that body weight,
 219 sex (males having heavier gills than females) and Group were significant at the 0.20 level.
 220 Thus, the final models used in further analyses were as follows:

221 For plasma ion concentrations (both challenges):

$$222 \quad Y_{ijklmn} = \mu + \text{date}_j + \text{Htank}(\text{date})_{jk} + \text{Ctank}_l + \beta_1 * \text{weight} + E_{ijklmn} \quad (3)$$

223 For gillindex:

$$224 \quad Y_{ijklm} = \mu + \text{sex}_i + \text{Group}_j + \beta_1 * \text{weight} + E_{ijklm} \quad (4)$$

225 ***Phenotypic correlations***

226 Models (3) and (4) were applied to adjust raw data for fixed effects and co-factors using the
 227 SAS GLM procedure. The Pearson coefficients of correlation were then determined with the
 228 Procedure CORR of SAS version 9 [36] applied on residual values of these models
 229 (phenotypic correlations).

230 ***QTL detection***

231 QTLMap software [37] was used for QTL detection, scanning for QTL every 1 cM in the
232 genome. An interval mapping method described by Elsen et al. [38] was applied considering a
233 set of non-related full-sib families design and making no assumption about allele numbers or
234 allele frequencies at QTL within founder populations. QTL effects are thus estimated, for
235 each sire and each dam, as the allelic substitution effects. The statistical test used to compare
236 the hypotheses of the presence of one QTL (H1) vs no QTL (H0) at one location was an
237 approximate likelihood ratio test (LRT) [39]. The empirical distribution of LRT was obtained
238 from 1000 simulations under the null hypothesis, with a trait heritability fixed to 0.5, for each
239 trait and each linkage group. Thresholds of H0 rejection (P-value = 0.001, 0.01, 0.05 and
240 0.10) at the chromosome level, were then estimated with the method described in [40]. A
241 QTL with a P-value <0.10 at the chromosome level was retained as suggestive, and a QTL
242 with a P-value < 0.05 at the chromosome level was retained as significant [41]. The widely
243 used "one LOD drop-off method" was applied to obtain 95% confidence intervals of the QTL
244 location [42]. Finally, the status of the sires and dams for QTL (heterozygous vs homozygous)
245 was tested using a t-test (P<0.05). As grand-parents had been genotyped, the lineage origin,
246 *i.e.* HR or LR, of each QTL allele of heterozygous parent could be deduced.

247 In a first step, univariate analyses were carried out trait by trait and multivariate QTL analyses
248 were performed in a second step. We applied a multivariate model with a multinormal
249 penetrance distribution, which is the most powerful and accurate method [42]. In both unitrait
250 and multiple traits analyses, the phenotypic models (3) and (4) were given as input of the
251 QTLMap software for the analysis of raw data.

252 **Results**

253 **Traits description**

254 The number of recorded individuals, family means, overall means and standard
255 deviations of the different traits (raw data) are given in Table 1.

256 Figure 1 illustrates the effect of the challenge (first vs second challenge), with a
257 marked increase of plasma sodium concentrations during the second challenge relative to the
258 first (+8.5% in average, $P < 0.01$, from +5.7 to +10.7% depending on the family) whereas
259 chloride concentrations were lower during the second challenge (-1.2% in average, $P < 0.05$,
260 from -10% to +5% depending on the family) than during the first. Significant family
261 differences ($P < 0.01$) were found only for Na^{+2} and gill index. For other traits (Na^{+1} , Cl^{-1} and
262 Cl^{-2}), family effect was not significant ($P > 0.05$).

263 **Phenotypic correlations**

264 As shown in Table 2, the phenotypic correlation between the values of sodium and chloride
265 concentrations at the two challenges was high for sodium (Pearson coefficient of correlation
266 $R = 0.67$) but low for chloride ($R = 0.08$). Within challenge, the phenotypic correlation between
267 sodium and chloride concentrations was moderate ($R = 0.21$). No significant phenotypic
268 correlation was detected between gill index and any of the plasma ion concentrations.

269 **QTL detection**

270 *Results of univariate analyses.* Univariate analyses highlighted the existence of fifteen
271 chromosome-wide QTL ($P < 0.10$), eleven affecting plasma ionic concentrations and four
272 affecting gill index (Table 3).

273 Five QTL distributed on four linkage groups (RT14, RT19, RT29, RT31) were found
274 for plasma sodium concentrations (Na^{+1} or Na^{+2}). Linkage group RT14 harboured QTL for
275 Na^{+2} ($P < 0.05$) and likely for Na^{+1} too ($P < 0.10$), but there was no overlap between the QTL
276 locations, indicating that the QTL involved in the two successive challenges may not be the
277 same. Two QTL were associated with Cl^{-1} (RT25, $P < 0.05$ and RT26, $P < 0.10$), and four were
278 associated with Cl^{-2} (RT8, RT10, RT19 and RT21). The QTL located on RT10 was the most
279 significant ($P < 0.01$). Again, no common QTL between the two successive challenges was
280 detected. Overall, QTL for sodium and chloride concentrations were localized to different

281 regions of the genome. Yet, at the second challenge, QTL detected on RT19 for Na⁺2 and Cl⁻2
282 overlapped suggesting the existence of a QTL possibly affecting both traits.

283 Most QTL for gill index were found on linkage groups different from those harbouring
284 QTL for plasma ion concentrations, with the exception of RT26 where a QTL for Cl⁻1
285 overlapped the QTL for gill index.

286 Many QTL were segregating in several families. Eight QTL were detected in more
287 than 3 families, and up to 7 heterozygous parents were detected for some QTL. Most often,
288 the QTL allele that increased sodium or chloride concentrations originated from the LR
289 grand-parent (40 cases out of 58 significant allelic contrasts). This tendency remained the
290 same when only the most significant QTL (RT10, RT14 and RT19) were considered (18 cases
291 out of 28). On the other hand, QTL alleles that increased gill index were equally distributed
292 among LR and HR origin (9 cases in each group), though the lineage effect may differ
293 according to the locus (increasing effect of HR alleles at RT9 and RT15 and decreasing effect
294 on RT26 and RT27).

295 Mean QTL effects ranged from 0.29 to 0.55 phenotypic standard deviation. The
296 largest allelic effects were identified for chloride concentrations (more than 0.8 phenotypic
297 SD in some families).

298 ***Results of multivariate analyses.*** Altogether, multiple traits analyses detected
299 seventeen chromosome-wide QTL ($P < 0.10$), among which three affected gill index (Table 4).

300 For ionic concentrations, multitrait analyses confirmed the existence and location of
301 several of the QTL previously detected in unitrait analysis (RT10, RT26, RT19). It evidenced
302 that those QTL steadily affected the target trait in the two successive challenges or
303 consistently affected both sodium and chloride concentrations. Thus, the QTL for chloride
304 concentration on RT26, which was detected in unitrait analysis for the first challenge only,

305 was found again ($P < 0.10$) for both Cl⁻1 and Cl⁻2 in multitrait analysis. The highly significant
306 QTL on RT10 for chloride concentration at the second challenge was confirmed at the first
307 challenge (Cl⁻1-Cl⁻2 multiple traits analysis, Table 4), and multitrait analysis also revealed an
308 effect of this QTL on sodium concentration at both challenges (Na⁺2-Cl⁻2 and plasma
309 multiple traits analysis). In the two-traits analysis for challenge 2, this QTL was significant at
310 the genome-wise level ($P < 0.05$). Finally, multitrait analysis underlined the role of the QTL
311 on RT19 on both chloride and sodium concentrations at the first challenge, as well as at the
312 second one as previously found. In all cases, locations of the QTL revealed in the different
313 analyses were quite consistent (Table 3). Multitrait analysis also confirmed that RT14
314 harbours QTL affecting sodium concentrations at both challenges. However, locations did not
315 support the hypothesis of a single QTL for all traits (two QTL at 0 and 66 cM in unitrait
316 analysis, and one QTL at 27cM in multitrait analysis, with no overlap). Further testing for the
317 presence of 2 QTL vs 1 QTL on the linkage group did not indicate the presence of 2 distinct
318 QTL (data not shown).

319 Novel QTL affecting plasma ion concentrations were discovered (RT4, RT5, RT7,
320 RT9, RT23). Most of them, with the exception of QTL on RT4, were suggestive only
321 ($P < 0.10$). Nevertheless, three of them were detected in several multiple traits analyses at very
322 consistent locations (RT4, RT5, RT23). All newly discovered QTL affected concentrations of
323 both ions (sodium and chloride). Two of them were specific to the challenge (QTL on RT7 for
324 challenge 1 and QTL on RT9 for challenge 2), but were significant at $P < 0.10$ only.

325 Altogether, considering both significance levels and consistency of the different
326 analyses, the most relevant QTL for ionic concentrations were those associated with the
327 linkage groups RT26 (chloride concentration at both challenges), RT14 (sodium concentration
328 at both challenges) and RT4, RT10 and RT19 (both chloride and sodium concentrations at
329 both challenges).

330 Allelic effects at the different QTL tended to be consistent for both ions, *i.e.* an allele
331 that increased chloride concentration also had an increasing effect on sodium concentration,
332 but opposite effects could be recorded (often for an allelic effect near the significance
333 threshold). For instance, considering the three most relevant QTL affecting both ionic
334 concentrations, 10 out of the 12 QTL affecting both ions exhibited consistent allelic effects.
335 Allelic effects on ion plasma concentrations also varied according to QTL and lineage origin.
336 While HR alleles decreased chloride and sodium concentrations at QTL on linkage groups
337 RT19 and RT26 as previously observed in unisearch analysis, they tended to be mostly
338 associated with higher plasma concentrations at QTL on RT5, RT9 and RT23.

339 Considering the gill index, multitrait analysis detected three QTL that were not found
340 with unisearch analysis (multiple traits analysis with all traits, Table 4). The new QTL were also
341 steadily involved in the control of plasma ionic concentrations in both challenges (RT4, RT10
342 and RT19). Depending on the parent and QTL, increased gill weight could be associated with
343 increased plasma ion concentrations (14 cases out of 22). Linkage group RT9 that was
344 identified as harbouring QTL for gill index in unisearch analysis (Table 3) was also identified as
345 harbouring a suggestive QTL for ionic concentrations at the second challenge in the multitrait
346 analysis (Table 4) but locations indicated that it is unlikely to be the same QTL.

347 There is no evidence of any lineage effect on the value of gill index. Moreover, there
348 is no consistency between QTL allelic effects on gill index and on ionic concentrations, *i.e.* an
349 allele increasing relative gill weight may be associated with either an increase or a decrease of
350 post-challenge ionic concentrations in the plasma.

351 Altogether, considering both unisearch and multitrait analyses, seventeen different
352 suggestive QTL were found on sixteen linkage groups of the rainbow trout genome (Figure
353 2). For post-challenge ionic concentrations in plasma, fifteen QTL were identified among

354 which five affected both sodium and chloride concentrations while five affected chloride
355 concentrations only and five others affected sodium concentrations only. Seven QTL were
356 discovered for gill weight. Considering the levels of significance and the consistency of
357 results among univariate and multivariate analyses, five QTL for ionic concentrations were
358 underlined (RT4, RT10, RT14, RT19 and RT26), QTL on linkage groups RT10 and RT19
359 (affecting chloride and sodium at both challenges) being the most significant. For gill index,
360 three of the QTL were specific to the trait, while the four others were also identified as QTL
361 for post-challenge ionic concentration, including RT10 and RT19.

362 **Discussion**

363 In this study, we have identified several genomic regions associated with the variability of
364 response to a hyper-osmotic stress in rainbow trout. To our knowledge, this is the first
365 description of QTL affecting plasma indicators of the status of the hydromineral balance after
366 an osmotic challenge in a euryhaline fish. Our results strengthen and extend previous studies
367 which suggested that genetic factors are likely to influence the ability to adapt to high salinity
368 in teleost fish. These studies were based on the comparison of different species and their
369 hybrids (as in tilapia [43, 7]) or on the comparison of different strains or populations in teleost
370 fish on striped bass [8], salmon [13, 14, 16, 17, 44] and arctic charr [15]. The discovery of
371 QTL associated with osmoregulatory ability in rainbow trout paves the way for further
372 understanding of the regulatory mechanisms and physiological pathways involved in the
373 control of hydromineral balance in this species.

374 We identified several QTL contributing to the variation of plasma ion concentrations after
375 exposure to the salinity challenge. The plasma levels of chloride and sodium, the two main
376 ions responsible for plasma osmotic pressure, are key indicators of the regulation of the

377 hydromineral balance and consequently were chosen to monitor the adaptation to 30‰
378 salinity at the individual level in QTL progenies.

379 Two significant QTL (on RT10 and RT19) and two suggestive QTL (on RT4 and RT5) were
380 found to control the variation of both ions during the two successive challenges. Moreover, in
381 most cases, the QTL affected both concentrations in the same direction. There is no data about
382 the value of the genetic correlation between the two ion concentrations in the plasma and the
383 genetic structure of our sample (5 full-sib families) did not allow a reliable estimate of it. Yet,
384 this result is consistent with our observation that the individual plasma values of Na⁺ and Cl⁻
385 are significantly correlated within challenges and strongly supports our present knowledge of
386 the hypoosmoregulatory mechanisms in seawater which indicate that Na⁺ and Cl⁻ extrusions
387 are different but coupled mechanisms. The current model for NaCl extrusion at the gill
388 epithelium proposes a basolateral co-transport of Na⁺ and Cl⁻ down the electrochemical
389 gradient produced by NKCC co-transporter coupled with an apical extrusion of Cl⁻ via a low
390 conductance anion channel and a paracellular extrusion of Na⁺ through Na⁺-K⁺-ATPase
391 transporter and diffusion towards the external medium down its electrochemical gradient (see
392 reviews Evans *et al.* [4]; Hwang and Lee [5]). The morpho-functional modification of the gill
393 epithelium characterized by the development of leaky junctions and also accessory cells are
394 fundamental for efficient extrusion of Cl⁻ and Na⁺ at the level of gill [45]. Whether these
395 common QTL correspond to genes encoding major regulators of these cellular changes would
396 be an interesting hypothesis to test.

397

398 We also found QTL affecting the concentration of one only of the two ions. For sodium, the
399 most significant QTL affected ionic concentration at the second challenge (P<0.05), and was
400 located on RT14. For chloride, one QTL was consistently revealed on RT26, and an

401 additional one may be located on RT25 ($P < 0.05$, in univariate analysis only). Taken all round,
402 the levels of significance of those QTL remain moderate and the power of our design may
403 have impeded the detection of some effect on the alternative ion. Nevertheless, this result may
404 also indicate that the regulation of plasma sodium and chloride partially relies on ion-specific
405 mechanisms. Based on our present knowledge of the cellular mechanisms responsible for Na^+
406 and Cl^- extrusion in hyperosmotic environment (review Marshall and Bellamy [46]), one
407 could hypothesize an association between QTL and one of the ion transporters characterized at
408 the level of the gill epithelium. Additional information may have come from the genes in
409 which the SNP used for the genome scan have been detected. Yet, the scrutiny of the known
410 biological function of these genes (Gene Ontology) did not suggest any gene relevant for its
411 involvement in ions or water exchanges at the level of transporting epithelia.

412 The QTL families were F2 progenies from two divergent grand-parental lines (HR and LR)
413 previously selected for plasma cortisol response to an acute confinement stress [32, 33]. It is
414 well established that cortisol plays an important role in the success of the adaptive
415 osmoregulation process after transfer to a saline environment [47]. Cortisol represents a major
416 endocrine actor in the regulation of ionic homeostasis, particularly after environmental
417 salinity change, by regulating some seawater specific ion transporters such as $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -
418 ATPase isoforms, NKCC and CFTR [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55]. By its actions on gill
419 chloride cells number and activity, cortisol acts in synergy with IGF-1 and GH to increase
420 overall salinity tolerance (see review McCormick and Stephen [49]). Yet, altogether, our QTL
421 results do not support evidence of a unidirectional association between the HR vs LR origin of
422 QTL alleles and their effect on ion concentrations in the plasma. They rather suggest that the
423 role of grand-parental alleles depends on the loci, a result that highlights the functional
424 complexity of underlying mechanisms and is in agreement with the present knowledge that
425 different stressors (as confinement or salinity stressors) have distinct effects on the

426 physiological mechanisms regulated by cortisol [56]. However, by introducing a valuable
427 source of additional variability in comparison to a standard within population QTL design, the
428 HR and LR fish provide a valuable tool with which to obtain a better understanding of the
429 complex hormonal control of hypo-osmoregulatory mechanisms. An increasing amount of
430 attention is paid to welfare and robustness traits in aquaculture, and many studies on the
431 genetic control of cortisol response to stressors have been carried out, aiming at reducing
432 stress in farmed fish [27, 55, 57, 58, 59, 60]. Thus, a better understanding of the relationship
433 between cortisol responsiveness to acute stress and osmoregulation capacities is a key
434 requirement prior to the adoption of any selection programme designed to manage the cortisol
435 response to stress in aquacultured fish.

436

437 Preliminary observations had suggested that LR individuals had more developed gill arches
438 than HR individuals. The QTL design was thus appropriate to search for QTL for gill relative
439 development. Seven significant QTL were detected for gill relative weight. Such a result is in
440 agreement with other studies that have identified the existence of numerous QTL for body
441 traits in fish [61, 62, 63]. Three of those QTL are also involved in the regulation of plasma
442 Na^+ and Cl^- concentration after the osmotic challenge, which raises the question of the
443 possible role of gill size and morphology on osmoregulation capacities. To our knowledge
444 there are no published data indicating any genetic correlation between gill size and tolerance
445 to high salinity, and the genetic structure of the QTL data set (5 full sib families) did not allow
446 to calculate a reliable estimate of it. Yet, we observed that the QTL alleles associated with a
447 larger gill affect ionic concentrations in the plasma in different directions (increase as
448 decrease). The total weight of gill arches is not directly representative of the relative
449 development of the gill epithelium, which is the active site for ionic and water exchange. In
450 this context, it is unlikely that there is a direct 'mechanical' effect of gill size, through an

451 increase of the branchial ion-exchange surface. This is also in agreement with the lack of
452 correlation between individual values for gill index and any of the plasma ion concentrations
453 in the different challenges. The most likely hypothesis is that QTL harbour multiple syntenic
454 genes regulating the morphological trait (gill size) and physiological traits (ionic
455 concentrations).

456 Up to now, very few studies have investigated the genetic architecture of osmoregulation
457 capacity or associated traits in salmonids. To our knowledge, only Nichols *et al* (2008) have
458 searched for QTL associated with migratory capacities (smoltification) in trout *O. mykiss*.
459 Using a cross between nonmigratory rainbow trout and migratory steelhead trout line, they
460 discovered 14 genomic regions (on 14 different linkage groups) associated with
461 smoltification-related morphological traits (growth, condition factor, body coloration,
462 morphology, osmoregulatory enzyme activity). The genome scan in this study was performed
463 using AFLP markers, but at least one microsatellite per linkage group was genotyped and can
464 be used to establish synteny with other rainbow trout maps. Interestingly, several QTL
465 discovered in the two studies colocalize on the same rainbow trout linkage groups. This is the
466 case for the QTL on linkage groups RT8, RT9, RT14, RT23 and RT31 for which we could
467 establish the synteny with respectively OC8, OC9, OC14, OC 23 and OC31 in Nichols *et al*.
468 It is also the case for the QTL on RT21: Omy325DU (on OC21 in study by Nichols *et al.*) and
469 Omy325UoG (on RT21 in our linkage map [19]) correspond in fact to the same marker (R.
470 Danzmann, personal communication). Ambiguity remains for the QTL located respectively
471 on OC3 in Nichols *et al.* and RT25 in this study. In Nichols *et al.*, OC3 is identified by
472 One8ASC and Ogo2 only. These two markers belong to a region homologous to RT25, as
473 attested by several shared duplicated loci, including Ogo2 [19, 20]. This suggests that the two
474 aforementioned QTLs could be under control of two homeologous genes. Furthermore, since
475 the duplicated or non-duplicated status of One8 (as any marker) is difficult to prove and can

476 vary among populations, it cannot be ruled out that OC3 and RT25 correspond to the same
477 linkage group in these two particular studies.

478 On the other hand, it is worth underlining that in our study, we do not find any salinity
479 acclimation QTL on RT20, the linkage group the most strongly associated with smoltification
480 traits (mostly growth and morphological traits) in the study of Nichols *et al.* As no
481 smoltification process occurred in the fish during our survey, this observation is not unlikely.
482 It emphasizes that the smoltification process and the adaptation to salinity after a direct
483 transfer to seawater are two different events.

484 In the end, there are at least 6 linkage groups harbouring QTL in both studies. It is very
485 difficult to compare the location of the QTL discovered in the two studies on the linkage
486 groups, as genome scans were performed with a low marker density and different kind of
487 markers were used (AFLP *vs* microsatellites). Moreover, the traits recorded in the two studies
488 are quite different (survey of growth and changes in body colour and morphology over the
489 time course of smoltification *vs* plasma indicators of the status of the hydromineral balance
490 after an osmotic challenge in a nonmigratory population) and many linkage groups are found
491 to harbour QTL for the traits examined in the two studies (16 and 14 in the present study and
492 the one by Nichols *et al.* respectively). It is thus possible that common linkage groups are
493 observed by chance. Yet, the observation may also substantiate the role of those genomic
494 regions in the osmoregulatory process in trout and corroborates the hypothesis that some of
495 the key processes for the control of hydromineral balance during adaptation to salinity (as
496 highlighted by our QTL study) are also involved in individuals that undergo smoltification.

497
498 During this experiment, a large number of individual fish were submitted twice to the same
499 salinity stressor. The data set provides additional information on basic physiological
500 responses of trout during the early (first 24 hours) adaptation to seawater. The mean plasma

501 concentrations were in the same range as those usually recorded in similar tests with fish of
502 similar sizes. However, when the fish were exposed twice to the salinity challenge (24h at
503 30‰ salinity) separated by a 2 week recovery period, plasma Na⁺ and Cl⁻ levels did not
504 behave similarly: We could observed an increase in the mean plasma Na⁺ levels between the
505 first and second challenges whereas no significant changes were observed in plasma Cl⁻ levels
506 (Table 1). It is possible that this difference is linked to the fact that, in rainbow trout, plasma
507 Na⁺ level changes after transfer to SW were much more sensitive than plasma Cl⁻ level
508 changes ([30]; Brard *et al.*, unpublished data) and this requires further investigation. These
509 results also suggest that, at least for Na⁺, an acute salinity stressor (24h exposure to 30‰)
510 may lead to permanent modification of the functionality of the Na⁺ osmoregulatory
511 mechanisms resulting in a change in the capacity to excrete Na⁺ when the fish is re-exposed to
512 high salinity. To our knowledge, such a mechanism has never been reported in the literature.

513 To summarize, we have identified several regions of the rainbow trout genome that are
514 associated with the ability to regulate hydromineral balance after a salinity challenge. These
515 are first results, that will undoubtedly be refined in the future as the current development of
516 genomic tools and markers in rainbow trout will allow using a higher marker density and
517 performing genome-wide analyses. Nevertheless, the results highlight the complexity of
518 physiological and hormonal mechanisms that underlie these processes and provide an original
519 insight into the genetic bases of the early stages of adaptation to seawater. They lay the
520 foundation for further investigations and a better understanding of this complex trait.

521

522 **Authors' contributions**

523 YLB and ND performed the QTL analyses. YLB carried out part of the plasma assays and
524 drafted the manuscript. FK carried out the whole SNP subset of the genome scan and
525 participated in the organisation of the overall genome scan and the generation of linkage

526 maps. OF wrote several adaptations of the program for the QTL detection in this protocole.
527 RG participated in critically analysing genetic maps. MB assisted in the building of the maps.
528 HB participated in the choice of the QTL family design. TPG supervised the production and
529 management of fish, carried out the salinity challenge and sampling. PP designed the salinity
530 test and shared the drafting of the manuscript. PLR wrote update versions of the QTLMap
531 software, supervised QTL analyses and participated in drafting the manuscript. EQ conceived
532 of the whole study, participated in its design and coordination and was involved in drafting
533 the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

534

535 **Acknowledgements**

536 Authors wish to thank a number of persons for their helpful contribution to the project. David
537 Abel provided technical assistance at CEH (Windermere, UK). At INRA, Stéphane Mauger,
538 Amandine Launay and Ludivine Laffont contributed to microsatellite genotyping, Caroline
539 Hervet helped to select markers, genotype and control genotypes quality and to prepare the
540 linkage analyses in QTL families, André Neau helped in data management. Dominique
541 Brunel and Aurélie Bérard (CNG, Centre National de Genotypage, Evry, France) adjusted the
542 SNPlex technology to trout samples. Tehui Wang (Scottish Fish Immunology Research
543 Centre, School of Biological Sciences, University of Aberdeen, UK) supervised the final
544 phenotyping (sex, body and gill weight) in the Scottish Fish Immunology Research Centre
545 facilities.

546 This study was funded by the European Commission (project AQUAFIRST, contract number
547 FP6-STREP-2004-513692), the Natural Environment Research Council of the United
548 Kingdom, INRA, la Région Bretagne (Aquagene project, contract number 2450) and MESR
549 (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France; contract number 26907-
550 2007)

551 **References**

- 552
553 1. Sedgwick SD: **Rainbow trout farming in Scotland. Farming trout in salt water.** *Scot*
554 *Agric* 1970, **49**: 180-185.
- 555 2. Landless PJ: **Acclimation of rainbow trout to seawater.** *Aquaculture* 1976, 173-179.
- 556 3. Johnston CE, Cheverie JC: **Comparative analysis of ionoregulation in rainbow trout**
557 **(*Salmo gairdneri*) of different sizes following rapid and slow salinity adaptation.**
558 *Can J Fish Aquat Sci* 1985, **42**: 1994-2003.
- 559 4. Evans DH, Piermarini PM, Choe KP: **The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site**
560 **of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of**
561 **Nitrogenous Waste.** *Physiol Rev* 2005, **85**: 97-177.
- 562 5. Hwang PP, Lee TH: **New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich**
563 **cells.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **148**: 479-497.
- 564 6. Fuentes J, Soengas JL, Buceta M, Otero J, Rey P, Rebolledo E: **Kidney ATPase**
565 **response in seawater-transferred rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect of**
566 **salinity and fish size.** *Rev Esp Fisiol* 1996, **52**: 231-238.
- 567 7. Myers JJ, Kohler CC: **Acute Responses to Salinity for Sunshine Bass and Palmetto**
568 **Bass.** *North American Journal of Aquaculture* 2000, **62**: 195-202.
- 569 8. Allegrucci G, Caccone A, Cataudella S, Powell JR, Sbordoni V: **Acclimation of the**
570 **European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD**
571 **polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms.** *Marine Biology* 1995,
572 **121**: 591-599.

- 573 9. Johnsson JI, Clarke WC, Blackburn J: **Hybridization with Domesticated Rainbow-**
574 **Trout Reduces Seasonal-Variation in Seawater Adaptability of Steelhead Trout**
575 **(*Oncorhynchus-Mykiss*)**. *Aquaculture* 1994, **121**: 73-77.
- 576 10. Nichols KM, Edo AF, Wheeler PA, Thorgaard GH: **The Genetic Basis of**
577 **Smoltification-Related Traits in *Oncorhynchus mykiss***. *Genetics* 2008, **179**: 1559-
578 1575.
- 579 11. Thrower F, Guthrie C, Nielsen J, Joyce J: **A Comparison of Genetic Variation**
580 **Between an Anadromous Steelhead, *Oncorhynchus mykiss*, Population and Seven**
581 **Derived Populations Sequestered in Freshwater for 70 Years**. *Environmental*
582 *Biology of Fishes* 2004, **69**: 111-125.
- 583 12. Birt TP, Green JM, Davidson WS: **Contrasts in development and smolting of**
584 **genetically distinct sympatric anadromous and nonanadromous Atlantic salmon,**
585 ***Salmo salar***. *Can J Zool* 1991, **69**: 2075-2084.
- 586 13. Birt TP, Green JM: **Acclimation to seawater of dwarf nonanadromous Atlantic**
587 **salmon, *Salmo salar*** . *Can J Zool* 1993, **71**: 1912-1916.
- 588 14. Staurnes M, Lysfjord G, Berg OK: **Parr-smolt transformation of a nonanadromous**
589 **population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway**. *Can J Zool* 1992, **70**: 197-
590 199.
- 591 15. Schmitz M: **Seasonal changes in hypoosmoregulatory ability in landlocked and**
592 **anadromous populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, and Atlantic salmon,**
593 ***Salmo salar***. *Environmental Biology of Fishes* 1995, **42**: 401-412.

- 594 16. Nilsen TO, Ebbesson LOE, Stefanson SO: **Smolting in anadromous and landlocked**
595 **strains of Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. *Aquaculture* 2003, **222**: 71-82.
- 596 17. Nilsen TO, Ebbesson LOE, Madsen SS, McCormick SD, Andersson E, Bjornsson BT *et*
597 *al.*: **Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase {alpha}- and {beta}-subunits,**
598 **Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and**
599 **landlocked Atlantic salmon *Salmo salar***. *J Exp Biol* 2007, **210**: 2885-2896.
- 600 18. Nichols KM, Young WP, Danzmann RG, Robison BD, Rexroad C, Noakes M *et al.*: **A**
601 **consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Anim Genet*
602 2003, **34**: 102-115.
- 603 19. Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, Krieg F *et al.*: **A type I**
604 **and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**
605 **with presumptive coverage of all chromosome arms**. *BMC Genomics* 2006, **7**: 30.
- 606 20. Rexroad C, Palti Y, Gahr S, Vallejo R: **A second generation genetic map for rainbow**
607 **trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *BMC Genetics* 2008, **9**: 74.
- 608 21. Wringe BF, Devlin RH, Ferguson MM, Moghadam HK, Sakhrani D, Danzmann RG:
609 **Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout**
610 **(*Oncorhynchus mykiss*)**. *BMC Genet* 2010, **11**: 63.
- 611 22. Zimmerman A, Evenhuis J, Thorgaard G, Ristow S: **A single major chromosomal**
612 **region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout**. *Immunogenetics*
613 2004, **55**: 825-835.

- 614 23. Rodriguez MF, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B: **Genetic markers associated**
615 **with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout**
616 **(*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture* 2004, 241: 93-115.**
- 617 24. Khoo SK, Ozaki A, Nakamura F, Arakawa T, Ishimoto S, Nickolov R *et al.*:
618 **Identification of a novel chromosomal region associated with infectious**
619 **hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.**
620 *Fish Pathology* 2004, 39: 95-101.
- 621 25. Ozaki A, Khoo SK, Yoshiura Y, Ototake M, Sakamoto T, Dijkstra JM *et al.*:
622 **Identification of Additional Quantitative Trait Loci (QTL) Responsible for**
623 **Susceptibility to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Rainbow Trout. *Fish***
624 *Pathology* 2007, 42: 131-140.
- 625 26. Perry GML, Ferguson MM, Sakamoto T, Danzmann RG: **Sex-linked Quantitative**
626 **Trait Loci for Thermotolerance and Length in the Rainbow Trout. *Journal of***
627 *Heredity* 2005, 96: 97-107.
- 628 27. Drew RE, Schwabl H, Wheeler PA, Thorgaard GH: **Detection of QTL influencing**
629 **cortisol levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2007, 272:**
630 S183-S194.
- 631 28. Haidle L, Janssen JE, Gharbi K, Moghadam HK, Ferguson MM, Danzmann RG:
632 **Determination of quantitative trait loci (QTL) for early maturation in rainbow**
633 **trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol (NY)* 2008, 10: 579-592.**
- 634 29. Hoar, WS. **Osmotic and ionic regulation. In *General and comparative Physiology,***
635 *Hoar WS ed., Prentice-Hall New Jersey (USA) 1983, 627-658.*

- 636 30. Prunet P, Boeuf G, Houdebine LM: **Plasma and pituitary prolactin levels in rainbow**
637 **trout during adaptation to different salinities.** *J Exp Zool* 1985, **235**: 187-196.
- 638 31. Tanguy, J.M., Ombredane, D., Baglinière, J.L., Prunet, P. **Aspects of parr-smolt**
639 **transformation in anadromous and resident forms of brown trout (*Salmo trutta*) in**
640 **comparison with atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Aquaculture* 1994, 121: 51-63
- 641 32. Pottinger TG, Carrick TR: **Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in**
642 **Rainbow Trout by Selective Breeding.** *General and Comparative Endocrinology*
643 1999, **116**: 122-132.
- 644 33. Overli O, Winberg S, Pottinger TG: **Behavioral and Neuroendocrine Correlates of**
645 **Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout--a Review.** *Integr Comp Biol*
646 2005, **45**: 463-474.
- 647 34. Schoenfeld RG, Lerveller CV. *Clin.Chem.* 10, 553. 1964.
- 648 35. de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T: **CAR(H)(T)AGene:**
649 **multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping.** *Bioinformatics*
650 2005, **21**: 1703-1704.
- 651 36. The SAS Institute: *SAS/STAT User's Guide, Version 9.* Cary, NC , SAS Institute Inc. ;
652 2002.
- 653 37. Filangi O, Elsen JM: **QTLMap, a software for QTL detection in outbred**
654 **populations.** In *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock*
655 *Production: 1-6 August 2010; Leipzig.*

- 656 38. Elsen JM, Mangin B, Goffinet B, Boichard D, Le Roy P: **Alternative models for QTL**
657 **detection in livestock. I. General introduction.** *Genetics Selection Evolution* 1999, **31:**
658 213-224.
- 659 39. Le Roy P, Elsen JM, Boichard D, Mangin B, Bidanel JP, Goffinet B. **An algorithm for**
660 **QTL detection in mixture of full and half sib families.** In *Proceedings of the 6th*
661 *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production; Armidale.* 1998: 257-
662 260.
- 663 40. Harrel F.E., Davis C.E. **A new distribution-free quantile estimator.** *Biometrika* 1982,
664 **69:** 635-640.
- 665 41. Lander E, Kruglyak L. **Genetic dissection of complex traits: guidelines for**
666 **interpreting and reporting linkage results.** *Nat Genet* 1995, **11:** 241-247.
- 667 42. Lander ES, Botstein D: **Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits**
668 **Using Rflp Linkage Maps.** *Genetics* 1989, **121:** 185-199.
- 669 43. Gilbert H, Le Roy P: **Comparison of three multitrait methods for QTL detection.**
670 *Genetics Selection Evolution* 2003, **35:** 281-304.
- 671 44. Yan B, Wang Z: **Growth, salinity tolerance and microsatellite analysis of the F₂**
672 **reciprocal hybrids of *Oreochromis niloticus*×*Sarotherodon galilaeus* at different**
673 **salinities.** *Aquaculture Research* 2010, **41:** 336-344.
- 674 45. Handeland SO, Bjørnsson, Arnesen AM, Stefansson SO: **Seawater adaptation and**
675 **growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains.**
676 *Aquaculture* 2003, **220:** 367-384.

- 677 46. Kaneko T, Watanabe S, Lee KM: **Functional Morphology of Mitochondrion-Rich**
678 **Cells in Euryhaline and Stenohaline Teleosts.** *Department of Aquatic Bioscience*
679 2008, 8657.
- 680 47. Marshall WS, Bellamy D: **The 50 year evolution of in vitro systems to reveal salt**
681 **transport functions of teleost fish gills.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*
682 2010, **155**: 275-280.
- 683 48. McCormick SD, Regish A, O'Dea MF, Shrimpton JM: **Are we missing a**
684 **mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and**
685 **aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and isoform mRNA**
686 **levels in Atlantic salmon.** *General and Comparative Endocrinology* 2008, **157**: 35-40.
- 687 49. Lin H, Pfeiffer D, Vogl A, Pan J, Randall D: **Immunolocalization of H⁺-ATPase in the**
688 **gill epithelia of rainbow trout.** *J Exp Biol* 1994, **195**: 169-183.
- 689 50. McCormick SD: **Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish.** *Amer Zool*
690 2001, **41**: 781-794.
- 691 51. Kiilerich P, Kristiansen K, Madsen SS: **Cortisol regulation of ion transporter mRNA**
692 **in Atlantic salmon gill and the effect of salinity on the signaling pathway.** *J*
693 *Endocrinol* 2007, **194**: 417-427.
- 694 52. McCormick SD, Bern HA: **In vitro stimulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity and**
695 **ouabain binding by cortisol in coho salmon gill.** *Am J Physiol* 1989, **256**: R707-R715.
- 696 53. Tipsmark CK, Madsen SS, Seidelin M, Christensen AS, Cutler CP, Cramb G:
697 **Dynamics of Na(+),K(+),2Cl(-) cotransporter and Na(+),K(+)-ATPase expression in**

- 698 **the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo***
699 **salar).** *J Exp Zool* 2002, **293**: 106-118.
- 700 54. Shrimpton JM, McCormick SD: **Responsiveness of gill Na⁺/K⁺-ATPase to cortisol is**
701 **related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbow trout.** *J Exp*
702 *Biol* 1999, **202**: 987-995.
- 703 55. Deane EE, Woo NYS: **Differential gene expression associated with euryhalinity in**
704 **sea bream (*Sparus sarba*).** *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and*
705 *Comparative Physiology* 2004, **287**: R1054-R1063.
- 706 56. Wendelaar Bonga SE: **The stress response in fish.** *Physiol Rev* 1997, **77**: 591-625.
- 707 57. Kettunen A, Serenius T, Fjalestad KT: **Three statistical approaches for genetic**
708 **analysis of disease resistance to vibriosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.).** *J Anim*
709 *Sci* 2007, **85**: 305-313.
- 710 58. Weber GM, Silverstein JT: **Evaluation of a Stress Response for Use in a Selective**
711 **Breeding Program for Improved Growth and Disease Resistance in Rainbow**
712 **Trout.** *North American Journal of Aquaculture* 2007, **69**: 69-79.
- 713 59. Weber GM, Vallejo RL, Lankford SE, Silverstein JT, Welch TJ: **Cortisol Response to**
714 **a Crowding Stress: Heritability and Association with Disease Resistance to**
715 ***Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout.** *North American Journal of Aquaculture* 2008,
716 **70**: 425-433.
- 717 60. Vallejo RL, Rexroad CE, III, Silverstein JT, Janss LL, Weber GM: **Evidence of major**
718 **genes affecting stress response in rainbow trout using Bayesian methods of**
719 **complex segregation analysis.** *J Anim Sci* 2009, **87**: 3490-3505.

- 720 61. Massault C, Hellemans B, Louro B, Batargias C, Van Houdt JK, Canario A *et al.*: **QTL**
721 **for body weight, morphometric traits and stress response in European sea bass**
722 ***Dicentrarchus labrax***. *Anim Genet* 2010, **41**: 337-345.
- 723 62. Reid DP, Szanto A, Glebe B, Danzmann RG, Ferguson MM: **QTL for body weight**
724 **and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with**
725 **rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*).**
726 *Heredity* 2005, **94**: 166-172.
- 727 63. Moghadam H, Poissant J, Fotherby H, Haidle L, Ferguson M, Danzmann R:
728 **Quantitative trait loci for body weight, condition factor and age at sexual**
729 **maturity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): comparative analysis with rainbow**
730 **trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Genetics*
731 *and Genomics* 2007, **277**: 647-661.**
- 732

733

Table 1 - Description of body traits and plasma parameters at the two successive osmotic challenges.

Traits	Family mean					Unit	Overall mean	SD	n
	X3	X4	X8	X14	X17				
Na ⁺ 1	185	195	209	186	191	mmol.L ⁻¹	193.2	26.9	932
Na ⁺ 2	204	207	221	206	200		207.6	34.9	900
Cl1	147	144	156	140	139		145.2	17.4	931
Cl2	147	142	141	148	138		143.2	15.4	894
gill weight	10.8	10	10.8	9.6	11	g	10.4	2.6	787
body weight	203	200	210	190	214		203.5	9.2	932
fork length	26.6	25.7	26.5	26.2	26.7	cm	26.3	0.4	932

n = total number of individual records; SD = overall standard deviation

734

735

736

Table 2 - Pairwise coefficients of phenotypic correlation among the different traits

Traits		gill index	Cl2	Cl1	Na ⁺ 2
Na ⁺ 1	R	0.00	0.03	0.21	0.67
	P	<i>0.98</i>	<i>0.31</i>	<i><.0001</i>	<i><.0001</i>
	n	776	862	901	871
Na ⁺ 2	R	0.06	0.22	0.13	
	P	<i>0.12</i>	<i><.0001</i>	<i>0.0001</i>	
	n	771	865	867	
Cl1	R	0.01	0.08		
	P	<i>0.69</i>	<i>0.02</i>		
	n	772	858		
Cl2	R	0.04			
	P	<i>0.24</i>			
	n	762			

R = Pearson coefficient of correlation, P = associated p-value, n= number of individual records, corrected for fixed factors and covariables.

737

Table 3 - QTL detected by unisearch analyses for gill index and for Na⁺ and Cl⁻ plasma concentrations 24h after an osmotic challenge at 30‰.

Trait	Linkage Group	Position (cM)	CI (cM)	P-value	QTL effect			Crosses with segregant QTL
					value in SD unit: mean (min-max)	n _H		
					LR	HR		
Na ⁺ 1	RT14	66	60-72	10%	0.33(0.26-0.47)	4	1	All crosses
	RT29	55	52-60	10%	0.34(0.22-0.55)	4	1	X3, X4 & X17
	RT31	4	0-14	10%	0.31(0.22-0.49)	4	2	X4, X14 & X17
Na ⁺ 2	RT14	0	0-10	5%	0.45(0.24-0.64)	2	1	X3, X14 & X17
	RT19	119	115-119	10%	0.30(0.21-0.38)	5	2	X3, X8, X14 & X17
Cl ⁻ 1	RT25	12	6-19	5%	0.29(0.20-0.43)	5	2	X3, X4, X14 & X17
	RT26	43	27-55	5%	0.30(0.20-0.48)	6	0	X4 & X14
Cl ⁻ 2	RT8	16	12-30	10%	0.60	1	2	X17, X8 et X3
	RT10	21	18-24	1%	0.41(0.21-0.83)	3	4	X3, X8, X14 & X17
	RT19	112	88-119	10%	0.34(0.26-0.56)	4	2	X3, X8, X14 & X17
	RT21	32	0-44	10%	0.47(0.29-0.57)	2	1	X3 & X14
gill index	RT9	75	70-80	1%	0.45(0.28-0.58)	1	3	X3, X8 & X14
	RT15	51	40-51	5%	0.33(0.20-0.49)	1	4	X3, X4, X14 & X17
	RT26	35	35-50	5%	0.55(0.38-0.89)	3	0	X3, X8, X14 & X17
	RT27	6	0-20	10%	0.31(0.22-0.53)	4	2	All crosses

For each QTL ($P < 0.10$), the table indicates the linkage group, the position on the consensus linkage group rebuilt with the families of the design, the confidence interval (CI) estimated with the 'drop off' method and the associated P-value. QTL effects are expressed in units of phenotypic standard deviation of the trait. Mean, min and max refer respectively to the mean, minimum and maximum QTL effects recorded among families with significant QTL effect. n_H is the number of F1 parent segregating for the QTL. LR and HR indicates the line having transmitted the allele with an increasing effect on the trait.

Table 4 - QTL detected by joint analyses for gill index and for Na⁺ and Cl⁻ plasma concentrations 24h after an osmotic challenge at 30‰.

Analysis	Trait ¹	Linkage Group	Position (cM)	CI (cM)	P-value	QTL effect						
						value in SD unit : mean (min-max)		gill index	LR	HR		
		Na ⁺ 1	Na ⁺ 2	Cl ⁻ 1	Cl ⁻ 2						n _H	
Cl ⁻		RT4	14	2-25	5%			0.51 (0.33-0.77)	0.29 (0.20-0.34)		3	5
		RT5	30	0-34	10%			0.36 (0.29-0.43)	0.29 (0.26-0.32)		0	7
		RT10	21	14-27	5%			0.26 (0.20-0.82)	0.41 (0.20-0.82)		4	2
		RT23	114	103-123	10%			0.37 (0.20-0.62)	0.52 (0.22-0.99)		5	7
		RT26	55	42-54	10%			0.35 (0.22-0.53)	0.26 (0.20-0.33)		7	1
2 traits	Na ⁺	RT14	27	20-34	10%	0.30 (0.21-0.41)	0.35 (0.22-0.59)				6	4
	challenge1	RT7	0	0-10	10%	0.45 (0.29-0.69)		0.38 (0.26-0.51)			7	3
challenge2		RT9	17	8-25	10%		0.45 (0.23-0.74)	0.49 (0.34-0.73)			3	6
		RT10	21	16-28	0.5%		0.29 (0.21-0.41)	0.45 (0.23-0.79)			6	4
		RT19	119	105-119	5%		0.28 (0.21-0.36)	0.31 (0.22-0.50)			8	3
		RT23	108	90-128	10%		0.41 (0.28-0.56)	0.53 (0.22-0.93)			3	8
4 traits	plasmatic	RT5	30	0-34	10%	0.32 (0.27-0.35)	0.31 (0.22-0.42)	0.37 (0.26-0.32)	0.29 (0.26-0.32)		4	8
		RT10	20	18-28	5%	0.23 (0.23-0.23)	0.29 (0.28-0.29)	0.28 (0.21-0.34)	0 (0.21-0.34)		3	4
		RT19	119	93-119	10%	0.36 (0.24-0.49)	0.29 (0.21-0.37)	0.29 (0.24-0.35)	0.30 (0.21-0.49)		11	4
5 traits	all traits	RT4	10	0-11	10%	0.23 (0.20-0.27)	0.33 (0.22-0.39)	0.54 (0.29-0.86)	0.33 (0.28-0.40)	0.39 (0.20-0.55)	13 (gi:2)	2 (gi:2)
		RT10	26	20-37	5%	0.25 (0.20-0.33)	0.31 (0.22-0.45)	0.23 (0.22-0.24)	0.33 (0.05-0.69)	0.32 (0.21-0.47)	9 (gi:4)	6 (gi:2)
		RT19	119	83-119	10%	0.34 (0.20-0.56)	0.36 (0.23-0.47)	0.26 (0.19-0.37)	0.31 (0.24-0.45)	0.29 (0.23-0.35)	14 (gi:1)	4 (gi:1)

¹challenge1: joint analysis for Cl⁻1 and Na⁺1; challenge2: joint analysis for Cl⁻2 and Na⁺2; plasma: joint analyses for Cl⁻1, Na⁺1, Cl⁻2 and Na⁺2; all: joint analysis for the five traits; Cl⁻: joint analysis for Cl⁻1 and Cl⁻2; Na⁺: joint analysis for Na⁺1 and Na⁺2. For each QTL (P<0.10), the table indicates the linkage group, the position on the consensus linkage group rebuilt with the families of the design, the confidence interval (CI) estimated with the 'Lod drop-off' method, and the associated P-value. QTL effects are expressed in units of phenotypic standard deviation of the trait. Mean, min and max refer respectively to the mean, minimum and maximum QTL effects recorded among families with significant QTL effect. n_H is the number of F1 parent segregating for the QTL whatever the trait. LR and HR indicates the line having transmitted the allele with an increasing effect on the trait. For the joint analysis of the 5 traits, figures are the number of F1 parents segregating at QTL for plasma traits, and gi the number for gill index.

740 **Legend of figures**

741 **Figure 1 - Boxplot representation of Na⁺ (A) and Cl⁻ (B) plasma levels at the two**
742 **successive osmotic challenges.**

743

744 **Figure 2 - Overview of the QTL detected in the rainbow trout genome for gill index and**
745 **Na⁺ and Cl⁻ plasma levels 24h after osmotic challenge at 30‰.**

746

747 Labels indicate Morgan distances and marker names. Colored rectangles indicate the presence
748 of a QTL within the interval of confidence with the name of the associated trait. Stars
749 represent robust QTL versus other putative QTL.

750

751

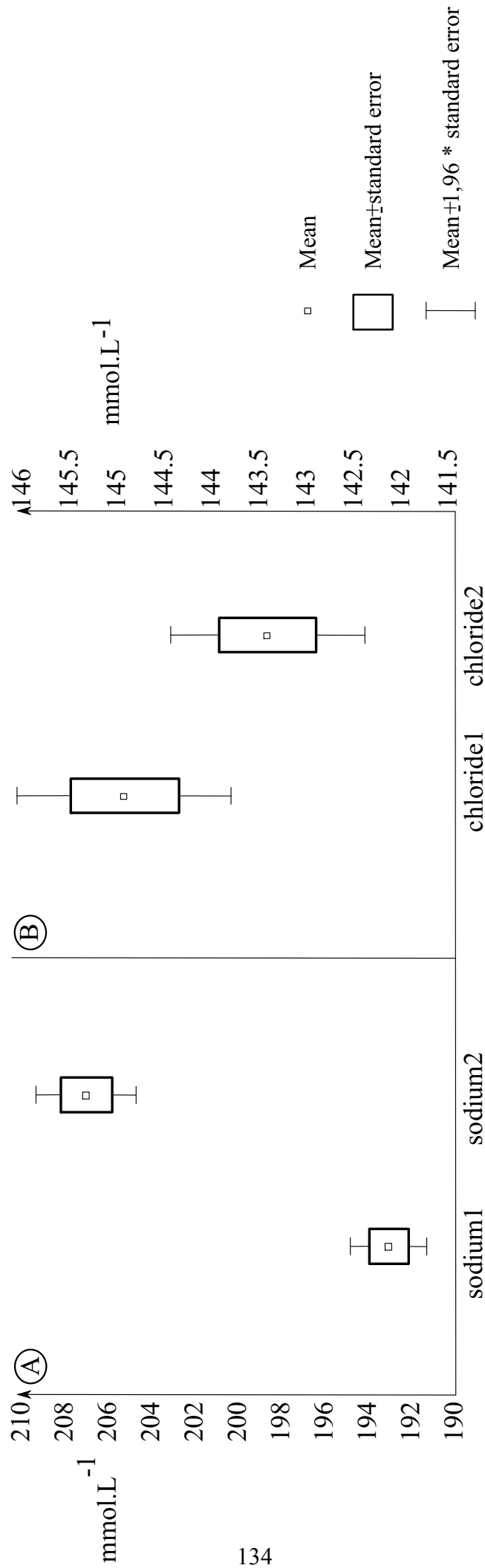
752 **Additional files**

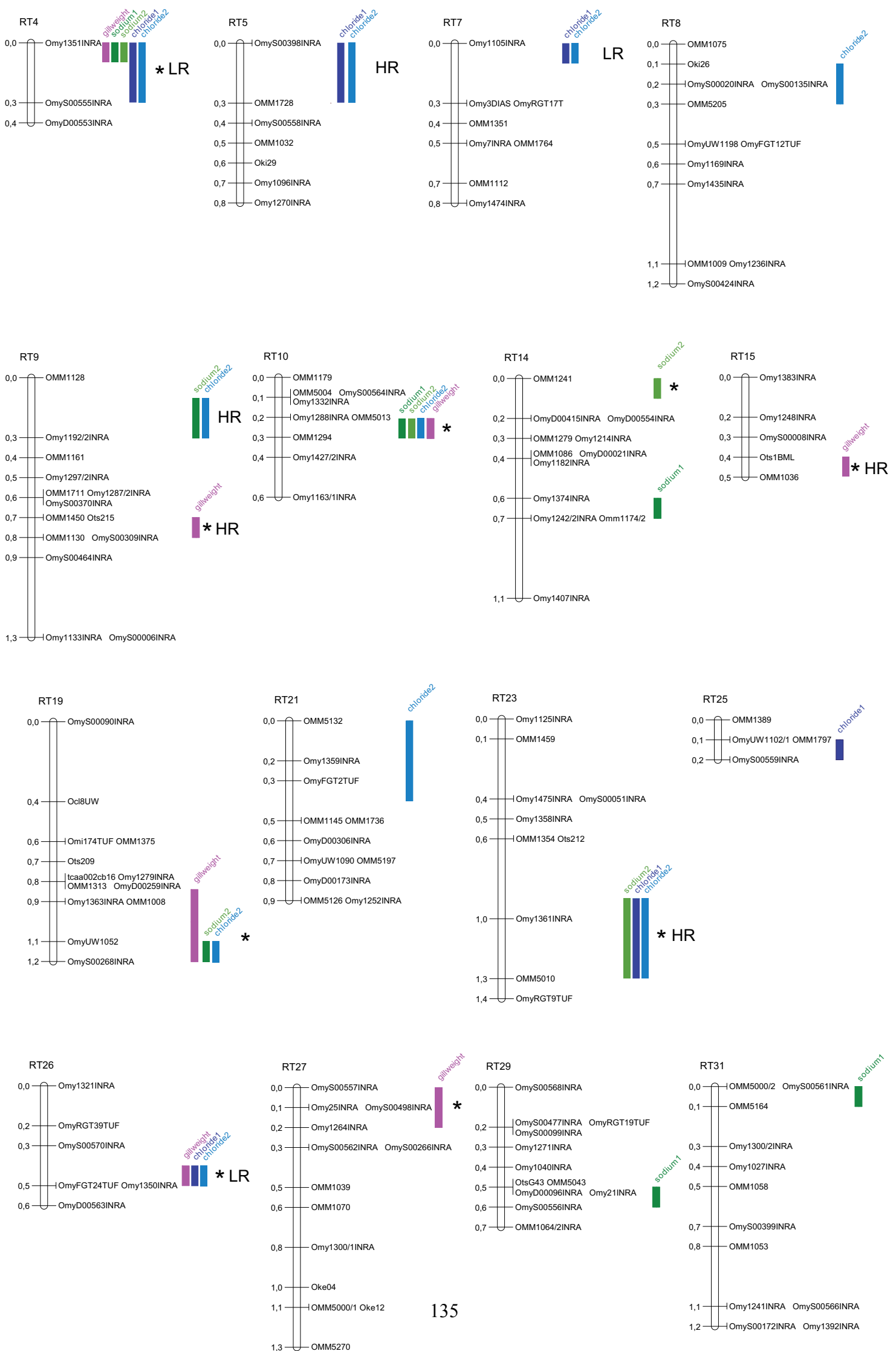
753 **Additional file 1: GenBank dbSNP submission numbers of the SNP used in the genome**
754 **scan**

755

756

757





4. Discussion

Lors de cette primolocalisation de QTL, différents problèmes ont complexifié l'obtention des résultats. La première difficulté a consisté en la recherche de marqueurs polymorphes dans les familles du dispositif. En effet, les lignées utilisées pour générer les différentes familles présentent une faible diversité génétique ce qui a limité la disponibilité en marqueurs microsatellites informatifs. Les problèmes liés à l'existence de polymorphismes robertsoniens, ainsi qu'au statut semi-tétraploïde des salmonidés (Allendorf et Thorgaard, 1984), n'a pas facilité le travail de typage et de cartographie génétique mené à Jouy-en-Josas.

Ce protocole de détection de QTL a permis de mettre en évidence 18 QTL. C'est, à notre connaissance, la première fois chez un téléostéen que sont détectés des loci impliqués dans les capacités d'acclimatation à l'eau de mer. Cette étude a de plus confirmé l'importante sensibilité relative du sodium, comparée à celle du chlore plasmatique, pour décrire l'état osmotique du poisson. Parmi les loci détectés, les groupes de liaison RT4, RT5 et surtout RT10 et RT19 détectés comme portant les QTL dans les deux challenges et pour les deux ions, semblent jouer un rôle clé dans l'acclimatation du poisson à l'eau de mer. D'autres QTL de fort effet, comme ceux des groupes de liaison RT14, RT25 et RT26, ont été détectés pour un seul caractère plasmatique. Ceci sous-entend l'existence de mécanismes cellulaires propre à la sécrétion de chacun de ces ions. Il ne se dégage pas de l'analyse des résultats de provenance unique et claire des allèles aux QTL, en terme de lignée HR ou LR. Les origines grand-parentales sont plutôt locus dépendant.

Les niveaux de chlore et de sodium plasmatiques représentent plus de 90% de la teneur ionique du milieu intérieur d'un poisson. Ceci explique que ces deux paramètres soient utilisés pour déterminer l'état physiologique des poissons dans des conditions particulières de salinité. La corrélation entre les données de sodium et de chlore plasmatiques suite à un challenge hyperosmotique chez la truite arc-en-ciel évoluerait différemment en fonction de la salinité finale testée (Brard *et al.*, données non publiées). Ceci pourrait expliquer qu'au seul regard des résultats univariés, un unique groupe de liaison, RT19, présente un QTL commun pour les deux ions. Les concentrations en ions chlorure et sodium présentent ici une corrélation significative positive modérée de 21%, et cela, pour les deux challenges. Il existe bien dans notre étude une relation entre les deux ions, et l'analyse conjointe des caractères, en précisant certains QTL détectés en analyse unicaractère et en en proposant d'autres, le confirment.

Les challenges de salinité sont répétés deux fois à 14 jours d'intervalle. Ce type d'expérience n'a jamais été publié. C'est pourquoi, il est difficile d'expliquer que les valeurs plasmatiques et les QTL détectés soient différents. Les 14 jours séparant les deux challenges ne sont peut-être pas suffisants pour permettre une totale récupération de l'hématocrite sanguin, et des niveaux plasmatiques en ions et hormones. Il est également possible que les individus « se rappellent » le précédent challenge qui a eu lieu quelques jours avant, ce qui provoque un différentiel de réponse. Cela traduit le fait qu'il existe une différence entre les individus dans la capacité d'acclimatation à un nouvel environnement hyperosmotique et / ou à retrouver un état physiologique normal après un transfert de salinité. Les moyennes et écart-types bruts des niveaux de sodium du deuxième challenge sont plus importants que pour le premier. Cela peut venir du fait que 24 heures après le début du transfert, les poissons ne sont pas au même «stade» de réponse, supposant que nous ne regardons pas exactement les mêmes processus (réponse au stress vs acclimatation au nouvel environnement).

C'est la première fois qu'une étude aborde la question d'un lien entre morphologie branchiale et tolérance à la salinité. Si des études préliminaires (données non présentées ici) proposaient que les individus de la lignée LR possédaient des branchies plus développées que ceux de la lignée HR, les 7 QTL détectés ici ne permettent pas d'étayer cette hypothèse. De plus, parmi ces 7 QTL, 3 influent sur les caractères plasmatiques. Existe-t-il un rôle entre morphologie branchiale et capacité d'osmorégulation? Malheureusement, le sens des allèles aux QTL n'autorise pas la définition de liens entre les caractères. L'hypothèse la plus probable est alors que les QTL détectés aient de multiples gènes synténiques régulant les caractères morphologique (taille branchiale) et physiologique (concentration ionique). Cette étude nécessitera des investigations futures pour une meilleure compréhension de ces caractères.

Les difficultés présentées ci-dessus concernant l'interprétation des résultats argumentent qu'il est essentiel de croiser les résultats des analyses multivariées et unicaractères. Si 7 groupes de liaison présentent des résultats particulièrement intéressants en unicaractère (RT9, RT10, RT14, RT15, RT19, RT26 et RT27), en regardant les colocalisations et les niveaux de significativité, les analyses multivariées permettent de proposer de nouveaux QTL importants sur les groupes de liaison RT4 et RT23 et confirment ceux détectés sur RT10, RT14, RT19 et RT26.

Ce travail montre que les caractères liés à l'osmorégulation chez la truite arc-en-ciel sont sous la dépendance de quelques loci à effet « fort » et que 5 régions génomiques portées par les groupes de liaison RT4, RT10, RT14, RT19 et RT26, sont fortement associées à

plusieurs de ces caractères. Si nous comparons ces résultats avec d'autres approches QTL menées chez la truite arc-en-ciel, nous pouvons constater quelques recouvrements intéressants. Tout d'abord, sur RT14 est mentionné la présence de QTL pour la maturation précoce de la truite par Zimmerman *et al.* (2004) alors que Nichols *et al.* (2008) identifient un locus proche de notre QTL pour sodium1 ayant un effet sur la variabilité phénotypique de 12 caractères (analyse multicaractère) liés à la smoltification de truites. Dans la même étude, un autre QTL pour ces 12 caractères est détecté sur RT8, à une position colocalisée avec un QTL que nous trouvons pour le chlore2. Enfin, il est intéressant de mettre en avant qu'un QTL détecté sur RT9 pour le poids branchial semble être très proche du locus codant pour GH1 (Growth Hormone 1).

Chapitre IV

Détection d'eQTL en lien avec l'acclimatation à l'eau de mer

Chapitre IV. Identification d'eQTL en lien avec l'acclimatation à l'eau de mer

Y. Le Bras, O. Filangi, N. Dechamp, J. Montfort, A. Le Cam, F. Krieg, E. Quillet, P. Prunet, P. Le Roy

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différentes façons d'affiner la localisation d'un QTL. La plus répandue consiste à ajouter des marqueurs génétiques dans l'intervalle de primolocalisation. Toutefois, le génome de la truite n'étant pas à ce jour séquencé, nous sommes dans l'incapacité d'augmenter la densité en marqueurs génétiques pour cartographier finement nos QTL. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur la précision du phénotype *via* l'utilisation de données physiologiques fines, à savoir le transcriptome de la branchie. En effet, l'utilisation de données transcriptomiques comme caractères pour détecter des eQTL permet de proposer des gènes et des fonctions liés aux régions génomiques portant les QTL. Des gènes candidats potentiels peuvent également être proposés s'ils sont localisés dans l'intervalle de confiance du QTL. La méconnaissance de la séquence du génome ne nous permettra pas en revanche de proposer avec certitude des candidats positionnels (cis-eQTL ou eQTL locaux).

1. Cartographie fine de QTL: utilisation des données d'expression de gènes

L'identification des voies métaboliques impliquées dans la variabilité d'un caractère influencé par un QTL permet d'augmenter la connaissance des mécanismes physiologiques sous-jacents. Si cet aspect est *a priori* non essentiel d'un point de vue purement sélectif, il est néanmoins important dans le long terme, d'un point de vue fondamental mais également de production respectueuse de l'animal, de connaître les processus fonctionnels soutenus par les QTL détectés. Il est aussi essentiel de se rapprocher le plus de la mutation causale, l'efficacité de la sélection assistée par marqueurs dépendant directement de la proximité entre le marqueur utilisé et le QTL visé. En effet, une perte d'efficacité est observée au fur et à mesure des générations de sélections, et elle est d'autant plus rapide que le marqueur est éloigné de la mutation causale. L'utilisation d'une méthode de cartographie fine de QTL présente alors tout son intérêt.

1.1. Concept et origine

Pour avoir des données concernant le niveau d'expression d'un gène, les scientifiques utilisent l'information détenue par la quantité d'ARNm des cellules des tissus. La présence d'une quantité allant jusqu'à quelques dizaines de copies d'un gène définira une faible expression quand une forte expression pourra laisser apparaître plusieurs dizaines de milliers de copies. La quantité en ARNm dans une cellule dépend de plusieurs facteurs. Les principaux concernent l'activité transcriptionnelle en elle-même, à savoir les phénomènes de transcription et d'épissage, et les processus liés à la dégradation des ARN. La variation en quantité d'ARNm d'un gène va ainsi être sous la dépendance du polymorphisme du gène en lui-même mais également d'autres gènes impliqués dans les processus de formation / dégradation des ARN.

Les investigations menées au niveau de la variation quantitative de la transcription de gènes ont initié l'ouverture de la boîte noire reliant génotype à phénotype (Gibson et Weir 2005 ; Prud'homme *et al.*, 2007). La cartographie des loci de caractères quantitatifs d'expression (eQTL), qui combine profils transcriptionnels et méthodes de cartographie génétique, permet ainsi la recherche de l'architecture génétique impliquée dans la régulation génique et quantifie l'héritabilité de ces facteurs de régulation (Petretto *et al.*, 2006 ; Schadt *et al.*, 2003 ; Vuylsteke *et al.*, 2006 ; Wayne et McIntyre, 2002). Un eQTL peut être défini comme une position dans un génome à laquelle le polymorphisme cause l'accumulation différentielle d'un transcrite spécifique. Au début des années 2000 est né le concept de "génétique génomique", définissant l'existence de liaisons génétiques entre marqueurs moléculaires et transcriptomie et permettant la mise en évidence de loci impliqués dans le niveau d'expression de gènes (Jansen et Nap, 2001). Ces auteurs proposent d'identifier les gènes dont l'expression est affectée par plusieurs loci d'une part, et par un même loci d'autre part, rendant alors possible la reconstruction de voies de régulation des processus biologiques. Ils supposent alors que le gène dont l'expression est gouvernée par le plus grand nombre de loci est situé le plus en aval de ces voies métaboliques. Des validations biologiques du concept de génétique génomique ont ensuite été menées avec succès. La première cartographie d'eQTL a ainsi été présentée chez la levure (Brem *et al.*, 2002) et a initié l'application de ce concept révolutionnaire aux modèles expérimentaux animaux chez la drosophile (Wayne et McIntyre, 2002), la souris (Schadt *et al.*, 2003), puis l'homme (Monks *et al.*, 2004 ; Morley *et al.*, 2004). Depuis 2004, plus de 160 travaux traitent des concepts et de l'application de la méthodologie eQTL.

Lu *et al.* (2001) proposaient l'une des premières études illustrant le potentiel important à combiner expression de gènes et QTL. Il s'agissait d'identifier des gènes candidats fonctionnels par une approche de transcriptomique différentielle entre deux lignées de poulets sélectionnés pour leurs capacités divergentes à résister à une maladie. Les gènes ainsi déterminés étaient ensuite cartographiés. En parallèle, une recherche de QTL de résistance à la maladie était effectuée sur des individus F2 issus du croisement entre ces deux lignées. Les candidats fonctionnels cartographiés à des positions chevauchant celles de QTL représentaient alors des candidats positionnels particulièrement intéressants. Les travaux de Wayne et McIntyre (2002), utilisant une approche similaire chez la drosophile, ont ainsi pu réduire une région QTL recouvrant 548 gènes à 34 gènes candidats différentiellement exprimés entre des lignées fondatrices.

1.2. Classification des régions eQTL

Parmi les eQTL détectés dans les différentes études menées jusqu'ici, une classification est faite par les auteurs afin de préciser l'emplacement de la région régulatrice par rapport au gène dont l'expression est régulée ou le niveau d'importance de la région eQTL détectée. Ainsi, sont utilisés les termes cis-eQTL, trans-eQTL et Master eQTL. Si les deux premiers définissent respectivement que la région régulatrice de l'expression d'un gène est située à proximité ou éloignée de la position physique de ce gène, le troisième indique un locus régulant les niveaux d'expression de plus de 25 gènes (Gibson et Weir, 2005 ; Morley *et al.*, 2004). A l'utilisation des termes cis- et trans-eQTL, qui peuvent induire des confusions au niveau de la signification biologique en raison de leur utilisation en biologie moléculaire pour définir des séquences promotrices de gènes (séquence cis) ou l'action de facteurs de transcription sur une séquence cis (facteur trans), est préféré l'emploi des dénominations respectives eQTL local et distant (Rockman et Kruglyak, 2006). Les eQTL locaux ayant globalement un effet plus important sur le niveau en ARNm des gènes, plus les p-values d'eQTL considérés dans une analyse sont significatives, plus la proportion d'eQTL locaux sera importante (Doss *et al.*, 2005).

1.3. Prétraitement des données d'expression

La manière de traiter des données transcriptomiques en amont des analyses constitue une étape délicate. Par exemple, si Williams *et al.* (2006) préconisaient de ne pas prendre en compte les gènes faiblement exprimés dans les analyses, Petretto *et al.* (2006) précisait que la faible intensité de certains spots pouvait traduire la présence de gènes fortement exprimés

dans une population cellulaire sous représentée dans le tissu étudié, et que la suppression de tels gènes sur le seul critère de faible intensité pouvait constituer une erreur.

Des QTL fantômes peuvent être détectés si les corrections préalables d'effets lots d'individus ne sont pas appropriées (Alberts *et al.*, 2005). Il est alors impératif de prendre en compte les conditions expérimentales (condition d'élevage, de challenge, d'extraction des ARN, de lot de puce à ADN, etc.) dont les modalités regroupent certains individus afin d'éviter toute association liée au hasard entre ces groupes et les haplotypes portés par les individus les constituant.

1.4. Facteurs influençant l'expression des gènes

De nombreux facteurs biologiques sont susceptibles d'influencer la variabilité d'expression d'un ARNm. Nous pouvons citer les infections bactériennes (Guthke *et al.*, 2005), virales (Furuta *et al.*, 2008), la pression (Johnson *et al.*, 2007), la lumière (Boothroyd *et al.*, 2007) ou la température (Kobayashi *et al.*, 2008). L'impact de ces facteurs peut alors supplanter les effets génétiques (Li *et al.*, 2004b).

Le fait que les individus soient regroupés en espèces, lignées et populations induit également une forte variabilité dans l'expression de nombreux gènes. Whitehead et Crawford (2005) mentionnent que l'étude de l'expression de gènes au niveau du cerveau, du cœur et du foie de trois populations de killifish mâles n'aboutit à un recouvrement des résultats concordant qu'à hauteur de 31% entre les trois populations d'individus.

Un autre facteur biologique jouant un rôle clé dans la variabilité d'expression de gènes est le sexe des individus. Yang *et al.* (2006) annoncent ainsi que 14 à 70% des gènes présents sur une puce à ADN sont, selon les tissus étudiés, dimorphiques. Bhasin *et al.* (2008) proposent même, chez la souris, de mener les analyses transcriptomiques de façon indépendante pour les deux sexes.

Finalement, de nombreux travaux mentionnent la forte différence de régulation d'expression de gènes entre les tissus et les types cellulaires (Beuvink *et al.*, 2007 ; De Gobbi *et al.*, 2007 ; Dittmar *et al.*, 2006 ; Grosso *et al.*, 2008 ; Pennacchio *et al.*, 2007).

Mis à part l'impact de ces phénomènes biologiques sur la variabilité d'expression de gènes, les paramètres techniques ainsi que les méthodes d'analyse jouent un rôle dans la détermination des caractéristiques des eQTL. C'est pourquoi la position et le nombre d'eQTL détectés peuvent varier selon le nombre d'individus considérés dans l'analyse (De Koning *et*

al., 2005). La taille du génome n'aurait en revanche pas d'impact. L'un des problèmes des analyses eQTL réside dans le fait que, en raison d'un coût technique élevé, le nombre d'individus utilisés est relativement faible. Cela implique l'augmentation du problème lié au déséquilibre de liaison entre allèles de gènes voisins par rapport aux analyses QTL classiques. Ce déséquilibre de liaison conduit à une instabilité de la détermination de la position des eQTL (Perez-Enciso, 2004).

En ce qui concerne les méthodes statistiques, l'utilisation d'ANOVA ou de test de maximum de vraisemblance donne des résultats très similaires au niveau des p-values des eQTL détectés et de leurs positions (Perez-Enciso, 2004).

Il existe de grandes différences concernant le nombre d'eQTL détectés notamment en raison de l'approche utilisée, de l'effectif des dispositifs et des corrections appliquées aux p-values pour tenir compte des tests multiples. Ainsi, le nombre de gènes dont l'expression est régulée par au moins un eQTL est, selon les études, compris entre 0.8 et 59% des gènes étudiés (Stranger *et al.*, 2005). Cependant, en moyenne, au moins une région eQTL est détectée pour 10 à 30% des transcrits analysés (Williams *et al.*, 2007).

Les protocoles de détection de région eQTL mentionnent souvent la présence de points chauds locaux (qualifiés de « hotspots ») traduisant l'existence de régions génétiques plus ou moins étendues où apparaît un enrichissement en région eQTL. L'existence de ces « hotspots » serait principalement due à trois phénomènes (DeCook *et al.*, 2006) : (i) l'appartenance de gènes physiquement proches à des fonctions métaboliques et des systèmes de régulation identiques, (ii) la co-localisation d'une région régulatrice trans et de ses gènes cibles ; (iii) l'impact d'un polymorphisme altérant localement la structure de la chromatine ayant des effets directs sur la transcription d'un groupe de gènes.

Enfin, des phénomènes d'interaction entre gènes dans le contrôle d'un caractère, définition de l'épistasie, doivent également intervenir (Anholt *et al.*, 2003). Ainsi, Storey *et al.* (2005), estiment que chez la levure, 37% des transcrits étudiés seraient au moins régulés par deux loci dont 14% seraient sous contrôle épistatique. L'épistasie se manifesterait alors principalement de trois façons. i) L'expression d'un gène peut modifier celle d'un autre gène, ii) il peut exister des interactions moléculaires entre les deux gènes d'intérêt, ou iii) ils font partis de la même cascade d'interaction moléculaire.

1.5. Principales stratégies d'utilisation des résultats d'analyse eQTL

Après avoir localisé des régions QTL pour un caractère, l'approche de cartographie fine par utilisation de données d'expression de gènes peut être utilisée pour préciser le phénotype. Différentes stratégies sont proposées afin d'utiliser au mieux ces données transcriptomiques.

La première d'entre elles, élaborée par Schadt *et al.* (2003) chez la souris consiste en la décomposition du caractère. Il s'agit d'identifier des sous-groupes d'animaux partageant des profils transcriptomiques similaires. L'utilisation de ces groupes d'individus dans les analyses de détection de régions QTL peut alors permettre d'affiner les résultats en terme de précision de la position et de l'effet du QTL en précisant le phénotype. L'apport des données transcriptomiques repose sur le nombre et la finesse des données phénotypiques permettant d'identifier des sous-groupes d'individus homogènes au niveau transcriptomique et donc probablement au niveau génétique. Cette classification en sous-groupe d'individus est alors possiblement due à l'existence de mutations et donc de QTL influençant le caractère. Cette méthode, reprise par Le Mignon *et al.* (2009) chez le poulet permet d'affiner les résultats initialement obtenus en augmentant les niveaux de significativité, mais également de détecter de nouveaux QTL, notamment en gérant les effets d'épistasie. Il est également intéressant d'analyser de manière approfondie les gènes dont l'expression a permis de définir ces sous-groupes d'individus.

L'approche multi-spécifique peut également être utilisée. Elle a permis de mettre en avant l'intervention de 196 gènes primordiaux dans les mécanismes liés à la régulation de l'obésité chez l'homme (Emilsson *et al.*, 2008) à partir de résultats obtenus chez la souris (Chen *et al.*, 2008).

Le couplage entre liste de gènes dont l'expression est sous la dépendance de régions eQTL et liste de gènes dont l'expression différentielle a été démontrée dans les processus biologiques étudiés, permet d'augmenter l'informativité des résultats eQTL et de proposer des listes réduites de candidats fonctionnels (Liu *et al.*, 2001 ; Wayne et McIntyre, 2002).

L'étude des régions eQTL colocalisant avec les régions QTL peut permettre de réduire les intervalles de confiance voire de proposer des gènes candidats positionnels (en cas d'existence de eQTL locaux) mais également d'apporter une information fonctionnelle sur le gène causal. Mais il faut rester prudent lors de l'analyse de tels résultats. En effet, La

colocalisation entre régions eQTL et QTL n'implique pas forcément une relation de cause à effet entre l'expression du gène et le niveau du caractère étudié. Nous pouvons ainsi définir 4 cas de figures possibles. (i) La régulation de l'expression d'un gène peut être sous la dépendance d'une région eQTL positionnée dans l'intervalle de confiance du QTL mais pas à la position du QTL. Georges (2007) décrit que une forte corrélation entre l'expression d'un gène sous l'influence d'une région eQTL et un phénotype peut impliquer un eQTL local. L'utilisation des corrélations entre expression de gène et niveau du caractère permet de préciser la position du QTL, mais sans apporter d'information fonctionnelle sur les répercussions biologiques de la mutation causale. (ii) L'expression de gènes peut également être sous l'influence de la même mutation que celle impliquée dans la régulation du caractère. La région eQTL détectée permettra de fournir des informations à la fois sur la position et sur la fonction du polymorphisme causal du QTL. (iii) Le polymorphisme causal peut également contrôler l'expression de gènes impliqués dans des processus non liés à l'établissement du caractère. (iv) Enfin, le caractère peut aussi réguler le niveau d'ARNm de gènes. Les trois derniers cas aboutissent à l'expression de gènes respectivement qualifiés de causaux, indépendants et réactifs (Schadt *et al.*, 2005). Si l'existence de ces différents cas de figure brouille l'interprétation initiale des résultats, sa prise en compte permet d'améliorer la précision et la compréhension des régions QTL primolocalisées. Malheureusement, l'organisation cellulaire du tissu analysé a un impact potentiel sur les profils d'expression, et les profils observés ne reflètent que partiellement la réalité et compliquent la caractérisation des régions eQTL détectées. Afin de distinguer les gènes causaux, réactifs, et indépendants, Schadt *et al.* (2005) proposent une approche LCMS (Likelihood Causal Model System). Il s'agit alors d'estimer une probabilité pour chaque gène régulé par une région eQTL d'être causal, réactif ou indépendant. La méthode utilisée consiste à évaluer les probabilités de détecter le QTL pour le caractère après que ce dernier soit conditionné par le niveau d'expression du gène considéré. Ainsi, le gène sera qualifié de causal si l'association entre QTL et caractère disparaît. Si cette association n'est pas affectée, mais que celle existant entre le QTL et le niveau d'expression du gène disparaît une fois conditionné par le niveau du caractère, il est qualifié de réactif. Enfin, si aucune de ces associations n'est affectée, le gène et le caractère seront considérés comme indépendants.

Parce que les régions eQTL locales sont souvent associées à des significativités élevées et que la recherche de la mutation causale de ces gènes est potentiellement plus facile car supposée localisée dans les régions promotrices, de nombreux travaux choisissent de se

focaliser sur l'identification des réseaux de gènes régulés par des eQTL locaux (Bing et Hoeschele, 2005 ; Ponsuksili *et al.*, 2008 ; Yamashita *et al.*, 2005). Il s'agit alors de détecter un eQTL local puis d'exploiter les degrés de corrélation existant entre l'expression du gène régulé par cet eQTL et celle d'autres gènes régulés par la même région pour identifier un réseau de gènes fonctionnels. L'efficacité d'une telle méthode est conditionnée par le fait que (i) le nombre d'eQTL locaux détectés dans une région soit approprié (faible mais au moins un), que (ii) l'eQTL local identifié soit réellement le gène causal du QTL, que (iii) l'expression du gène considéré soit régulée en cis et pas en trans, et enfin que (iv) la qualité de fixation de l'ARNm cible sur la sonde correspondante présente sur la puce ne soit pas fluctuante (Alberts *et al.*, 2005).

L'information concernant le différentiel d'expression entre deux groupes d'individus est régulièrement utilisée en transcriptomique. La plupart des méthodes de détection de candidats fonctionnels permettent alors de détecter des gènes fortement différentiellement exprimés entre groupes d'individus. Pourtant, biologiquement parlant, des gènes possédant un faible différentiel d'expression entre différentes conditions peuvent être tout aussi intéressants. Partant de cette hypothèse, Mootha *et al.* (2003) ont proposé une nouvelle méthode de détection de gènes différentiellement exprimés pouvant s'appliquer aux analyses eQTL (Wu *et al.*, 2008) : c'est la méthode GSEA, pour Gene Set Enrichment Analysis, qui consiste à tester l'enrichissement en groupe de gènes prédéfinis dans une liste de gènes classés selon leurs différentiels d'expression. Cette méthode propose d'utiliser des groupes de gènes générés a priori en fonction de leurs similitudes fonctionnelles. Elle a ainsi permis aux auteurs de trouver un groupe de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative faiblement exprimés chez des individus diabétiques alors que le différentiel d'expression n'était que de l'ordre de 20%.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les truites utilisées dans cette étude consistent en une sélection des individus F2 issus du protocole de croisement HR X LR mis en place pour la détection de QTL (Chapitre III, p. 92). L'utilisation de puces à ADN Agilent, technologie avancée mais coûteuse, nous a contraint à choisir 192 individus parmi les 1075 ayant subi les deux challenges de salinité successifs.

Pour effectuer ce choix, nous avons d'abord déterminé qu'il serait optimal de travailler sur 3 des 5 familles, ce qui porterait à 64 le nombre d'individus étudiés par famille. En effet, les résultats obtenus dans la partie primolocalisation de QTL (p.125) montrent que les familles X3, X4 et X17 rassemblent la majorité de l'information nécessaire pour identifier les QTL détectés.

Afin d'identifier les individus à sélectionner dans chaque famille, une Analyse en Composante Principale (ACP) a été réalisée sur les individus en prenant en compte les valeurs plasmatiques résiduelles obtenues suivant le modèle (3) (p.106) pour les 4 caractères plasmatiques à savoir chlore1, chlore2, sodium1 et sodium2. La fonction linéaire des 4 caractères définissant le premier axe de l'ACP a ensuite été utilisée pour sélectionner les 64 individus les plus extrêmes intrafamille (les 32 coordonnées les plus faibles et les 32 les plus fortes). Ainsi, nous avons sélectionné, par famille, les individus ayant les valeurs les plus extrêmes pour une combinaison des caractères plasmatiques représentant une divergence maximum de réponse physiologique aux 2 challenges de salinité.

2.2. Lames de verres Agilent 15k dédiées branchie: Du design à l'utilisation

1. Design

Le choix du format de puce à ADN à utiliser s'est porté sur des puces AGILENT 8 x 15k. Les puces Agilent 15k pouvant accepter la présence de 15208 oligos, nous avons sélectionné 15208 gènes en fonction d'expériences effectuées au préalable. Nous avons tout d'abord choisi d'intégrer dans les gènes de la puce, des candidats fonctionnels identifiés statistiquement dans deux expériences passées. La première, décrite dans le chapitre II, a révélé l'importance de 249 gènes (p.47) dans les processus de réponse à un choc hyperosmotique à 32 PSU. La seconde, non décrite ici, traitant de la réponse de truites arc-en-ciel à un stress de confinement, avait mis en évidence 319 gènes candidats.

Une fois ces 602 candidats de premier ordre sélectionnés, les 14606 places restantes ont été utilisées pour des gènes s'exprimant fortement et spécifiquement dans la branchie. Pour cela, deux expériences ont été menées sur des puces multitissus commerciales « truites » Agilent 44k (Salem *et al.*, 2008). Une comparaison a été effectuée entre les résultats de l'hybridation d'ARN de différents tissus (rate, muscle, ovaire, testicule et branchie) de truite arc-en-ciel permettant de sélectionner 7983 gènes spécifiquement exprimés dans la branchie (données non présentées). Par ailleurs, une expérience d'hybridation d'échantillons d'ARN de

branchie de truite arc-en-ciel a permis de sélectionner les 6598 gènes s'exprimant le plus dans la branchie (données non présentées). Finalement, après avoir vérifié les redondances et la présence d'oligos Agilent pour les gènes sélectionnés, 15083 gènes ont été placés sur la puce en utilisant des oligos Agilent et seulement 125 oligonucléotides ont été nouvellement dessinés. La puce générée porte le nom de gillarray et le numéro Agilent AmadID 023781.

2. *Extraction des acides nucléiques et marquage*

Une fraction de chaque échantillon de branchie (environ 100 mg) a été broyée et l'ARN total extrait par la méthode à étape unique au guanidium isothiocyanate-phenol-chlorophorm (Chomczynski et Sacchi, 1987) en utilisant 1mL de TRIzol par échantillon. Afin de réduire les risques d'activité RNase, les solutions d'ARN obtenues ont été reprises dans 50 μ L d'eau RNase free contenant 80 U / mL de RNase inhibitor. L'intégrité de l'ARN, ainsi que sa concentration, ont été contrôlées à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.) et d'un Bioanalyseur Agilent 2100 (RNA Nano 6000 Chip / 2100 Bioanalyzer) (Agilent, Palo Alto, CA).

Le marquage des sondes s'est effectué en incorporant à nos ARN de la cyanine 3 lors de la synthèse d'ARN complémentaire (ARNc) en suivant les indications du fournisseur (Quick Amp Labeling (Agilent, Palo Alto, CA)). Brièvement, une quantité de 350 ng d'ARN de chaque prélèvement branchial s'est vu rétro-transcrit en présence d'amino-allyl deoxyuridine triphosphate (dUTP), d'amorces oligo-d (T) et de reverse transcriptase MMLRT (Invitrogen). Les ADNc synthétisés ont ensuite été marqués à la cyanine3 pendant une réaction permettant l'obtention d'ARNc. Préalablement au marquage, une étape consiste à introduire dans nos solutions d'ARN une solution de spike de concentration connue. Cette étape permettra par la suite de quantifier un rapport entre quantité de sonde hybridée et fluorescence du spot. Une fois nos échantillons marqués, ils sont purifiés sur colonne (RNeasy Mini kit (QIAGEN, Valenica, CA)) afin d'enlever les fluorophores non incorporés. La qualité des réactions de marquage est ensuite vérifiée en mesurant la quantité en ARNc produit ($[ARNc]*30 / 1000$) et l'activité spécifique liée à la cyanine ($[cy3] / (1000*[ARNc])$) en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.). Ce dosage permet alors de valider le bon déroulement des étapes de marquage et de purification. Les échantillons doivent présenter au moins 1,65 μ g d'ARNc et une activité spécifique supérieure à 8.

3. Hybridation, lavage et scan

Pour chaque échantillon, 600 ng d'ARNc ont été dilués dans de l'eau pour un volume final de 19 μ L afin d'être utilisés pour préparer l'hybridation. Cinq μ L de « Blocking Agent 10X » ont été ajoutés à chaque échantillon, ainsi qu'1 μ L de tampon de fragmentation 25X, pour obtenir un volume final de 25 μ L. Après une incubation de 30 min. à 60°C à l'abri de la lumière, 25 μ L de « Gex 2X » ont été ajoutés puis la solution a été homogénéisée. Une centrifugation à 13000 rpm pendant une minute a ensuite été réalisée. Pour chaque échantillon, 40 μ L de solution d'hybridation ont été déposés sur la puce à ADN, chaque puce contenant 8 zones d'hybridation correspondant à 8 échantillons. L'assemblage puce-cassette est ensuite placé au four à hybrider Agilent pendant 17 heures à 65°C à 10 rpm. Les puces sont enfin lavées dans 2 solutions de tampon successives. L'étape de lavage peut se faire pour 4 puces simultanément. Le scan s'est effectué sur un scanner Agilent suivant les instructions du constructeur. L'acquisition des données a été effectuée par le logiciel Scan Control. Enfin, le logiciel Feature Extraction a ensuite été utilisé pour effectuer un premier contrôle de la qualité d'hybridation des lames et disposer les grilles nécessaires à la reconnaissance des spots de chaque zone.

4. Contrôle qualité et normalisation des données

L'analyse des QC Reports fournis après scanner et traitement par Feature Extraction a permis de vérifier l'absence de problèmes sur les lames. De nombreux critères sont alors vérifiés concernant l'uniformité des spots, leur saturation, la distribution de leurs intensités, la distribution spatiale des signaux médians de chaque ligne et colonne de spots, la révélation des contrôles positifs, l'intensité du bruit de fond, la reproductibilité du spotting à partir de réplicats, ainsi que la corrélation entre force du signal et concentration en ARNc.

Afin de supprimer les spots aberrants, les informations fournies par Feature Extraction concernant les critères de contrôle, de non-uniformité (individuelle et de la population), de saturation et d'existence réelle (signal significativement supérieur au bruit de fond et positif) du spot ont été utilisés.

La normalisation des données s'est effectuée à l'aide du logiciel SAS 9.0 (SAS® statistics). Les fichiers bruts importés contenaient pour chaque individu, les valeurs d'expression, ainsi que les informations concernant les critères de contrôle et autres renseignements pour les 15208 transcrits de puce. Dans le cas simple traité ici de la mesure d'un phénotype expressionnel en monocouleur, la normalisation consiste en un simple

passage en logarithme 10 des valeurs d'expression « gProcessedSignal » proposées par Feature Extraction (signal corrigé pour un bruit de fond local) afin d'obtenir une distribution proche de la normalité et d'un centrage de ces valeurs par la médiane des valeurs de chaque individu.

Pour chaque gène, la moyenne et l'écart type de la distribution des valeurs d'expression ont été calculées. Les valeurs situées à plus de 3 écarts-types de la moyenne de chaque gène ont été considérées manquantes (NA).

2.3. Correction des données d'expression

Les données d'expression des 15148 gènes sont potentiellement sous la dépendance de facteurs dits techniques (lots d'hybridation, lots de marquages, lots d'extraction) mais aussi environnementaux (lots d'animaux principalement). Dans cette étude, les échantillons ont constamment été randomisés entre chaque étape afin de pouvoir prendre en compte au mieux ces facteurs en évitant d'avoir des effets confondus. Les facteurs ayant potentiellement un effet sur l'expression de nos gènes sont ici

En ce qui concerne les facteurs techniques:

- la date d'extraction d'ARN
- la date de marquage à la cyanine des que
- la date d'hybridation des échantillons sur puce Agilent

En ce qui concerne les effets environnementaux

- le bassin du second challenge de salinité
- le poids et la longueur des poissons.

Ainsi, un modèle complet est proposé pour chaque gène

$$Y_{ijklm} = \mu + dm_i + dh_j + de_k + t2_j + \beta_1 * \text{weight} + \beta_2 * \text{length} + E_{ijklm}$$

Où

Y_{ijklm} est la valeur d'expression du gène (log10 du gProcessedSignal centré par puce)

μ est la moyenne générale du modèle

dm_i représente l'effet fixe de la date de marquage (10 niveaux)

dh_i représente l'effet fixe de la date d'hybridation (7 niveaux)

de_i représente l'effet fixe de la date d'extraction (10 niveaux)

$t2_i$ représente l'effet fixe du bassin de deuxième challenge (20 niveaux)

weight est le poids vif au premier challenge

length est la longueur du corps (à la fourche) au premier challenge

et E_{ijklmn} est le résidu du modèle supposé normalement distribué avec une moyenne de 0 et une variance σ_e^2

Le test des effets de ce modèle linéaire (SAS 9 GLM procedure) pour chacun des 15148 gènes a permis de définir un modèle de description des données relatives à chaque gène en retenant les effets significatifs à 0,20. Ce modèle a ensuite été utilisé dans les analyses réalisées avec le logiciel QTLMap (Filangi *et al.*, 2010).

Pour la détection de QTL, la même méthode de cartographie d'intervalle décrite par Elsen *et al.* (1999), vue dans le chapitre précédent, a été appliquée en considérant un jeu de données composé de familles de plein-frères indépendantes, sans faire d'hypothèse à propos du nombre et de la fréquence des allèles au QTL intra population de fondateurs. Le test statistique utilisé pour comparer les hypothèses de présence d'un eQTL (H1) contre celle d'absence de eQTL (H0) à une position a consisté en un test du maximum de vraisemblance approximée (LRT) (Le Roy *et al.*, 1998). Tout comme dans la partie QTL, la détermination des seuils de significativité a été établie à partir de simulation sous l'hypothèse nulle d'absence de QTL. Cette étape étant très coûteuse en temps de calcul, nous avons validé sur quelques gènes que les seuils obtenus variaient très peu (en principe la loi asymptotique de la statistique de test est la même et ne dépend que du nombre de famille) d'un gène à l'autre en fonction des données manquantes.

2.4. Analyses des résultats

Après une brève analyse descriptive des résultats obtenus (nombre de gènes dont l'expression est significativement régulée par des régions eQTL, niveau moyen de significativité, distribution des lrt), la méthodologie suivante est appliquée afin de proposer un nombre réduit de gènes candidats robustes:

Une première étape consistera à déterminer les gènes et régions eQTL intéressants sans formuler d'a priori fonctionnel. Trois filtres sont appliqués aux données :

-un premier groupe de gènes correspond à ceux dont l'expression est sous la dépendance d'une région eQTL et qui correspondent à des gènes candidats fonctionnels obtenus dans le chapitre II (p.47).

-un second groupe est constitué de gènes dont l'expression est régulée par plusieurs régions eQTL colocalisant ou situées à proximité de QTL primolocalisés.

-le dernier consiste en des gènes dont l'expression est régulée par des régions eQTL et cela avec une forte significativité (lrt supérieur au double du seuil de significativité à 5%).

Dans un second temps sera effectuée une sélection a priori sur les données. Elle consiste en l'analyse des annotations (assemblage s.om.10, SIGENAE) et des fonctions biologiques (Uniprot) proposées pour les différents gènes dont l'expression est régulée par une région eQTL colocalisée avec un QTL de l'acclimatation à l'eau de mer.

Lors de la troisième étape de l'analyse des résultats, nous nous centrerons sur deux QTL particulièrement intéressants, localisés sur les groupes de liaison RT10 et RT19. Il s'agira d'observer les relations existantes entre les différents gènes dont l'expression est régulée par une région eQTL détectée sur ces groupes de liaison et le caractère pour lequel a été détecté le QTL primolocalisé. Deux filtres sont ici appliqués. Le premier consiste en l'étude de la corrélation brute entre l'expression des gènes considérés et les valeurs du caractère. Le second correspond en une détection de QTL pour le caractère menée en plaçant l'expression de chaque gène l'un après l'autre en covariable du modèle. Ceci permet de déterminer la significativité de l'effet de l'expression du gène sur le modèle et de connaître l'importance de la corrélation résiduelle associée.

Enfin, est proposée une analyse de l'information fonctionnelle soutenue par les QTL précédemment détectés. Il s'agit alors d'analyser l'ensemble les ontologies de gènes (GO) de tous les eQTL détectés aux intervalles de confiance de chaque QTL de l'acclimatation à l'eau de mer en reprenant les enrichissements en processus biologiques (BP) observés.

3. Résultats

3.1. Contrôle qualité et correction des données

Lors du contrôle qualité, un échantillon d'une puce (individu portant le n° d'identification 0D93) a été écarté des analyses. Si tous les spots ont passé le critère de saturation, l'« uniformité » et l'« existence réelle » du signal ont abouti à écarter respectivement un peu plus de 1500 et 23000 spots dont la valeur a été indiquée comme manquante (NA). Enfin, 60 gènes dont la moitié ou plus des données étaient manquantes ont été supprimés de l'étude. Finalement 15148 gènes ont été conservés pour l'étude. Au final, sur l'ensemble des données d'expression, moins d'1% sont manquantes.

En ce qui concerne l'étape de correction des données, le facteur le plus souvent retrouvé est la date de marquage. Viennent ensuite la date d'hybridation, le bassin de challenge final, le poids et la longueur de l'animal. Le tableau 1 reprend les résultats obtenus. Cette étape a également permis de déceler un problème avec 2 individus se retrouvant isolés dans une modalité de facteurs (individus portant les n° d'identification 0F63 et F43F). Ils ont été écartés des analyses.

Tableau 1 : Description des différents facteurs du modèle global et nombre de gènes affectés

facteurs	code	nombre d'individus par niveau	nombre de gènes pour lesquels l'effet du facteur est significatif ($p < 0,2$)
date de marquage	dm	8 à 28	13 577
date d'hybridation	dh	8, 24 puis 32	8 596
bassin de salinité final	t2	6 à 14	6 905
date d'extraction	de	17 à 24	3 866

3.2. Description des résultats

Les analyses ont permis de détecter un total de 2617 eQTL avec un niveau de significativité de 5% au niveau génomique soit 1‰ au niveau chromosomique. Ce résultat, indiquant que plus de 17% des gènes présents sur la puce utilisée possèdent au moins une région eQTL, est en accord avec le nombre moyen de gènes dont l'expression serait régulée par des régions eQTL décrit entre 10 et 30% par Williams *et al.* (2007).

Le nombre d'eQTL détectés par groupe de liaison est présenté sur la figure 18.

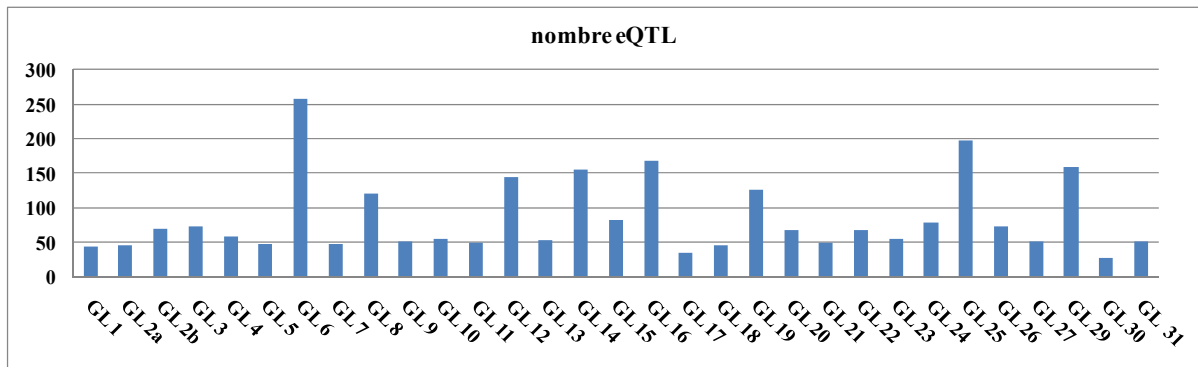


Figure 18 : Nombre de QTL d'expression détectés selon le groupe de liaison considéré au seuil de significativité de 5% au niveau du génome.

Cet histogramme permet de mettre en avant les groupes de liaison RT6, RT8, RT12, RT14, RT16, RT19, RT25 et RT29 par leur nombre important de QTL d'expression ($n > 100$). Cependant, tous ces eQTL doivent ensuite être mis en relation avec les caractères décrivant l'acclimatation à l'eau de mer pour répondre à notre objectif de cartographie fine de QTL.

La valeur seuil correspondant au niveau de significativité à 5% au niveau du groupe de liaison après correction de Bon Ferroni, varie entre 23,42 et 30,34 et sa moyenne est de 27,76. La figure 19 présente la distribution des lrt observées dans cette expérience.

Histogramme de fréquence des lrt

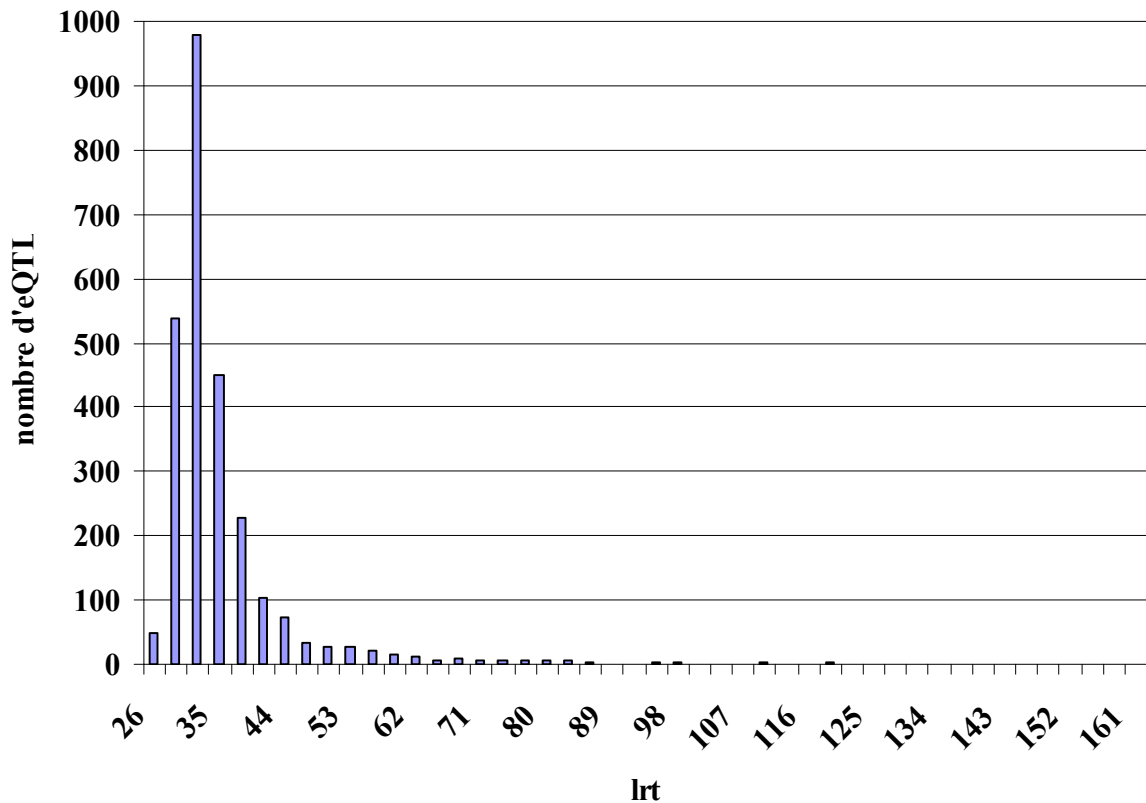


Figure 19 : Histogramme de fréquence présentant la distribution des valeurs de lrt obtenues lors des analyses eQTL pour les 2617 régions eQTL détectées.

3.3. Caractérisation des eQTL

1. Sélection de gènes sans a priori biologique

a) Recouvrement avec les candidats différentiels

Une première source d'information est fournie par les résultats de l'étude de transcriptomique différentielle eau douce / eau de mer menée précédemment (chapitre 2). Parmi tous les eQTL détectés, 31 sont des candidats uniques précédemment proposés dans cette étude et nommés candidats différentiels (p.47). Le tableau 2 reprend la liste de ces candidats et indique le nombre d'eQTL obtenus pour chacun d'entre eux.

Tableau 2 : Gènes candidats différentiels retrouvés dans les analyses de recherche d'eQTL.

n (1)	Description (2)
2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 [Homo sapiens]
2	Myb-binding protein 1A-like protein [Danio rerio]
2	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4 [Mus musculus]
2	Fermitin family homolog 3 [Mus musculus]
2	C-type lectin domain family 4 member M [Hylobates syndactylus]
1	PREDICTED: similar to immunoglobulin superfamily, member 9B [Danio rerio]
1	PRKR-interacting protein 1 homolog [Danio rerio]
1	follistatin-like 3 glycoprotein [Oncorhynchus mykiss]
1	elongation factor-1, delta, b isoform 2 [Danio rerio]
1	Synaptobrevin homolog [Danio rerio]
1	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 [Danio rerio]
1	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog [Rattus norvegicus]
1	Pancreatic alpha-amylase [Struthio camelus]
1	Apolipoprotein O-like [Gallus gallus]
1	T-complex protein 1 subunit alpha (Fragment) [Ambystoma mexicanum]
1	Scavenger receptor class B member 1 [Homo sapiens]
1	Ig kappa chain V-I region Walker [Homo sapiens]
1	UPF0461 protein C5orf24 homolog [Mus musculus]
1	Collagenase 3 (Fragment) [Xenopus laevis]
1	ES1 protein homolog, mitochondrial [Homo sapiens]
1	Heat shock factor protein 2 [Mus musculus]
1	H(+)/Cl(-) exchange transporter 5]
1	CTP synthase 1 [Danio rerio]
1	<i>BX320373.s.om.10</i>
1	Chloride channel protein 2 [Cavia porcellus]
1	MYC-induced nuclear antigen [Homo sapiens]
1	Selenoprotein M [Danio rerio]
1	ES1 protein homolog, mitochondrial [Homo sapiens]
1	UPF0461 protein C5orf24 homolog [Mus musculus]
1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 [Mus musculus]
1	Actin-related protein 6 [Homo sapiens]

(1) Nombre de fois que le gène a été détecté comme eQTL

(2) Selon l'assemblage s.om10 de Siganae

Ces gènes, dont l'expression est impliquée dans les processus d'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel, représentent potentiellement un premier groupe de candidats d'intérêt particulier. Cependant, comme ils sont régulés par différents processus biologiques, il est important de croiser ces résultats avec ceux de l'analyse QTL précédemment menée afin de répondre à notre objectif de cartographie fine de QTL.

b) Colocalisation QTL / eQTL

Au total, 447 (436 uniques) eQTL, sur les 2617 détectés, sont retrouvés à des positions situées dans les intervalles de confiance des QTL primolocalisés.

Un cas particuliers est l'observation du groupe de liaison RT19 sur lequel apparaît une zone de forte présence d'eQTL entre 85 et 115 cM. Cette zone a la particularité de se situer au niveau de l'intervalle de confiance des QTL détectés pour les caractères chlore2 et sodium2 (figure 20).

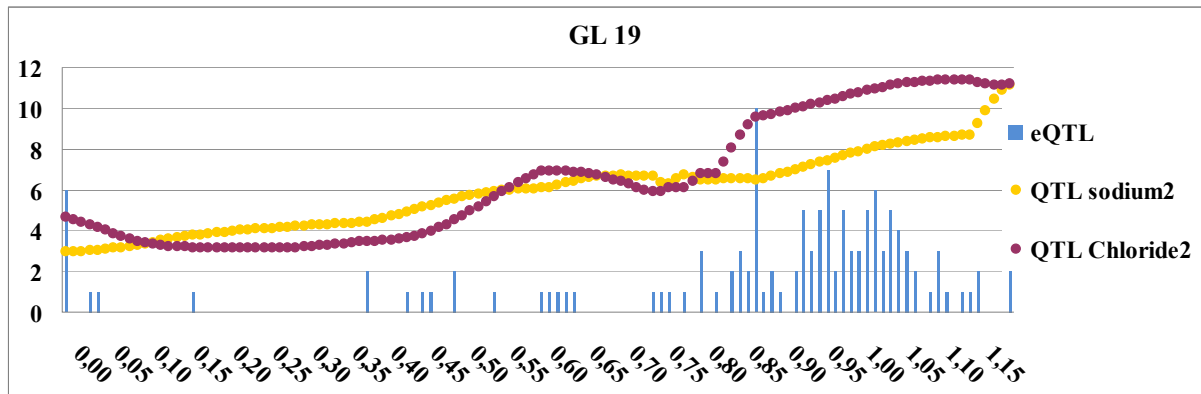


Figure 20 : Nombre de QTL d'expression en fonction de la position sur le groupe de liaison RT19 et évolution des lrt pour les QTL du sodium2 et chlore2 détectés sur ce même groupe de liaison

D'après Shadt *et al.* (2005), l'une des informations les plus importantes réside dans le fait de trouver des régions eQTL colocalisant à plusieurs endroits du génome avec les QTL influençant le caractère.

Ainsi, en balayant les résultats eQTL obtenus, une quarantaine de gènes semblent particulièrement intéressants. Les résultats sont résumés dans le tableau 3. C'est le cas du gène codant pour l'enzyme de conjugaison de NEDD8 Ubc12 détecté comme eQTL sur RT9, RT25 et RT26 à des positions voisines ou colocalisées avec des QTL influençant les concentrations en chlore. Ce gène précédemment identifié parmi les 39 plus importants candidats fonctionnels dans l'expérimentation de transfert eau douce / eau de mer présentée en chapitre II de ce manuscrit (tableau 2, p.69), est un candidat de premier ordre. L'expression d'un second gène, figurant également dans cette liste de candidats fonctionnels, codant pour une protéine homologue de l'estérase1, est régulée par des eQTL détectés sur les groupes de liaison RT14 et RT26 dans les zones portant des QTL affectant respectivement le sodium1 et la combinaison de tous les caractères. Deux autres gènes sont également à mettre en avant. Nous avons vu précédemment (Chapitre II, p.48-49) que des sulfotransférases paraissent impliquées dans les processus d'acclimatation à l'eau de mer. Il faut ainsi souligner une protéine de la famille des sulfotransférases cytosoliques 2B dont l'expression du gène est régulée par des eQTL localisés sur RT8 et RT29, à des positions proches ou sur des QTL affectant les niveaux de chlore et de sodium. Nous associons à ce gène celui codant pour une

protéine sérine / thréonine kinase, dont l'expression est régulée par les mêmes régions génétiques. Enfin, l'expression de trois oligonucléotides différents codant pour une même protéine (protéine membranaire associée à des vésicules 8 / synaptobrevine) est mentionnée régulée par 3 eQTL très proches l'un de l'autre (moins de 3cM les séparent), avec des rapports de maximum de vraisemblance très élevés, et colocalisant avec les QTL détectés précédemment sur RT19.

Tableau 3 : eQTL présents à plusieurs endroits du génome et à proximité de régions QTL.

RT (1)	M (2)	H0/H1 (3)	Description (4)
8	0,17	31,287	(sp:O00204) Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1 OS=Homo sapiens GN=SULT2B1 PE=1 SV=2
29	0,38	31,173	
19	0,75	29,43	(sp:O13085) Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1
19	1,02	32,843	
8	0,47	28,452	(sp:O14730) Serine/threonine-protein kinase RIO3 OS=Homo sapiens GN=RIOK3 PE=1 SV=2
29	0,53	30,353	
15	0	36,801	(sp:O95819) Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4K4 PE=1 SV=2
29	0,67	30,459	
8	0,14	31,968	(sp:P13105) Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rana temporaria GN=tpm1 PE=2 SV=1
8	0,24	40,469	
10	0,28	30,945	(sp:P24329) Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE=1 SV=3
15	0,29	29,231	
19	1,04	31,089	
31	0,04	54,736	(sp:P26447) Protein S100-A4 OS=Homo sapiens GN=S100A4 PE=1 SV=1
31	0,04	29,928	
14	0,87	37,218	(sp:P30042) ES1 protein homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C21orf33 PE=1 SV=3
26	0,31	27,544	
26	0,31	27,186	
9	0,58	101,695	(sp:P49947) Ferritin, middle subunit OS=Salmo salar PE=2 SV=1
9	0,59	80,243	
9	0,61	55,02	
9	0,61	37,334	
9	0,63	51,185	
9	0,64	37,204	
10	0,46	30,542	
19	1,03	31,615	(sp:P62155) Calmodulin OS=Xenopus laevis GN=calm1 PE=1 SV=2
14	0,87	31,787	
19	0,84	29,687	(sp:Q1JPD8) Solute carrier family 43 member 3 OS=Bos taurus GN=SLC43A3 PE=2 SV=1
14	0,67	51,595	
25	0,16	30,987	(sp:Q2KHU5) MACRO domain-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=MACROD1 PE=2 SV=1
14	0,7	47,828	
14	0,9	39,635	(sp:Q5REQ5) Vesicle-associated membrane protein 8 OS=Pongo abelii GN=VAMP8 PE=3 SV=1
19	1,02	76,082	
19	1,02	74,464	
19	1,05	66,317	(sp:Q5XJ36) Protein DJ-1 OS=Danio rerio GN=park7 PE=2 SV=1
25	0,19	31,746	
29	0,58	38,936	(sp:Q5ZLH0) NTF2-related export protein 2 OS=Gallus gallus GN=NXT2 PE=2 SV=1
19	1,07	28,734	
19	1,1	39,369	(sp:Q6P698) Plastin-2 OS=Danio rerio GN=lcp1 PE=2 SV=1
4	0,15	26,791	
26	0,55	31,522	
26	0,55	27,875	(sp:Q8R4U2) Protein disulfide-isomerase OS=Cricetulus griseus GN=P4HB PE=2 SV=1
15	0	35,301	
26	0,55	28,962	(sp:Q8VE97) Splicing factor, arginine/serine-rich 4 OS=Mus musculus GN=Sfrs4 PE=2 SV=1
14	0,66	35,978	
14	0,68	33,08	(sp:Q9D7M8) DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4 OS=Mus musculus GN=Polr2d PE=2 SV=2
15	0,32	37,715	
26	0,15	47,175	
14	0,7	31,553	(sp:Q9H773) dCTP pyrophosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=DCTPP1 PE=1 SV=1
19	0,95	30,974	
9	0	71,993	[BBH] CR032_ESOLU (sp:C1BY38) UPF0729 protein C18orf32 homolog OS=Esox lucius PE=3 SV=1
9	0,17	58,084	
9	0,23	56,259	
21	0,49	29,735	
27	0,06	31,151	[BBH] CS042_SINCH (sp:Q2KKX7) UPF0608 protein C19orf42 homolog OS=Siniperca chuatsi PE=3 SV=1
4	0	25,838	
19	1	29,829	[BBH] ILF3_DANRE (sp:Q6NXA4) Interleukin enhancer-binding factor 3 homolog OS=Danio rerio GN=ilf3 PE=1 SV=1
15	0,23	33,221	
19	1,05	29,118	
15	0,29	42,36	[BBH] SGK3_MOUSE (sp:Q9ERE3) Serine/threonine-protein kinase Sgk3 OS=Mus musculus GN=Sgk3 PE=1 SV=1
29	0,54	29,065	
4	0	28,975	[BBH] URP2_MOUSE (sp:Q8K1B8) Fermitin family homolog 3 OS=Mus musculus GN=Fermt3 PE=1 SV=1
8	0,63	32,786	
15	0,02	30,717	[BBH] WDR3_HUMAN (sp:Q9UNX4) WD repeat-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=WDR3 PE=1 SV=1
29	0,69	29,431	
14	0	48,761	hypothetical protein LOC796019 [Danio rerio]
15	0,31	27,83	
19	1,02	31,695	
8	0,26	32,382	XP2_HUMAN (sp:P98164) Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRP2 PE=1 SV=1
23	0,37	35,403	
14	0,71	32,357	PREDICTED: Equus caballus F-box and WD repeat domain containing 7, transcript variant 1 (FBXW7), mRNA
19	0,99	32,702	
9	0,69	41,992	Salmo salar 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 (plcb3), mRNA
27	0,86	31,106	
9	0,13	31,679	Salmo salar NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 (ubc12), mRNA
25	0,01	29,199	
26	0,01	28,93	
15	0,12	40,948	Salmo salar Ras-related protein Rab-8A (rab8a), mRNA
15	0,12	39,613	
27	0,77	41,424	
9	0,68	33,157	Salmo salar Sorting nexin-18 (snx18), mRNA
14	0,87	33,783	
27	0,51	30,273	
27	0,54	31,17	Salmo salar Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H (ube2h), mRNA
29	0,64	30,584	

(1) Groupe de liaison (2) Position de l'eQTL en Morgan (3) Valeur de lrt (4) Selon l'assemblage s.om.10 de Sigenae

c) Régions eQTL à forte significativité

Le génome de la truite n'étant pas séquencé, et très peu de gènes étant cartographiés, il nous est impossible de pouvoir déterminer à l'heure actuelle si les eQTL colocalisés avec des QTL sont des eQTL locaux ou distants. En cas d'eQTL local, le gène correspondant représente un excellent candidat, et d'après Doss *et al.* (2005), lorsque l'expression d'un gène est régulée par une région eQTL de type cis, cela implique un niveau de significativité important. Parmi les 166 gènes (149 uniques) pour lesquels nous avons détecté un eQTL à fort lrt, et donc possédant potentiellement un fort effet de substitution, 27 (24 uniques) sont localisés dans l'intervalle de confiance d'un QTL de l'acclimatation à l'eau de mer (tableau 4).

Tableau 4 : Régions eQTL à forte significativité.

RT (1)	M (2)	H0/H1 (3)	Description (4)
4	0	69,206	[BBH] CNIH_PONAB (sp:Q5RDB5) Protein cornichon homolog OS=Pongo abelii GN=CNIH PE=2 SV=1
5	0,09	63,56	(sp:P26352) Thymosin beta-12 OS=Oncorhynchus mykiss PE=1 SV=2
5	0,12	56,204	(sp:P50169) Retinol dehydrogenase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Rdh3 PE=1 SV=1
9	0,17	58,084	[BBH] CR032_ESOLU (sp:C1BY38) UPF0729 protein C18orf32 homolog OS=Esox lucius PE=3 SV=1
9	0,23	56,259	[BBH] CR032_ESOLU (sp:C1BY38) UPF0729 protein C18orf32 homolog OS=Esox lucius PE=3 SV=1
10	0,21	50,36	(sp:Q7ZYB4) Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Xenopus laevis GN=paip1 PE=1 SV=1
10	0,23	109,615	(sp:Q9D0B0) Splicing factor, arginine/serine-rich 9 OS=Mus musculus GN=Sfrs9 PE=1 SV=1
10	0,31	49,3	[DHDH] DANRE (sp:Q642M9) Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase OS=Danio rerio GN=dhdh PE=2 SV=1
14	0,67	51,595	(sp:Q1JPD8) Solute carrier family 43 member 3 OS=Bos taurus GN=SLC43A3 PE=2 SV=1
14	0,7	47,828	(sp:Q2KHU5) MACRO domain-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=MACROD1 PE=2 SV=1
14	0,31	82,983	[BBH] CD032_HUMAN (sp:Q8N8J7) Uncharacterized protein C4orf32 OS=Homo sapiens GN=C4orf32 PE=1 SV=1
14	0	48,761	hypothetical protein LOC796019 [Danio rerio]
14	0,27	55,865	Salmo salar PR domain zinc finger protein 9 (prdm9), mRNA
19	1,02	76,082	(sp:Q5REQ5) Vesicle-associated membrane protein 8 OS=Pongo abelii GN=VAMP8 PE=3 SV=1
19	1,02	74,464	(sp:Q5REQ5) Vesicle-associated membrane protein 8 OS=Pongo abelii GN=VAMP8 PE=3 SV=1
19	1,05	66,317	(sp:Q5REQ5) Vesicle-associated membrane protein 8 OS=Pongo abelii GN=VAMP8 PE=3 SV=1
19	0,87	54,423	[BBH] SYQ_BOVIN (sp:Q3MHH4) Glutaminyl-tRNA synthetase OS=Bos taurus GN=QARS PE=2 SV=1
19	0,98	50,408	<i>BX913723.s.om.10</i>
21	0,2	50,758	(sp:Q7YRL5) Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 OS=Canis familiaris GN=CD40 PE=2 SV=1
25	0,09	53,558	(sp:Q9D4J7) PHD finger protein 6 OS=Mus musculus GN=Phf6 PE=1 SV=1
25	0,15	78,817	[BH] NDK5_HUMAN (sp:P56597) Nucleoside diphosphate kinase homolog 5 OS=Homo sapiens GN=NME5 PE=1 SV=1
26	0,55	47,919	(sp:Q69566) Uncharacterized protein U88 OS=Human herpesvirus 6A (strain Uganda-1102) GN=U88 PE=4 SV=1
27	0,06	73,425	(sp:Q5RCE5) BOLA-like protein 1 OS=Pongo abelii GN=BOLA1 PE=2 SV=1
27	0	49,515	(sp:Q7SXU0) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A OS=Danio rerio GN=eif3ja PE=1 SV=1
29	0,56	49,952	(sp:A6QLN9) von Willebrand factor A domain-containing protein 1 OS=Bos taurus PE=2 SV=1
29	0,57	52,677	(sp:P14483) H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain OS=Mus musculus GN=H2-Ab1 PE=1 SV=1
31	0,04	54,736	(sp:P26447) Protein S100-A4 OS=Homo sapiens GN=S100A4 PE=1 SV=1

(1) Groupe de liaison (2) Position de l'eQTL en Morgan (3) Valeur de lrt (4) Selon l'assemblage s.om.10 de Sigenae

2. Sélection de gènes avec a priori fonctionnel

Si nous sélectionnons parmi les gènes colocalisés ceux présentant une significativité relativement importante et une annotation intéressante, nous obtenons un groupe de 33 eQTL (32 uniques), présenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Description des QTL d'expression colocalisés avec des QTL détectés.

RT (1)	Nom d'oligo	Description (2)	QTL correspondant
4	TC116482	Protein cornichon homolog [Pongo abelii]	tous
4	TC104654*	ferritin family homolog 3 [Danio rerio]	tous
4	TC111236	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate [Salmo salar]	chlores
5	TC128038	Retinol dehydrogenase 3 [Oncorhynchus mykiss]	chlores / plasmatic
5	TC130172	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial [Rattus norvegicus]	chlores / plasmatic
8	CUST_116_P1415800147	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 [Homo sapiens]	chlore2
9	TC117190	ferritin H-3 [Oncorhynchus mykiss]	pdsbchies
9	TC126498	Phosphatidylcholine transfer protein [Oncorhynchus mykiss]	pdsbchies
9	CUST_38_P1415800147*	polyprotein [Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus]	pdsbchies
10	TC124551	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]	chlore2 / chlores / challenge2
10	TC110906	splicing factor, arginine/serine-rich 9 [Danio rerio]	chlore2 / chlores / challenge2
14	TC105943	Cysteine protease ATG4B [Salmo salar]	sodium2
14	TC105426	PREDICTED: similar to alpha-2-macroglobulin receptor [Danio rerio]	sodiums
14	TC103400	Cystatin [Oncorhynchus mykiss]	sodiums
14	TC106578	novel immune-type receptor 2 [Oncorhynchus mykiss]	sodiums
14	TC117700	60 kDa lysophospholipase [Homo sapiens]	sodiums
14	TC127305	mitochondrial ribosomal protein L35 [Xenopus (Silurana) tropicalis]	sodiums
14	TC107375	173 PF06369.5; Anemone_cytotox [Tetraodon nigroviridis]	sodium1
14	TC100168	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 [Homo sapiens]	sodium1
14	TC108322	predicted protein [Nematostella vectensis]	sodium1
14	TC109744	MACRO domain-containing protein 1 [Salmo salar]	sodium1
14	TC124825	Ras association domain-containing protein 2 [Salmo salar]	sodium1
19	TC132075*	Selenoprotein M [Danio rerio]	chlore2 / tous / plasmatic
19	TC100723*	XTP3-transactivated gene A protein homolog [Salmo salar]	chlore2 / tous / plasmatic
19	TC128058	Beta-4C adrenergic receptor [Meleagris gallopavo]	chlore2 / tous / plasmatic / challenge2
19	TC103537	100 PF00957.14;Synaptobrevin [Salmo salar]	chlore2 / tous / plasmatic / challenge2
21	TC121176	oxidative stress induced growth inhibitor 1 [Danio rerio]	chlore2
21	TC125440	insulin-like growth factor binding protein 3 [Oncorhynchus mykiss]	chlore2
23	TC116554	Integrin beta-1 [Ovis aries]	challenge2 / chlores
25	TC96494	nucleoside-diphosphate kinase [Danio rerio]	chlore1
25	TC111236	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate [Salmo salar]	chlore1
26	TC109414*	PREDICTED: es1 protein-like [Danio rerio]	chlore1
26	TC95284*	PREDICTED: es1 protein-like [Danio rerio]	chlore1

(1) Groupe de liaison (2) Suivant l'assemblage s.om.10 de Sigenae *oligo dont l'annotation correspond à un candidat différentiel du chapitre I

Parmi les 33 eQTL sélectionnés ici (32 uniques), 6 sont des candidats fonctionnels précédemment identifiés dans l'expérience de challenge osmotique du chapitre II. Un seul gène, dont la description correspond à un nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate, se retrouve colocalisé avec plusieurs QTL. Les 2 eQTL correspondants colocalisent ainsi avec 2 QTL des groupes de liaison 4 et 26, influençant le niveau du chlore plasmatic pour les deux challenges.

3. Etude de QTL particuliers : Les QTL du chlore2 sur RT10 et RT19

a) Analyse conjointe caractère-expression

Une fois isolé un groupe de gènes dont l'expression est sous l'influence d'eQTL potentiellement impliqués dans le processus physiologique observé, un type d'approche

consiste à relancer des détections de QTL pour un caractère, en prenant l'effet de l'expression de chaque gène en compte en tant que covariable du modèle. Ce principe est décrit dans la méthode LCMS présentée par Schadt *et al.* (2005) pour déterminer l'appartenance des eQTL détectés aux groupes d'eQTL causaux, indépendants ou réactifs. Ainsi, si un gène dont le profil d'expression mis en covariable dans un modèle de détection de QTL du caractère provoque une modification importante du profil du rapport de maximum de vraisemblance à la position du QTL initialement détecté, il sera considéré comme potentiellement affecté par le même polymorphisme que le caractère à cette position du génome.

Dans le cadre limité en temps de cette thèse, nous avons choisi d'effectuer ces tests sur deux régions génétiques particulières et pour le caractère chlore2. La première région QTL est portée par le groupe de liaison présentant les QTL les plus significatifs, à savoir RT10, et la seconde par un autre groupe de liaison révélé comme particulièrement intéressant dans le chapitre III, RT19. Le choix s'est porté sur le caractère chlore2 car celui-ci présente des QTL souvent colocalisés avec d'autres QTL détectés pour d'autres caractères, notamment sur le groupe de liaison RT19, et montrant de forts effets.

Les données de chlore2 (valeurs résiduelles du modèles (3), cf. chapitre III, p.106) présentant 4 valeurs manquantes, en plus des 3 individus enlevés lors de l'analyse eQTL, 185 individus seront analysés. Les profils d'expression utilisés comme covariables correspondent à ceux des gènes régulés par des eQTL détectés sur les groupes de liaison RT10 et RT19 regroupent respectivement 23 et 95 gènes.

Les résultats montrent l'importance particulière de 3 eQTL. Le premier, détecté sur le groupe de liaison 10 concerne un gène possédant l'annotation correspondante à une protéine de transport de choline chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Cette covariable est significative à 1‰ à la position du QTL. Les deux autres eQTL mis en avant sont détectés sur RT19. Un premier gène, dont le niveau de significativité atteint 2,8%, code pour un proto-oncogène Jun B chez le *Danio rerio*. Enfin, le gène codant pour une protéine c1orf52 toujours chez cette même espèce, présente un niveau de significativité inférieur à 5%.

b) Etude des corrélations entre caractère et expression de gènes

L'étude des corrélations entre les valeurs obtenues pour le caractère d'intérêt et les profils d'expression de gènes régulés par des régions eQTL colocalisant avec des QTL du caractère peut permettre de préciser la position des QTL (Georges, 2007). Nous choisissons

également ici, pour les mêmes raisons citées précédemment, d'utiliser les valeurs obtenues pour le caractère chlore2 (valeurs résiduelles du modèle (3) cf. chapitre III, p.106). L'analyse des corrélations entre les valeurs de chlore2 et les profils d'expression de gènes régulés par les régions eQTL détectées au niveau des intervalles de confiance des QTL des groupes de liaisons RT10 et RT19 révèle la présence de certaines corrélations significatives (figure 21 et 22). Le seuil de significativité à 5% pour les corrélations de Spearman est signalé sur les figures 21 et 22 par une droite horizontale rouge d'ordonnée 0,15. En prenant les gènes suivant des valeurs de corrélation absolue décroissante, nous pouvons ici mettre en avant un gène particulier sur RT10, auquel aucune description n'est associée, et 4 sur RT19, dont la description correspond respectivement à une tubuline beta-1, une protéine phosphatase, une protéine réceptrice et une NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5.

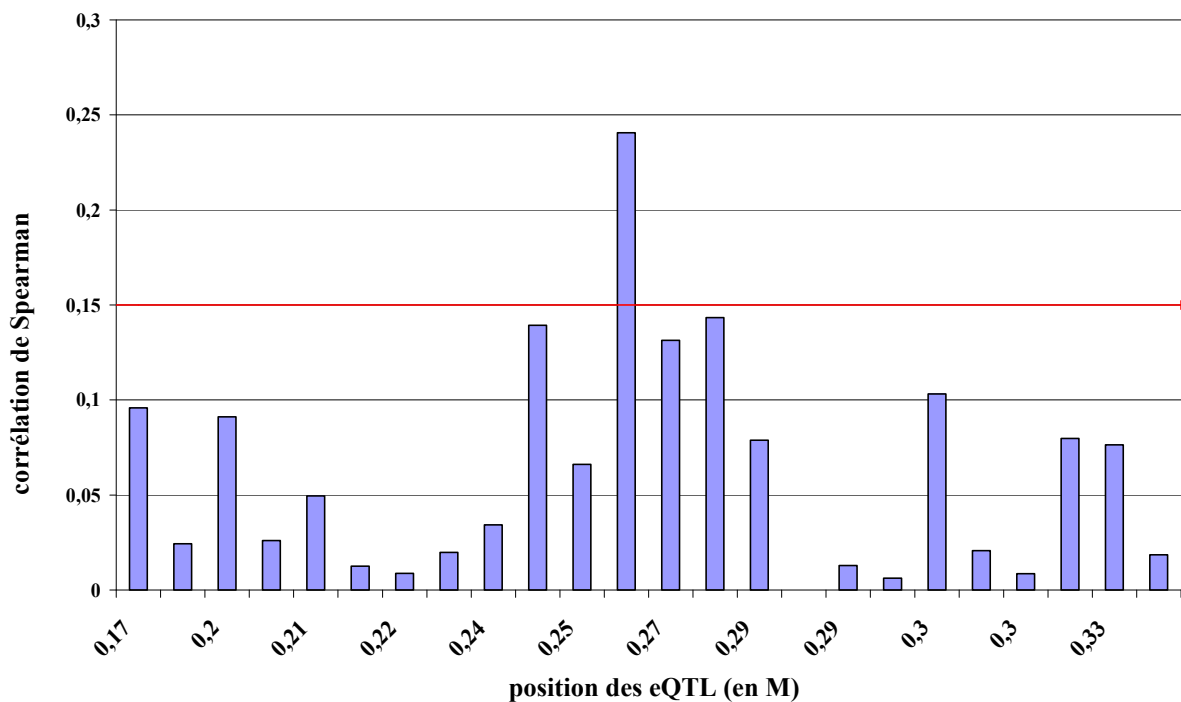


Figure 21 : Etude des corrélations (valeurs absolues) entre expression de gène régulée par un eQTL détecté dans l'intervalle de confiance du QTL (0,20 – 0,24) pour le chlore2 sur le groupe de liaison RT10 et les valeurs résiduelles du caractère chlore2

Georges (2007) propose que les corrélations entre caractère et expression de gènes régulés par un eQTL doivent augmenter lorsque la position du eQTL se rapproche de celle du QTL. Si l'étude de la répartition des coefficients de corrélation ne permet pas de conclure concernant RT19 (figure 22), il pourrait en revanche indiquer sur RT10, une position réelle du QTL autour de la position 26cM (figure 21).

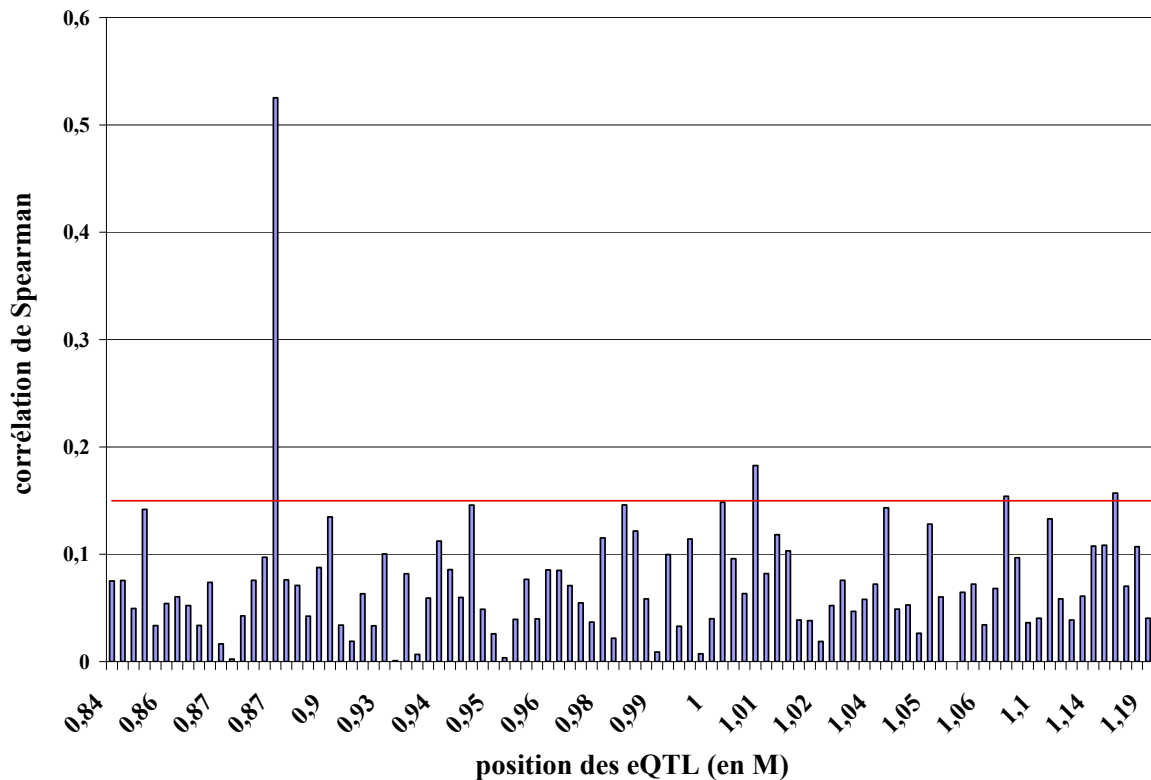


Figure 22 : Etude des corrélations (valeurs absolues) entre expression de gène régulée par un eQTL détecté dans l'intervalle de confiance du QTL (0,88 – 1,19) pour le chlore2 sur le groupe de liaison RT19 et les valeurs résiduelles du caractère chlore2

4. Enrichissement de fonctions biologiques

Comme mentionné précédemment, tous les eQTL détectés dans l'intervalle de confiance d'un QTL ne sont pas forcément reliés au processus biologique étudié, à savoir la capacité d'acclimatation à l'eau de mer. Toutefois, il peut être intéressant d'étudier les fonctions biologiques enrichies parmi les gènes dont l'expression est régulée par des eQTL dans l'intervalle de confiance d'un QTL, le principe étant de repérer les fonctions potentiellement influencées par ce dernier.

Pour chaque QTL, nous avons tenté d'établir une première liste des termes d'ontologie soutenus par les eQTL colocalisés. Le tableau 6 donne la liste des fonctions « enrichies » pour chaque QTL, le critère utilisé étant un test d'enrichissement de Fisher ($n > 2$, $p < 0,05$).

Tableau 6 : Fonctions « enrichies » parmi les gènes possédant un eQTL colocalisé avec un QTL.

Groupe de liaison, QTL, effectif processus biologique	Nom d'oligo	Description	
RT4 tous / chlore n=39 cell_cycle	TC113730	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 [Salmo salar]	
	TC96831	Zygotic DNA replication licensing factor mcm6-B [Salmo salar]	
	TC113730	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 [Salmo salar]	
	TC118723	Retinoic acid receptor responder protein 3 [Homo sapiens]	
RT5 chlore / plasmatique n=16 cell_component_organization	TC127404	General transcription factor IIE subunit 2 [Xenopus laevis]	
	TC95009	SUMO-conjugating enzyme UBC9 [Xenopus laevis]	
	metabolic_process	TC111952	Transposable element Tc1 transposase [Caenorhabditis briggsae]
		TC116243	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic [Salmo salar]
	TC127404	General transcription factor IIE subunit 2 [Xenopus laevis]	
	TC95009	SUMO-conjugating enzyme UBC9 [Xenopus laevis]	
	TC128038	Retinol dehydrogenase 3 [Oncorhynchus mykiss]	
	reg_metabolic_process	TC127404	General transcription factor IIE subunit 2 [Xenopus laevis]
TC95009		SUMO-conjugating enzyme UBC9 [Xenopus laevis]	
RT10 tous / challenge2 n=24 oxidation_reduction	TC124551*	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]	
	TC121939	pyrroline-5-carboxylate reductase 1 [Danio rerio]	
	TC118979	Cytochrome P450 2D9 [Mus musculus]	
RT14 sodium1 n=51 anatomical_structure_dvlpt	TC129464	hyperosmotic glycine rich protein [Salmo salar]	
	TC105562	CD9 antigen [Danio rerio]	
	TC118674	Histone deacetylase 4 [Gallus gallus]	
	cation_transport	TC107375	173 PF06369.5; Anemone_cytotox [Tetraodon nigroviridis]
		TC118417	BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 [Rattus norvegicus]
		TC122339	Ammonium transporter Rh type B [Takifugu rubripes]
	cell_component_biogenesis	TC107375	173 PF06369.5; Anemone_cytotox [Tetraodon nigroviridis]
		TC128346	Tubulin delta chain [Xenopus tropicalis]
		TC100084	cell division cycle 42, like [Danio rerio]
		TC95724	PREDICTED: histone cluster 2, H3c2-like [Danio rerio]
		TC119891	ATPase inhibitor, mitochondrial [Pongo abelii]
		TC131159	Cold-inducible RNA-binding protein [Pongo abelii]
	cell_component_organization	TC105562	CD9 antigen [Danio rerio]
		TC107375	173 PF06369.5; Anemone_cytotox [Tetraodon nigroviridis]
		TC128346	Tubulin delta chain [Xenopus laevis]
TC100084		cell division cycle 42, like [Danio rerio]	
TC95724		PREDICTED: histone cluster 2, H3c2-like [Danio rerio]	
TC119891		ATPase inhibitor, mitochondrial [Pongo abelii]	
TC131159		Cold-inducible RNA-binding protein [Pongo abelii]	
TC105562		CD9 antigen [Danio rerio]	
TC108322		predicted protein [Nematostella vectensis]	
TC118674		Histone deacetylase 4 [Gallus gallus]	
mRNA_met_process	TC125893	Splicing factor, arginine/serine-rich 4 [Mus musculus]	
	TC108088	Splicing factor, arginine/serine-rich 4 [Mus musculus]	
	TC129464	hyperosmotic glycine rich protein [Salmo salar]	
	TC131159	Cold-inducible RNA-binding protein [Pongo abelii]	
	TC117131	Splicing factor 3B subunit 5 [Salmo salar]	
	TC100084	cell division cycle 42, like [Danio rerio]	
multicellular_organismal_dvlpt	TC129464	hyperosmotic glycine rich protein [Salmo salar]	
	TC94825	Deoxyribonuclease-2-alpha [Mus musculus]	
	TC105562	CD9 antigen [Danio rerio]	
	TC108322	predicted protein [Nematostella vectensis]	
	TC118674	Histone deacetylase 4 [Gallus gallus]	
RT14 sodium2 n=5 cell_catabolic_process	TC105943	Cysteine protease ATG4B [Salmo salar]	
	TC101197	Carbonyl reductase [NADPH] 1 [Rattus norvegicus]	
RT19 tous n=96 (1/2) cellular_component_biogenesis	TC107244	WD repeat domain 36 [Danio rerio]	
	TC103537	100 PF00957.14;Synaptobrevin [Salmo salar]	
	TC103503	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog [Mus musculus]	
	TC102880	tubulin, beta, 2 [Danio rerio]	
	cellular_component_organization	TC95734	Adenylyl cyclase-associated protein 1 [Salmo salar]
		TC112295	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 [Mus musculus]
	TC103537	100 PF00957.14;Synaptobrevin [Salmo salar]	
	TC102880	tubulin, beta, 2 [Danio rerio]	
	gene_expression	TC103949	Protein LBH [Gallus gallus]
		TC99951	complement component C8 gamma [Oncorhynchus mykiss]
TC118573		Glutamyl-tRNA synthetase [Bos taurus]	
TC107244		WD repeat domain 36 [Danio rerio]	
TC119647		DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC2 [Pongo abelii]	
TC94930		Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 [Gallus gallus]	
TC119371		phenylalanyl-tRNA synthetase 2 [Danio rerio]	
TC103503		U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog [Mus musculus]	
TC118445	jun B proto-oncogene, like [Danio rerio]		

Sont indiqués le groupe de liaison portant le QTL détecté, le nombre d'eQTL considéré dans l'analyse d'enrichissement en GO (n), ainsi que le nom de l'oligonucléotide Agilent concerné, sa description selon l'assemblage s.om.10 de Sigenac et le processus biologique enrichi associé.

Tableau 6 (suite) : Fonctions « enrichies » parmi les gènes possédant un eQTL colocalisé avec un QTL.

Groupe de liaison, QTL, effectif processus_biolgique	Nom d'oligo	Description
RT19 tous n=96 (2/2)		
RNA_metabolic_process	TC118573 TC107244 TC119647 TC119371 TC103503	Glutaminyl-tRNA synthetase [Bos taurus] WD repeat domain 36 [Danio rerio] DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC2 [Pongo abelii] phenylalanyl-tRNA synthetase 2 [Danio rerio] U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog [Mus musculus]
RT19 sodium2 n=21 mRNA_transport	TC130205	Nuclear cap-binding protein subunit 1 [Salmo salar]
RT21 chlore2 n=11 reg_biosynthetic_process	TC126319 TC97322	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2 [Rattus norvegicus] ras homolog gene family, member A [Gallus gallus]
reg_gene_expression	TC126319 TC97322	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2 [Rattus norvegicus] ras homolog gene family, member A [Gallus gallus]
response_to_stimulus	TC94786 TC97322	BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain [Bos taurus] ras homolog gene family, member A [Gallus gallus]
RT25 chlore1 n=43 transcription	TC112387 TC99944 TC96738 TC100621 TC127327	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1 [Salmo salar] Lysine-specific demethylase NO66 [Danio rerio] PREDICTED: zinc finger and SCAN domain containing 2-like [Danio rerio] Zinc finger protein 574 [Bos taurus] PHD finger protein 6 [Danio rerio]
RT26 chlore1 n=21 cellular_component_organization	TC121299	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial [Rattus norvegicus]
protein_folding	TC110933	FK506 binding protein 10 [Danio rerio]
RT29 sodium1 n=25 cell_communication	TC105320 TC107529	Tumor suppressor candidate 2 [Oncorhynchus mykiss] Serine/threonine-protein kinase Sgk3 [Mus musculus]
cellular_component_biogenesis	TC111217 TC101321 TC99903 TC104124	Histone H2A.V [Xenopus laevis] Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 [Mus musculus] Probable rRNA-processing protein EBP2 [Mus musculus]
cellular_component_organization	TC111217 TC112754 TC101321 TC99903	Histone H2A.V [Xenopus laevis] PREDICTED: glucocerebrosidase-like [Danio rerio] Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 [Mus musculus]
chromosome_segregation	TC104124	Probable rRNA-processing protein EBP2 [Mus musculus]
locomotion	TC103771 TC101321 TC99903	Serine/threonine-protein kinase RIO3 [Homo sapiens] Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 [Mus musculus]
phosphorylation	TC107529 TC103771	Serine/threonine-protein kinase Sgk3 [Mus musculus] Serine/threonine-protein kinase RIO3 [Homo sapiens]
protein_modification_process	TC101321 TC107529 TC103771	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Serine/threonine-protein kinase Sgk3 [Mus musculus] Serine/threonine-protein kinase RIO3 [Homo sapiens]
reg_cell_proliferation	TC101321 TC99903	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 [Mus musculus]
response_to_stimulus	TC106469 TC101321 TC99903 TC101034	hypothetical protein LOC100038779 [Danio rerio] Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 [Mus musculus] Protein DJ-1 [Danio rerio]
response_to_oxidative_stress	TC101321 TC101034	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa [Homo sapiens] Protein DJ-1 [Danio rerio]

Sont indiqués le groupe de liaison portant le QTL détecté, le nombre d'eQTL considéré dans l'analyse d'enrichissement en GO (n), ainsi que le nom de l'oligonucléotide Agilent concerné, sa description selon l'assemblage s.om.10 de Siganae et le processus biologique enrichi associé.

Ces résultats d'enrichissement à partir d'une analyse des termes d'ontologie liés aux eQTL permettent de suggérer des informations biologiques à propos des gènes associés aux QTL détectés pour les caractères plasmatiques. Ainsi, si nous considérons les grands processus biologiques partagés par les différents QTL (sodium et chlore plasmatiques en particulier), nous pouvons réunir les QTL des groupes de liaison RT21 et RT29 comme agissant potentiellement dans les processus liés à la réponse à un stimulus. De même, les QTL des groupes de liaison RT4, RT5, RT14, RT19 et RT26 partageraient la même influence sur les processus liés à l'organisation intracellulaire et la biogenèse de composants cellulaires. En

ce qui concerne les autres QTL, ils sembleraient être impliqués dans les processus liés au catabolisme pour le QTL du sodium² du groupe de liaison RT14, à l'oxydoréduction pour ce qui est du groupe de liaison RT10 ou à la transcription pour le groupe de liaison RT25. Le QTL du sodium¹ porté par le groupe de liaison RT14 semblerait, quant à lui, impliqué dans le développement morphologique et le transport d'ions. Cette dernière suggestion de fonction est intéressante car, si nous nous attendions à l'origine à avoir beaucoup de gènes impliqués comme osmoeffecteurs, donc dans le transport d'ions, au final seul ce QTL semble y être relié. Cependant, il est nécessaire de rester très prudent quant à l'interprétation des eQTL associés aux QTL des caractères Na⁺ et Cl⁻ plasmatiques quand celle-ci s'appuie sur des informations d'ontologies. Cette analyse présente en effet des limites. Tout d'abord, la notion d'enrichissement validée par un test statistique ne s'appuie souvent que sur un nombre très limité de gènes. Or, l'association d'un terme d'ontologie à un gène est la plupart du temps basée sur des données issues des mammifères et non des poissons, ce qui peut conduire à des erreurs. Ensuite, l'annotation des séquences d'EST de truite est encore approximative, voir fautive, faute de disposer de la séquence du génome. Pour ces raisons, ces analyses fondées sur des termes d'ontologies doivent rester des hypothèses à partir desquelles d'autres études fonctionnelles peuvent être développées.

4. Discussion

Concernant cette dernière partie traitant de l'identification de région eQTL, l'une des difficultés concernait le prétraitement des données, notamment de la correction des valeurs d'expression des gènes, et de la détermination du seuil statistique définissant un eQTL significatif. En effet, si l'établissement d'un modèle de correction pour un caractère quantitatif d'intérêt n'est déjà pas évident, il est encore plus difficile de le faire pour plusieurs milliers de caractères étudiés en même temps. De plus, s'il est possible de concevoir l'existence d'interactions entre un caractère morphologique et un facteur biologique, c'est bien plus compliqué de l'appréhender entre l'expression d'un gène et un tel facteur, notamment car nous ne connaissons pas tous les facteurs. Il faut alors accepter le fait qu'il n'existe pas de modèle parfait et que l'expérimentateur doit lui-même choisir ce qui semble le plus cohérent. Que ce soit au niveau technique ou biologique, un effort particulier a été mis en œuvre pour que les échantillons soient distribués de manière aléatoire entre chaque étape pour éviter toute confusion d'effets et ainsi pouvoir prendre en compte la variance due à chacun des facteurs. Comme vu dans la partie précédente, les contraintes logistique, biologique et

budgetaire ont imposé des facteurs différents, dont le nombre peut représenter un problème tant au niveau calculatoire que dans l'établissement des hypothèses statistiques formulées. Comme cela est souvent mentionné lors d'études transcriptomiques, un fort effet technique, principalement inclus dans les facteurs lots de marquage et lots d'hybridation, est observé sur la variabilité d'expression de gènes. Les paramètres morphologiques de l'animal ont, en revanche, peu d'incidence. L'impact du bassin de challenge osmotique sur la variabilité des données, comme dans le précédent chapitre, est fort. Pour ce qui est de la détermination d'un seuil statistique, vu les milliers de caractères, il est difficile de réaliser des simulations pour chacun des gènes sur chaque groupe de liaison. De plus, si un seuil devait être défini pour chaque gène, il serait alors beaucoup plus difficile, à un niveau méthodologique, de sélectionner les régions eQTL significatives. Enfin, il est important de noter le fait que de nombreux gènes ne sont pas annotés, impliquant qu'ils ne peuvent pas se retrouver dans certaines sélections d'eQTL basées sur des a priori fonctionnels. Il est important de ne pas négliger leur impact possible.

L'approche eQTL menée chez la truite arc-en-ciel en réponse à un challenge hyperosmotique permet de préciser les résultats précédemment obtenus en détection de QTL, ainsi qu'en recherche de gènes candidats fonctionnels en lien avec les capacités d'acclimatation à l'eau de mer. Cette approche nous permet de hiérarchiser l'importance des QTL primolocalisés et de proposer une interprétation physiologique des résultats génétiques. Ainsi, le nombre d'eQTL détectés confirme l'importance des groupes de liaison RT8, RT14, RT19, RT25 et RT29. Par ailleurs, les QTL détectés pour le sodium² et le chlore² sur le groupe de liaison RT19 présentent la particularité d'être localisés dans une zone de point chaud en eQTL. Ces résultats peuvent aussi être regardés à partir des informations apportées par les analyses des ontologies des gènes. Cependant, cette approche est à prendre avec précaution car les études d'enrichissement en termes d'ontologies ne s'appuient ici que sur des groupes à faibles effectifs, et les processus biologiques proposés sont très souvent inférés par homologie de séquence avec d'autres espèces, souvent mammaliennes.

Au regard des processus biologiques enrichis, nous pourrions proposer l'implication des QTL détectés pour le chlore² et le sodium¹ pour les groupes de liaison respectifs RT21 et RT29 dans les processus de réponse à un changement brutal d'environnement, comme cela peut être le cas lors du transfert direct des poissons vers le milieu hyperosmotique. Les processus de réorganisation cellulaire, ainsi que ceux liés au métabolisme et au catabolisme, interviendraient dans un second temps. Cela pourrait soutenir l'intervention des QTL détectés

sur les groupes de liaison RT4, RT5, RT10, RT14, RT19 et RT26 pour l'ensemble des caractères. Tous les processus liés à la réponse à un challenge osmotique s'accompagnent d'une forte activité transcriptionnelle, ajouté au fait qu'en milieu hyperosmotique, l'une des manières d'augmenter son osmolarité interne est d'augmenter sa composition en acides aminés, le QTL détecté pour le *chlore1* (RT25) pourrait agir tout au long de la réponse. Finalement, le QTL détecté sur le groupe de liaison RT14 pour le *sodium1* interviendrait également dans les transports ioniques, débutant quelques temps après le début du challenge et se poursuivant durant le séjour en environnement hyperosmotique.

Les différentes analyses présentées ci-dessus, ont permis de proposer un total de 69 gènes candidats influencés par des eQTL colocalisés avec des QTL de l'acclimatation à un environnement hyperosmotique (tableau 7). Parmi ces 69 gènes, 11 (en gras) sont des candidats fonctionnels précédemment décrits, dont 7 sont des candidats différentiels (cf. chapitre II, p.47), et représentent pour cela les meilleurs gènes candidats issus de ce travail de thèse. Ils restent à confirmer et à tester par la suite par des expériences démontrant leur implication dans les processus d'acclimatation à un milieu osmotique différent.

Une première analyse simple de ces 69 candidats de premier ordre (cf. tableau 7) permet déjà d'émettre des hypothèses, pour certains (mentionnés par un astérisque dans le tableau 7), sur leur possible intervention dans les phénomènes liés à l'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel.

Ainsi, il semble que la région QTL / eQTL localisée sur RT4 intervienne particulièrement sur l'expression des gènes *CNIH* (protein cornichon homolog), *Fermt3* (Fermitin family homolog 3 URP2) et *eif3ja* (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A). Si la protéine *CNIH* est décrite comme étant impliquée dans le transport médié par vésicule, peu d'information est disponible chez le poisson et notamment en ce qui concerne les processus d'osmorégulation. Le dernier gène d'intérêt code pour un facteur d'initiation de la traduction, étape représentant la plus importante cible du contrôle de la traduction (Gingras *et al.*, 1999). Ce contrôle a d'ailleurs été mis en avant dans les processus d'acclimatation à l'eau de mer dans l'analyse de transcriptomie différentielle (cf. chapitre II, p.51-52).

Tableau 7 : Description des gènes candidats influencés par des QTL colocalisés avec des QTL.

Méthode de détection (1)	Description (2)
eQTL colocalisant sur plusieurs QTL primolocalisés	*RT9 Salmo salar NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 (ubc12), mRNA PREDICTED: es1 protein-like [Danio rerio]
	*RT8 Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1 OS=Homo sapiens GN=SULT2B1 PE=1 SV=2
	*RT15-29 Serine/threonine-protein kinase Sgk3 OS=Mus musculus GN=Sgk3 PE=1 SV=1
	*RT8-RT29 Serine/threonine-protein kinase RIO3 OS=Homo sapiens GN=RIOK3 PE=1 SV=2
corrélation avec chlore2	*RT19 Vesicle-associated membrane protein 8 OS=Pongo abelii GN=VAMP8 PE=3 SV=1 (SALSA; Synaptobrevin)
	*RT19 Tubulin beta-1 chain OS=Gadus morhua PE=2 SV=1
	*RT19 Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 [Salmo salar] *RT19 PREDICTED: novel immune type receptor protein-like [Danio rerio] *RT19 NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 OS=Salmo salar GN=MT-ND5 PE=3 SV=1
eQTL en covariable	RT10 <i>BX861592.s.om.10</i> *RT19 transcription factor Jun-B
	RT19 UPF0690 protein C1orf52 homolog OS=Danio rerio GN=zgc:65873 PE=1 SV=1
lrr > 47 colocalisé QTL/eQTL	RT10 *RT19 Choline transporter-like protein 1 OS=Torpedo marmorata GN=slc44a1 PE=1 SV=1
	*RT4 Protein cornichon homolog OS=Pongo abelii GN=CNIH PE=2 SV=1
	*RT5 Thymosin beta-12 OS=Oncorhynchus mykiss PE=1 SV=2
	*RT5 Retinol dehydrogenase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Rdh3 PE=1 SV=1
	*RT9 UPF0729 protein C18orf32 homolog OS=Esox lucius PE=3 SV=1
	*RT10 Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Xenopus laevis GN=paip1 PE=1 SV=1
	Splicing factor, arginine/serine-rich 9 OS=Mus musculus GN=Sfrs9 PE=1 SV=1
	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase OS=Danio rerio GN=dhdh PE=2 SV=2
	*RT14-25 Solute carrier family 43 member 3 OS=Bos taurus GN=SLC43A3 PE=2 SV=1
	MACRO domain-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=MACROD1 PE=2 SV=1
	Uncharacterized protein C4orf32 OS=Homo sapiens GN=C4orf32 PE=1 SV=1
	hypothetical protein LOC796019 [Danio rerio]
	*RT14 Salmo salar PR domain zinc finger protein 9 (prdm9), mRNA
	*RT19 Glutaminyl-tRNA synthetase OS=Bos taurus GN=QARS PE=2 SV=1 <i>BX913723.s.om.10</i>
	*RT21 Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 OS=Canis familiaris GN=CD40 PE=2 SV=1
PHD finger protein 6 OS=Mus musculus GN=Phf6 PE=1 SV=1	
Nucleoside diphosphate kinase homolog 5 OS=Homo sapiens GN=NME5 PE=1 SV=1	
Uncharacterized protein U88 OS=Human herpesvirus 6A (strain Uganda-1102) GN=U88 PE=4 SV=1	
*RT8 Bola-like protein 1 OS=Pongo abelii GN=BOLA1 PE=2 SV=1	
*RT4 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A OS=Danio rerio GN=eif3ja PE=1 SV=1	
*RT29 von Willebrand factor A domain-containing protein 1 OS=Bos taurus PE=2 SV=1	
H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain OS=Mus musculus GN=H2-Ab1 PE=1 SV=1	
*RT31 Protein S100-A4 OS=Homo sapiens GN=S100A4 PE=1 SV=1	
colocalisation QTL/eQTL	*RT4-RT8 Fermitin family homolog 3 OS=Mus musculus GN=Fermt3 PE=1 SV=1
	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Gls PE=1 SV=2
	*RT8 Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRP2 PE=1 SV=3
	*RT9-RT19 ferritin H-3 [Oncorhynchus mykiss]
	*RT9 Phosphatidylcholine transfer protein [Oncorhynchus mykiss]
	polyprotein [Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus]
	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]
	*RT14 Cysteine protease ATG4B [Salmo salar]
	PREDICTED: similar to alpha-2-macroglobulin receptor [Danio rerio] Cystatin [Oncorhynchus mykiss]
	novel immune-type receptor 2 [Oncorhynchus mykiss] 60 kDa lysophospholipase [Homo sapiens]
	mitochondrial ribosomal protein L35 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
	173 PF06369.5; Anemone_cytotox [Tetraodon nigroviridis]
	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 [Homo sapiens]
	predicted protein [Nematostella vectensis]
	Ras association domain-containing protein 2 [Salmo salar]
Selenoprotein M [Danio rerio]	
XTP3-transactivated gene A protein homolog [Salmo salar]	
*RT19 Beta-4C adrenergic receptor [Meleagris gallopavo] oxidative stress induced growth inhibitor 1 [Danio rerio]	
*RT21 insulin-like growth factor binding protein 3 [Oncorhynchus mykiss]	
*RT19 Integrin beta-1 [Ovis aries]	
Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate [Salmo salar]	
Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4K4 PE=1 SV=2	
Ferritin, middle subunit OS=Salmo salar PE=2 SV=1	
Calmodulin OS=Xenopus laevis GN=calm1 PE=1 SV=2	
Serine/threonine-protein kinase Sgk3 OS=Mus musculus GN=Sgk3 PE=1 SV=1	
WD repeat-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=WDR3 PE=1 SV=1	
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 (plcb3), mRNA	
Salmo salar Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H (ube2h), mRNA	

(1) Principales approches de détection du gène candidat (2) Selon l'assemblage s.om.10 de Sigenae *Rôle possible dans l'acclimatation à l'eau de mer

La région QTL / eQTL portée par le groupe de liaison RT5, semblant affecter les valeurs d'ions plasmatiques après un challenge osmotique, joue un rôle dans l'expression des gènes Tyb12 (Thymosin beta-12) et RDH3 (Retinol dehydrogenase 3). Le premier est présenté sous Uniprot comme étant impliqué dans l'organisation du cytosquelette. Il soutiendrait donc la fonction supposée par l'enrichissement en terme d'ontologie de ce QTL, à savoir l'organisation intracellulaire. La RDH3, quant à elle, serait impliquée dans le métabolisme de l'acide rétinol en permettant la transformation du rétinol en rétinaldéhyde puis en acide rétinolique. Il peut être alors intéressant de rapprocher cette information des données sur le gène CYP1A qui a été montré comme impliqué dans la synthèse d'acide rétinolique chez les vertébrés supérieurs (Tomita *et al.*, 1996). RDH3 pourrait alors, comme CYP1A (Leguen *et al.*, 2009), être proposé comme impliqué dans la différenciation des cellules branchiales.

Sur le groupe de liaison RT8, le QTL du chlore2 affecterait l'expression des gènes SULT2B1 (Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1), RIOK3 (Sérine / Thréonine-protein kinase RIO3), Fermt3 (Fermitin family homolog 3 URP2), LRP2 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 2) et BOLA1 (BOLA-like protein 1). La sulfotransferase 2B1, appartient à une famille de molécules impliquées dans la détoxification de xénobiotiques et de la biotransformation de composés endogènes comme les stéroïdes et l'iodothyronine (Falany *et al.*, 1998). Comme mentionné dans le second chapitre de ce manuscrit (p.48-49), l'implication de l'activité sulfotransférase a été suggérée sur le métabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes de la dorade royale *sparus aurata* exposée à de faibles salinités (Klaren *et al.*, 2007). Cependant, les auteurs mentionnent une différence d'activité de sulfotransférases dans le foie et les reins mais pas dans la branchie. Il est donc difficile de conclure sur le rôle de la sulfotransférase dans les branchies lors d'un changement de salinité, d'autant plus que le rôle des hormones thyroïdiennes dans les processus liés à l'osmorégulation chez les salmonidés sont contradictoires (Evans, 2002 ; McCormick, 1995). Quant à BOLA1, son implication possible dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire chez la souris (Kasai *et al.*, 2004) en fait un candidat potentiel pouvant intervenir lors du remodelage de l'épithélium branchial pendant l'acclimatation de la truite à son nouveau milieu osmotique.

Le groupe de liaison RT9 présente un QTL agissant sur les valeurs plasmatiques observées lors du second challenge. Il semble contrôler le niveau d'expression des gènes Ubc12 (Nedd8-conjugating enzyme Ubc12), CR032 (UPF0729 protein c18orf32 homolog) et

PPCT (Phosphatidyl choline transfer protein). Comme mentionné dans la partie transcriptomique différentielle (chapitre II, p.52), Ubc12 serait impliqué dans les phénomènes de turnover protéiques (Chew *et al.*, 2007 ; Pan *et al.*, 2004). Enfin, PPCT joue un rôle dans la constitution de la membrane en y catalysant les transferts de phosphatidylcholine : Il pourrait être intéressant de voir si ce gène est impliqué lors du renouvellement des cellules de l'épithélium branchial pendant l'acclimatation d'un téléostéen à un milieu osmotique différent.

Le groupe de liaison RT10 présente un eQTL régulant l'expression d'un seul des 69 gènes ici étudiés, Paip1 (Poly adenylate-binding protein-interacting protein 1). Il est décrit comme régulant le cycle cellulaire ainsi que les processus de réparation cellulaire (Scotto *et al.*, 2008). Il pourrait lui aussi intervenir lors du remodelage de l'épithélium branchial pendant la phase d'acclimatation de la truite à un milieu osmotique différent. Un autre gène, codant pour la choline transporter-like protein 1, semble présenter une expression dépendante du QTL de ce groupe de liaison.

Le groupe de liaison RT14 présente deux QTL. Le QTL influençant les niveaux de sodium1, semble réguler l'expression du gène SLC43A3 (Solute carrier family 43 member 3). Il serait impliqué dans les transports membranaires, notamment de nutriment ou de métabolites dans des tissus en développement et / ou en croissance chez l'homme (Stuart *et al.*, 2001), comme cela peut être le cas du tissu branchial lors du remodelage de son épithélium pendant la phase d'acclimatation à l'eau de mer chez la truite.

Les QTL colocalisés sur le groupe de liaison RT19 sont ici montrés comme régulant l'expression de onze gènes. Ces gènes sont VAMP-8 (Vesicle-associated membrane protein 8, synaptobrevin), JUNB (Transcription factor Jun-B), TBB1 (Tubulin beta-1 chain), CTL1 (Choline-transporter like 1), ITGB1 (Integrin Beta-1), ADB4C (Beta-4C adrenergic receptor), FTH3 (Ferritin H-3), PTPN6 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor 6), NITR (novel immune type receptor protein-like), MT-DN5 (NADH ubiquinone-oxydoreductase chain 5), et QARS (GlutaminyI-tRNA synthase). VAMP-8 régulerait l'exocytose chez l'homme (Tiwari *et al.*, 2008). De plus, les VAMP, ou synaptobrevines, semblent jouer un rôle auprès de l'aquaporine 2, activée par l'AMPc, dans les échanges d'eau à travers la membrane (Gouraud *et al.*, 2002 ; Knepper et Inoue, 1997). Ainsi, la vasopressine augmenterait la perméabilité à l'eau des cellules en provoquant la fusion des vésicules portant les aquaporines 2 dans la membrane plasmique via l'intervention de synaptobrevin 2 (Knepper et Inoue, 1997). Il est intéressant de constater que les travaux de Textor *et al.* (2007) mentionnent une relation

possible entre VAMP-8 et un autre gène mis ici en avant, le facteur de transcription JUNB. Ce facteur de transcription, détecté lors de la phase de récupération suite à un stress de confinement de 3h, est suggéré comme un indicateur de stress possible chez la truite arc-en-ciel (Momoda *et al.*, 2007). Ishida *et al.* (2010) présentent enfin la surexpression du gène JUNB après une dégradation des tissus chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Les auteurs mentionnent alors que le contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de JUNB représenterait une étape essentielle dans la régénération des tissus chez la larve comme chez l'adulte. La TBB1 a été caractérisée chez la morue *Gadus morhua*, et est impliquée dans le mouvement des microtubules (Modig *et al.*, 1999). CTL1 est un transporteur important puisqu'il aurait un rôle essentiel dans la fourniture de Choline, un métabolite permettant la production de membrane plasmique, à certains types cellulaires chez la raie torpille *Torpedo marmorata* (O'Regan *et al.*, 2000). Les fonctions de ces 4 gènes semblent supporter l'enrichissement en terme ontologique observé pour ce QTL, proposant une fonction dans la biogenèse de composants cellulaires et l'organisation intracellulaire. Ils pourraient avoir un rôle lors de la modification morphologique de l'épithélium branchial après un challenge osmotique.

Concernant ITGB, elle serait liée à SMIT1 et sgk1, donc potentiellement impliquée dans les cascades de signalisation cellulaire du stress osmotique (voir sgk3 pour RT29) en réponse à un choc hypertonique.

ADB4C est une molécule de la famille des récepteurs adrénérgique Beta, utilisée par la noradrénaline pour réguler, chez l'homme, l'activité et l'abondance en protéine de la pompe Na^+ / K^+ ATPase dans les cellules alvéolaires du poumon (Azzam *et al.*, 2004). Nous pouvons alors nous demander si le même type de mécanisme est observable chez les téléostéens.

Cette région QTL pourrait aussi être impliquée dans la régulation de l'expression de FTH3 (Ferritin H-3). L'expression de ce gène serait modulée lors de l'exposition de cellules hépatiques de rat à des conditions oxydatives (Cairo *et al.*, 1995). Les phénomènes de transcription et d'accumulation des isoformes H de ferritin sont induits dans des cellules de truite RTG2 lors de l'application d'un choc thermique (Yamashita *et al.*, 1996). Il est également intéressant de mentionner l'intervention de cette molécule dans les mêmes processus que la cytochrome P4501A et la sulfotransférase 1 entre des populations sauvages de morue *Gadus morhua* évoluant dans des conditions différentes de pollution (Lie *et al.*, 2009). Suite à un stress hyperosmotique, l'implication possible de FTH3 de concert avec CYP1A et les SULT2 et SULT3 serait une hypothèse envisageable. L'expression du gène C1orf52 semble également être sous la dépendance de ce QTL.

Le QTL du chlore2 du groupe de liaison RT21 semble réguler l'expression de CD40 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5), IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) et OKL38 (oxidative stress-induced growth inhibitor 1 OSGIN1). Si peu d'information est disponible pour CD40, OKL38 serait impliqué dans les phénomènes de prolifération cellulaire à travers la régulation de l'apoptose (Huynh *et al.*, 2001 ; Ong *et al.*, 2004). Il pourrait intervenir chez la truite lors du remodelage de l'épithélium branchial après un transfert en eau de mer. Enfin, le rôle d'IGFBP3 dans les processus liés à l'osmorégulation chez la truite arc-en-ciel a déjà été mentionné par Sheperd *et al.* (2005). Le niveau plasmatique en protéines IGFBP3 serait ainsi modulé par une modification graduelle de la salinité chez la truite arc-en-ciel. IGFBP3 pourrait ainsi intervenir au niveau de la transduction du signal osmotique en interagissant avec IGF1 pour réguler la différenciation des cellules riches en mitochondries de type eau de mer à partir de cellules souches (McCormick, 2001 ; Sakamoto *et al.*, 2001).

Le groupe de liaison RT25, à travers sa région QTL du chlore1, régule le niveau d'expression d'un gène présentant un eQTL pour le gène SLC43A3 (Solute carrier family 43 member 3). Il serait impliqué dans les transports membranaires.

En ce qui concerne RT29 et plus précisément de sa région QTL pour sodium1, elle semble réguler l'expression des gènes RIOK3 (Sérine / Thréonine-protein kinase RIO3), Sgk3 (Serine / Threonine-protein kinase Sgk3) et VWA1 (von Willebrand factor A domain-containing protein 1). Plusieurs aspects rendent sgk3 particulièrement intéressant. Tout d'abord, la régulation de sa transcription serait sous l'influence d'une voie de signalisation mentionnée dans le premier chapitre de ce travail (p.23) comme particulièrement importante dans les phénomènes de transmission du signal lié au processus d'osmorégulation : la voie du calcium ou voie de l'inositol triphosphate (IP3) (Park *et al.*, 1999). Cette kinase est souvent associée chez les mammifères à la régulation des transporteurs d'ions (canaux ioniques, Na⁺-K⁺-ATPase, NHE3...), à la régulation d'enzymes (ex. Glycogen-synthase) et de facteurs de transcription. Les sgk participent à la régulation du transport, de la libération des hormones, à la prolifération cellulaire et à l'apoptose (Lang *et al.*, 2006). Les travaux de Klaus *et al.* (2008) sur le Xénope *Xenopus laevis* mentionnent l'activation possible de l'activité de SMIT1 (transporteur Na⁺-myoinositol) par sgk1, sgk2, sgk3 mais aussi la protéine kinase B (PKB) par l'intermédiaire de deux facteurs de transcription : TonEBP (Tonicity Response Element Binding Protein) et TonE (Tonicity Response Element). Enfin, chez *Fundulus* exposé à la salinité, Shaw *et al.* (2008) ont montré que la sgk pourrait être impliquée dans la translocation

du canal CFTR vers la membrane cellulaire au niveau des branchies. Ces travaux semblent confirmer le rôle central de *sgk1*, *sgk2* et *sgk3* dans les réponses rapides à un stress osmotique. Aucune information n'existe concernant le rôle du facteur VWA1 chez le téléostéen. Nous pouvons juste mentionner qu'il est impliqué dans la traduction notamment après un choc septique chez l'homme (Van der Heijden *et al.*, 2009).

Enfin, un dernier gène dont le niveau d'expression est régulé par une région eQTL à fort *l_{rt}* colocalisant avec le QTL du *sodium1* du groupe de liaison RT31, consiste en S100A4 (protéine S100-A4). Les travaux d'Ito *et al.* (2008) mentionnent la co-surexpression de ce gène, de HSP70, un candidat abordé lors de l'analyse transcriptomique différentielle (cf. chapitre II), et d'ATA2 (Amino acid transporter 2) après un stress osmotique chez la souris. La régulation de ces 3 gènes pourrait également exister chez la truite exposée à un milieu hyperosmotique.

La figure 23 synthétise les résultats obtenus dans ces deux chapitres QTL / eQTL.

Chapitre IV - Détection d'eQTL de l'acclimation à l'eau de mer

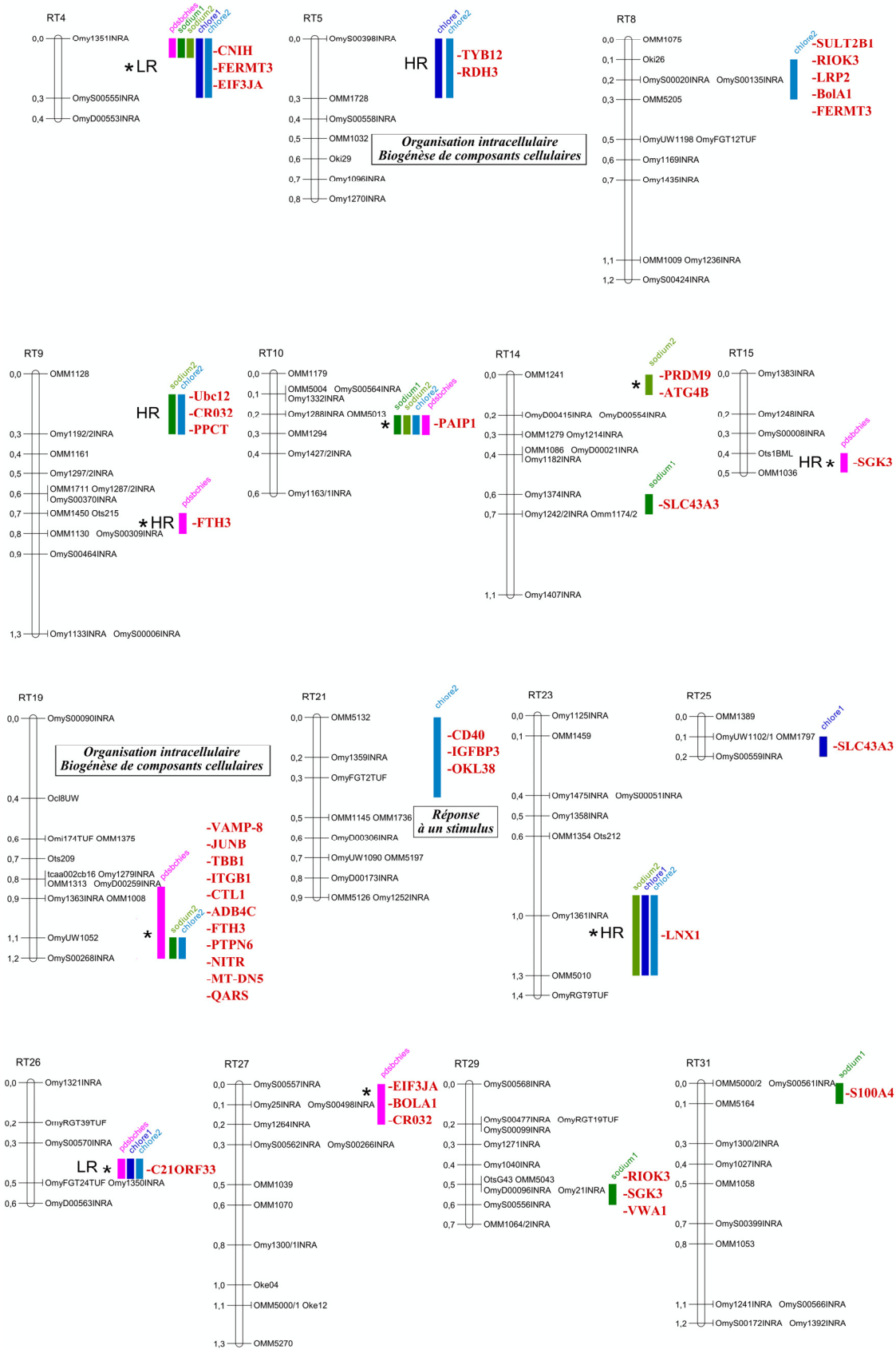


Figure 23 : Synthèse des résultats obtenus lors de l'étude croisée QTL / eQTL de l'acclimation de la truite arc-en-ciel à l'eau de mer. Les bâtons indiquent des QTL primolocalisés, les astérisques mentionnent les QTL les plus robustes, la lignée de provenance des allèles fort est indiquée lorsque clairement identifiée Les principaux gènes candidats issus de l'analyse eQTL sont indiqués en rouge. Le texte en italique et encadré présente la fonction biologique probable jouée des régions QTL / eQTL.

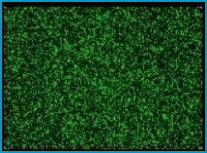
**Discussion générale et
perspectives**

Schéma bilan

meilleure compréhension de la réponse de la truite arc-en-ciel à un challenge hyperosmotique

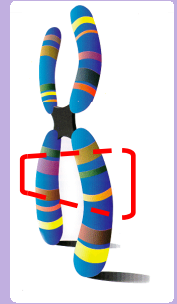
importance du rôle de la composante génétique dans la variation des capacités osmorégulatrices

1
transcriptomique
branchiale



gènes candidats
fonctionnels

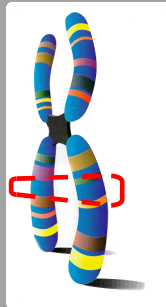
2



QTL

loci candidats

3



eQTL



gènes candidats fonctionnels et positionnels
clés impliqués dans la variabilité de capacité
d'acclimatation à l'eau de mer

Discussion générale et perspectives

De nombreux travaux ont exploré la présence de gènes candidats de processus biologiques différents chez la truite arc-en-ciel. Ainsi, au niveau positionnel, nous pouvons trouver des loci impliqués dans la résistance à la maladie (Khoo *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2003 ; Ozaki *et al.*, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2004 ; Zimmerman *et al.*, 2004), la tolérance à la température (Perry *et al.*, 2005), la croissance (Wringe *et al.*, 2010) ou encore la maturation (Haidle *et al.*, 2008). Les approches transcriptionnelles ont permis d'identifier des gènes candidats impliqués dans les voies métaboliques régissant les processus liés à la maturation et au développement (Darias *et al.*, 2008 ; Gohin *et al.*, 2010 ; Palstra *et al.*, 2010), au stress de confinement et de prélèvement (Cairns *et al.*, 2008 ; Momoda *et al.*, 2007), à l'alimentation (Kolditz *et al.*, 2010 ; Lake *et al.*, 2010), à la réponse aux contaminations chimiques et polluantes (Finne *et al.*, 2007 ; Hook *et al.*, 2008, 2010a, 2010b ; Walker *et al.*, 2008), à la résistance à la maladie et aux infections (MacKenzie *et al.*, 2008), à la tolérance à la température (Lewis *et al.*, 2010) ainsi qu'à la domestication (Tymchuk *et al.*, 2009). Jamais les performances osmorégulatrices n'ont été étudiées d'un point de vue génétique et génomique chez la truite et, à notre connaissance, le couplage des deux approches est réalisé ici pour la première fois chez une espèce de téléostéen d'intérêt aquacole.

L'objectif de ma thèse consistait en l'exploration des composantes génétiques et génomiques impliquées dans les capacités d'acclimatation d'un téléostéen euryhalin, la truite arc-en-ciel, à un milieu osmotique différent. Pour l'atteindre, différentes approches utilisant des technologies de pointes et des dispositifs expérimentaux aquacoles ont été utilisées.

Dans un premier temps, une approche de transcriptomique différentielle a permis d'identifier des gènes candidats fonctionnels impliqués dans les processus d'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel. Cette première étude a également permis de renseigner sur la cinétique de réponse à un challenge osmotique et de suggérer des grandes fonctions biologiques / voies de régulation métabolique mises en jeu.

Une deuxième partie de ce travail consistait en la détection de loci influençant les capacités osmorégulatrices chez la truite arc-en-ciel à partir d'un dispositif de plus de 1000 individus F2, répartis en 5 familles issues du croisement entre des grands parents de lignées divergentes pour leurs réponses au stress.

Enfin, une approche de type QTL d'expression a permis de préciser les résultats QTL précédemment obtenus en renseignant sur la qualité de ces derniers et en proposant des gènes

candidats fonctionnels potentiellement positionnels que l'analyse QTL seule n'aurait pas pu mettre en avant sur cette espèce au génome non séquencé.

L'intérêt de l'approche croisée QTL / eQTL et transcriptomique différentielle a ici été montré. En effet, l'approche transcriptomique différentielle génère beaucoup de résultats mais du fait de la multiplicité des tests statistiques mis en œuvre, il est difficile de pleinement maîtriser le taux d'erreur de type 1 (faux positifs) et 2 (faux négatifs). Ainsi, parmi les candidats identifiés, un certain nombre sont en fait des faux positifs. Si l'utilisation des corrections des tests multiples par FDR permet de réduire ce nombre, il n'élimine pas ce problème. Par ailleurs, l'approche de transcriptomique différentielle ne permet la détection de gènes différentiellement exprimés que si le différentiel est relativement important et / ou l'homogénéité des données intra groupe forte. Des gènes ne présentant qu'un faible différentiel d'expression ne seront alors pas identifiés, même s'ils sont réellement impliqués dans le processus biologique étudié. Ce critère est d'autant plus important à garder en mémoire que les analyses transcriptomiques se sont déroulées sur le principal organe osmorégulateur, composé de différents types cellulaires : la branchie. Dans la mesure où le tissu prélevé consiste en un mélange de types cellulaires va provoquer la sous représentation des gènes exprimés dans des populations de cellules peu présentes. C'est notamment le cas des ionocytes branchiaux, représentant de 5 à 10% de l'épithélium, et constituant des cibles privilégiées des processus mis en évidence dans notre étude.

La détection de QTL en lien avec les processus biologiques liés à la réponse à un challenge hyperosmotique, constituait un complément d'information essentiel afin d'appréhender les composantes génétiques de l'acclimatation à l'eau de mer chez le poisson. Cette recherche de QTL des capacités osmorégulatrices présente la double originalité d'être appliquée pour la première fois chez un téléostéen d'intérêt commercial et d'étudier la répétition d'un challenge osmotique, mode opératoire qui, à notre connaissance, n'a jamais été testé auparavant. Les résultats peu concordants des analyses univariées, entre les deux séries de challenges d'une part et les deux ions plasmatiques utilisés comme caractères d'autre part, ont fortement compliqué l'interprétation. L'utilisation d'un caractère supplémentaire, le poids branchial, et d'analyses multivariées de détection de QTL ont alors permis de mieux dissocier les QTL suggestifs et robustes. Pour autant, les résultats obtenus ne permettaient pas, en raison de la faible couverture en marqueur et de la méconnaissance de la séquence du génome de notre modèle, de proposer des gènes candidats positionnels, ni de renseigner sur l'implication fonctionnelle des différents QTL détectés.

Finalement, la détection d'eQTL menée dans la dernière partie de ce projet avait pour but de compléter et préciser les résultats QTL précédemment obtenus. Cette partie a permis de suggérer des gènes candidats fonctionnels en complément de l'analyse génomique, mais aussi des candidats positionnels, chez une espèce dont le génome n'est pas séquencé. L'utilisation de différentes méthodes d'analyses nous a permis effectivement d'émettre des hypothèses concernant les fonctions pour les différents QTL primolocalisés, mais également de pousser les investigations jusqu'à la proposition de gènes causaux pour deux d'entre eux.

1. Synthèse des résultats

Les résultats obtenus durant ce travail de thèse permettent tout d'abord de mieux comprendre la réponse de notre modèle à un challenge osmotique. Nous avons ainsi montré qu'elle suivait une cinétique particulière chez la souche de truite arc-en-ciel utilisée dans le chapitre II. Les truites utilisées présentaient une activité transcriptomique branchiale maximale 24h PT ainsi que de bonnes capacités d'euryhalinité caractérisées par un faible stress osmotique apparent et une régulation relativement rapide de la balance hydrominérale. Cette information relayée à la fois par les données transcriptomiques, mais également par les niveaux de chlore et cortisol plasmatiques, est très importante puisque ce pic d'activité semble correspondre à la phase d'acclimatation du poisson. Celle-ci s'accompagne de réels bouleversements physiologiques, dont le plus significatif est sans doute le passage d'un épithélium branchial absorbant d'ions à celui d'un épithélium excréteur d'ions. Lorsque les poissons semblent acclimatés à leur nouveau milieu, quelques jours après le transfert, il est intéressant de noter que les fonctions biologiques différenciellement suggérées concernent le transport intracellulaire ainsi que le turnover cellulaire, le transport ionique et le transport d'oxygène supposant, entre les individus des deux milieux osmotiques, un taux métabolique mais également un transport transépithélial d'ions différents. Cette approche a également permis de suggérer l'importance de quelques fonctions biologiques semblant être mises en jeu lors d'un transfert de truite vers un milieu hypersalin.

Ces fonctions semblent particulièrement intervenir au temps 24h post transfert. Ainsi, le poisson contrôlerait sa consommation en oxygène ainsi que les mécanismes cellulaires de biosynthèse et dégradation protéiques. En effet, comme nous avons pu le voir dans les premières parties de ce manuscrit, les processus osmorégulateurs interviennent à travers l'action de nombreux acteurs protéiques comme les enzymes et les transporteurs. Leur régulation semble alors se dérouler par l'intermédiaire de l'action de protéines chaperonnes

comme les HSP, de protéines de modifications post traductionnelles comme les facteurs de polymérisation / ribosylation d'ADP, d'élongation et d'initiation de traduction ainsi que de protéines liées aux processus d'ubiquitination.

Une seconde fonction biologique importante mise en lumière par ces travaux semble concerner les processus liés au développement cellulaire et tissulaire, intervenant via différents acteurs impliqués dans les phénomènes d'apoptose, de prolifération et de différenciation cellulaire. Ces acteurs comprennent des facteurs de transcription comme sox-11, des régulateurs du cycle cellulaire comme ORC2, WDHD1 et GINS1 ou encore des médiateurs d'apoptose comme AMID2, KAT5, et TRIAP1, et pourraient intervenir lors du remodelage de l'épithélium branchial de la truite arc-en-ciel suite à un choc osmotique.

Bien sûr, il est impossible de passer à côté du groupe fonctionnel traitant des transporteurs ioniques, osmoeffecteurs très largement étudiés dans la littérature. Nous mettons ici en évidence le rôle non surprenant des sous-unités $\alpha 1a$ et $\alpha 1b$ de la Na^+ / K^+ ATPase, mais également la présence plus sujette à discussion des gènes codant pour la protéine du canal chlore 2, l'échangeur proton / chlore 5, le cofacteur NHE-RF3 et le cotransporteur $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ 1 dont la caractérisation chez la truite, ainsi que la fonction dans les processus d'osmorégulation, sont incertaines.

Une dernière grande fonction mentionnée consiste en la signalisation endocrine et autocrine liée à la perturbation osmorégulatoire. Il semble important d'éclaircir les rôles des sgk, de l'angiotensine, de la prostaglandine ainsi que de la synthèse locale de GH dans les processus liés à l'acclimatation à l'eau de mer chez la truite.

La seconde étape de ce projet consistait alors à détecter les régions du génome susceptibles d'agir sur les capacités d'osmorégulation de la truite et, par suite sur les processus biologiques mentionnés précédemment. L'existence d'une composante génétique influant sur les capacités d'acclimatation à l'eau de mer chez la truite a été démontrée. La présence de QTL sur les groupes de liaison RT4, RT9, RT10, RT14, RT15, RT19, RT23, RT26 et RT27 semble robuste. Les groupes de liaison RT4, RT10, RT19 et RT26 arborent ainsi des QTL pour l'ensemble des caractères étudiés ici (i.e. niveaux de sodium et de chlore plasmatiques et poids branchial), lorsque des QTL spécifiques sont détectés sur les groupes de liaison RT9, RT15 et RT27 pour le poids branchial, RT14 pour les teneurs en sodium plasmatique et RT23 pour les concentrations en chlore et sodium plasmatiques. Cette primolocalisation de QTL ayant fournit de nombreux résultats difficiles à interpréter au vu des caractères impliqués et de la complexité du phénomène étudié, l'approche eQTL nous permet

d'aller plus loin et de proposer des gènes candidats positionnels. Ainsi, les analyses eQTL permettent de souligner l'intérêt tout particulier des QTL présents sur les groupes de liaison RT10, RT14, RT19 et RT26, au regard des enrichissements fonctionnels observés, de la significativité, de l'annotation des gènes régulés, du nombre d'eQTL présents ou de la présence de hotspots d'eQTL.

Enfin, l'utilisation combinée des approches transcriptomiques et QTL permet de suggérer de nombreux gènes candidats fonctionnels, mais aussi positionnels. Nous retiendrons l'apparente importance fonctionnelle de 3 gènes dont l'expression semble liée, la cytochrome P450 1A et les sulfotransférases 2 et 3 dont le rôle dans les processus liés à l'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel doit être éclaircie. L'implication de deux autres gènes, *toxin-1* et *CRISP-ENH1*, codant pour des toxines de type venin, doit également être clarifiée. De même, il semble intéressant de confirmer la fonction possible du cofacteur NHE-RF3 et du cotransporteur $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$, de la protéine du canal chlore 2 et de l'échangeur proton / chlore 5, dans les processus liés à une vie marine chez la truite. Les fonctions des gènes détectés par l'approche croisée QTL / eQTL dans les processus liés à l'osmorégulation sont également à déterminer. C'est pourquoi, pour le groupe de liaison RT19, il semble primordial de caractériser l'implication des gènes *Tubulin beta 1*, *tyrosine-protein phosphatase*, *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5* ainsi que les deux gènes causaux proposés ici, à savoir ceux codant pour la proto-oncogène *Jun B* et la protéine *c1orf52*. Concernant RT10, l'accent doit être mis sur la protéine de transport de choline et le gène identifié comme causal et ne présentant pas d'annotation. Les gènes codant pour l'enzyme de conjugaison de NEDD8 *Ubc12*, une protéine homologue à *ES1*, une protéine de la famille des sulfotransférases cytosoliques 2B, un homologue de *synaptobrevine*, un homologue 3 de la famille des *Fermitin*, et une cytochrome P450 2D9 semblent également constituer de bons candidats.

2. Perspectives

Cette étude propose un certain nombre de candidats fonctionnels et positionnels. Il serait intéressant de mettre en place un protocole expérimental permettant de tester les hypothèses de prédiction des capacités osmorégulatrices mentionnées dans ce travail. Il s'agirait par exemple de déterminer, parmi un pool de truites arc-en-ciel, et à l'aide de l'outil transcriptomique et / ou génomique positionnel (détermination de l'allèle aux différents QTL (pour les GL 10, 14 et 19 par exemple)), des reproducteurs de performance osmorégulatrice potentiellement forte d'un côté, et faible de l'autre pour pouvoir générer des lignées de truites

arc-en-ciel divergentes par leurs capacités potentielles à résister à un choc osmotique. Ensuite, en testant les différentes lignées, il serait possible d'éprouver les hypothèses soutenues par ce manuscrit. De telles lignées pourraient ainsi représenter un matériel biologique de premier choix pour étudier les différents aspects de l'osmorégulation dans le futur.

Les candidats fonctionnels et positionnels détectés ici pourraient alors être testés de différentes manières. Ainsi, les niveaux d'expression des gènes régulés par les 11 eQTL mentionnés précédemment pourraient être déterminés entre des poissons témoins et d'autres ayant subi un challenge osmotique. Il serait intéressant de suivre l'évolution de ces profils d'expression dans le temps. De même, si certaines zones QTL pouvaient être densifiées en marqueurs génétiques, il serait possible de sélectionner des individus possédant des génotypes supposés différents aux QTL et de comparer leurs capacités d'acclimatation à un environnement osmotique différent. Nous pourrions d'ailleurs tester les candidats fonctionnels et positionnels proposés ici dans différentes conditions osmotiques (i.e. environnement hyperosmotique et hypoosmotique), à différentes salinités, et également chez d'autres espèces de téléostéens euryhalins comme la truite fario *Salmo trutta*, la daurade royale *Sparus auratus* ou le bar *Dicentrarchus labrax*. Bien sûr, l'un des premiers à tester serait le saumon atlantique *Salmo salar*, très proche phylogénétiquement de la truite arc-en-ciel (Koop *et al.* (2008) mentionnent plus de 93% de similarité entre les EST de saumon Atlantique et de truite arc-en-ciel) et présentant un fort attrait commercial au niveau mondial. Les résultats mentionnés dans ce travail de thèse pourraient également servir dans l'étude de populations naturelles de téléostéens. En effet, les travaux de Giger *et al.* (2008) présentent l'utilisation de l'expression de 12 gènes clés pour différencier parmi des juvéniles de truites fario et de saumon atlantique, les futurs sédentaires des futurs migrateurs. De même, Whitehead (2009) mentionne l'existence d'haplotypes mitochondriaux spécifiques de l'adaptation à un milieu hypoosmotique chez le killifish. Ainsi, certains des gènes détectés ici pourraient également représenter des biomarqueurs de populations d'individus caractérisées par des capacités osmorégulatoires différentes.

Les gènes candidats proposés dans ce travail pourront servir de support dans la recherche de processus biologiques impliqués dans la prolifération, mais également dans la différenciation / transdifférenciation des ionocytes chez le poisson, par des approches de transgénèse et d'hybridation *in situ*. Pour mettre en évidence les acteurs des voies de transduction, il serait judicieux d'effectuer des tests d'activation / inhibition des différents acteurs connus ou supposés de la cascade de signalisation pour voir si cela a effectivement un

effet sur la régulation d'expression de certains des gènes candidats décrits ici (ex: pour la voie de signalisation PI3kinase et sgk).

Le fait d'avoir utilisé dans notre protocole de détection de QTL des familles de pleins frères issues du croisement de deux lignées de truites supposées divergentes pour leur capacité de réponse à un stress osmotique, permet de penser que nous disposons, dans ce dispositif, d'un certain nombre d'individus recombinant aux positions des QTL. La couverture en marqueurs étant actuellement trop faible pour étudier finement ces individus à l'aide des données transcriptomiques, il est aujourd'hui évident qu'une densification en marqueurs moléculaires est essentielle avant de poursuivre l'analyse de ces données. L'annonce du décryptage imminent de la séquence complète du génome de la truite arc-en-ciel devrait fournir les informations nécessaires à la détection de nouveaux marqueurs informatifs et aider à la précision des résultats présentés ici. Concernant les données eQTL, il serait judicieux dans les prochains mois de passer certains échantillons d'ARNm en RT-PCRq afin de valider les profils d'expression obtenus pour certains gènes régulés par des régions eQTL.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

Alberts R, Terpstra P, Bystrykh LV, de HG, Jansen RC: **A statistical multiprobe model for analyzing cis and trans genes in genetical genomics experiments with short-oligonucleotide arrays.** *Genetics* 2005, **171**: 1437-1439.

Allegrucci G, Caccone A, Cataudella S, Powell JR, Sbordoni V: **Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms.** *Marine Biology* 1995, **121**: 591-599.

Allendorf FW, Thorgaard GH: **Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes.** *Evolutionary Genetics of Fishes* 1984, 1-55.

Aluru N, Vijayan MM: **Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout.** *Physiol Genomics* 2007, **31**: 483-491.

Anholt RR, Dilda CL, Chang S, Fanara JJ, Kulkarni NH, Ganguly I *et al.*: **The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila*: epistasis and the transcriptome.** *Nat Genet* 2003, **35**: 180-184.

Azzam ZS, Adir Y, Crespo A, Comellas A, Lecuona E, Dada LA *et al.*: **Norepinephrine increases alveolar fluid reabsorption and Na,K-ATPase activity.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170**: 730-736.

Bagliniere JL: **La truite commune (*Salmo trutta* L.) : son origine, son aire de répartition, ses intérêts économique et scientifique.** *La truite : biologie et écologie*, BAGLINIERE J L *et* MAISSE G (Eds), INRA, Paris 1991, 11-22.

Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F *et al.*: **A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**: e52.

Bhasin JM, Chakrabarti E, Peng DQ, Kulkarni A, Chen X, Smith JD: **Sex specific gene regulation and expression QTLs in mouse macrophages from a strain intercross.** *PLoS One* 2008, **3**: e1435.

Bing N, Hoeschele I: **Genetical genomics analysis of a yeast segregant population for transcription network inference.** *Genetics* 2005, **170**: 533-542.

- Birt TP, Green JM, Davidson WS: **Contrasts in development and smolting of genetically distinct sympatric anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar***. *Can J Zool* 1991, **69**: 2075-2084.
- Birt TP, Green JM: **Acclimation to seawater of dwarf nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar***. *Can J Zool* 1993, **71**: 1912-1916.
- Boeuf G. **Bases physiologiques de la salmoniculture : osmorégulation et adaptation à l'eau de mer**. La pisciculture française 87, 28-39. 1987.
- Boeuf G, Payan P: **How should salinity influence fish growth?** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001, **130**: 411-423.
- Boothroyd CE, Wijnen H, Naef F, Saez L, Young MW: **Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila***. *PLoS Genet* 2007, **3**: e54.
- Borski RJ, Hyde GN, Fruchtman S: **Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release**. *Steroids* 2002, **67**: 539-548.
- Brem RB, Yvert G, Clinton R, Kruglyak L: **Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast**. *Science* 2002, **296**: 752-755.
- Bystriansky JS, Richards JG, Schulte PM, Ballantyne JS: **Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit isoforms alpha1a and alpha1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance**. *J Exp Biol* 2006, **209**: 1848-1858.
- Bystriansky JS, Frick NT, Richards JG, Schulte PM, Ballantyne JS: **Failure to up-regulate gill Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit isoform alpha1b may limit seawater tolerance of land-locked Arctic char (*Salvelinus alpinus*)**. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **148**: 332-338.
- Cairns MT, Johnson MC, Talbot AT, Pemmasani JK, McNeill RE, Houeix B *et al.*: **A cDNA microarray assessment of gene expression in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a handling and confinement stressor**. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2008, **3**: 51-66.

- Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A: **Induction of Ferritin Synthesis by Oxidative Stress.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**: 700-703.
- Cerda J, Finn RN: **Piscine aquaporins: an overview of recent advances.** *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2010.
- Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ *et al.*: **Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease.** *Nature* 2008, **452**: 429-435.
- Cheung KJ, Badarinarayana V, Selinger DW, Janse D, Church GM: **A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*.** *Genome Res* 2003, **13**: 206-215.
- Chew EH, Poobalasingam T, Hawkey CJ, Hagen T: **Characterization of cullin-based E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells--evidence for cullin dimerization.** *Cell Signal* 2007, **19**: 1071-1080.
- Choi CY, An KW: **Cloning and expression of Na⁺/K⁺-ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress.** *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2008, **149**: 91-100.
- Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**: 156-159.
- Chretien M, Pisam M: **Cell renewal and differentiation in the gill epithelium of fresh- or salt-water-adapted euryhaline fish as revealed by [3H]-thymidine radioautography [*Lebistes reticulatus*].** *Biol Cell* 1986, **56**: 137-150.
- Conte FP, Lin DHY: **Kinetics of cellular morphogenesis in gill epithelium during sea water adaptation of *Oncorhynchus* (Walbaum).** *Comp Biochem Physiol* 1967, **23**: 945-957.
- Conte FP, Morita TN: **Immunochemical study of cell differentiation in gill epithelium of euryhaline *Oncorhynchus* (Walbaum).** *Comp Biochem Physiol* 1968, **24**: 445-454.

- Cowan KJ, Storey KB: **Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress.** *J Exp Biol* 2003, **206**: 1107-1115.
- Crombie HJ, Bell MV, Tytler P: **Inhibition of sodium-plus-potassium-stimulated adenosine triphosphatase (Na⁺-K⁺-ATPase) by protein kinase C activators in the gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 1996, **113**: 765-772.
- Corey DP: **New TRP channels in hearing and mechanosensation.** *Neuron* 2003, **39**: 585-588.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA *et al.*: **TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells.** *Nature* 2004, **432**: 723-730.
- Cutler CP, Cramb G: **Two isoforms of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*).** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1566**: 92-103.
- Dahm R, Geisler R: **Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species.** *Mar Biotechnol (NY)* 2006, **8**: 329-345.
- Darias MJ, Zambonino-Infante JL, Hugot K, Cahu CL, Mazurais D: **Gene expression patterns during the larval development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarray analysis.** *Mar Biotechnol (NY)* 2008, **10**: 416-428.
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M: **Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map.** *Genetics* 1993, **134**: 943-951.
- De Gobbi GM, Anguita E, Hughes J, Sloane-Stanley JA, Sharpe JA, Koch CM *et al.*: **Tissue-specific histone modification and transcription factor binding in alpha globin gene expression.** *Blood* 2007, **110**: 4503-4510.
- Deane EE, Kelly SP, Luk JCY, Woo NYS: **Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream.** *Marine Biotechnology* 2002, **4**: 193-205.

- DeCook R, Lall S, Nettleton D, Howell SH: **Genetic regulation of gene expression during shoot development in Arabidopsis.** *Genetics* 2006, **172**: 1155-1164.
- Degnan KJ, Karnaky KJ, Jr., Zadunaisky JA: **Active chloride transport in the in vitro opercular skin of a teleost (*Fundulus heteroclitus*), a gill-like epithelium rich in chloride cells.** *J Physiol* 1977, **271**: 155-191.
- Dittmar KA, Goodenbour JM, Pan T: **Tissue-specific differences in human transfer RNA expression.** *PLoS Genet* 2006, **2**: e221.
- Dizier MH, Bonaiti-Pellie C, Clerget-Darpoux F: **Conclusions of segregation analysis for family data generated under two-locus models.** *Am J Hum Genet* 1993, **53**: 1338-1346.
- Doss S, Schadt EE, Drake TA, Lusis AJ: **Cis-acting expression quantitative trait loci in mice.** *Genome Res* 2005, **15**: 681-691.
- Drew RE, Schwabl H, Wheeler PA, Thorgaard GH: **Detection of QTL influencing cortisol levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture* 2007, **272**: S183-S194.
- Eckert R, Randall D, Burgren W, French K: **Animal physiology : Mechanisms and adaptations, Fourth edition.** *De Boeck* 1999.
- Elsen JM, Mangin B, Goffinet B, Boichard D, Le Roy P: **Alternative models for QTL detection in livestock. I. General introduction.** *Genetics Selection Evolution* 1999, **31**: 213-224.
- Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J *et al.*: **Genetics of gene expression and its effect on disease.** *Nature* 2008, **452**: 423-428.
- Evans DH: **Osmotic and ionic regulation.** *The physiology of fishes (Evans, D H , ed)* 1993, 315-341.
- Evans DH: **Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium.** *J Exp Zool* 2002, **293**: 336-347.
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP: **The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste.** *Physiol Rev* 2005, **85**: 97-177.

- Evans TG, Somero GN: **A microarray-based transcriptomic time-course of hyper- and hypo-osmotic stress signaling events in the euryhaline fish *Gillichthys mirabilis*: osmosensors to effectors.** *J Exp Biol* 2008, **211**: 3636-3649.
- Evans TG, Somero GN: **Protein-protein interactions enable rapid adaptive response to osmotic stress in fish gills.** *Commun Integr Biol* 2009, **2**: 94-96.
- Evans TG: **Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes.** *Journal of Fish Biology* 2010, **76**: 1903-1925.
- Falany JL, Azziz R, Falany CN: **Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium.** *Chem Biol Interact* 1998, **109**: 329-339.
- Falconer DS: **Introduction to Quantitative Genetics.** *1st Edn Oliver and Boyd, Edinburgh* 1960.
- Filangi O, Elsen JM: **QTLMap, a software for QTL detection in outbred populations.** In *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: 1-6 August 2010; Leipzig* 2010.
- Finnie C, Borch J, Collinge D: **14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions.** *Plant Molecular Biology* 1999, **40**: 545-554.
- Finne EF, Cooper GA, Koop BF, Hylland K, Tollefsen KE: **Toxicogenomic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to model chemicals and a synthetic mixture.** *Aquat Toxicol* 2007, **81**: 293-303.
- Fiol DF, Kültz D: **Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**: 927-932.
- Fiol DF, Kültz D: **Osmotic stress sensing and signaling in fishes.** *Febs Journal* 2007, **274**: 5790-5798.
- Fiol DF, Chan SY, Kültz D: **Identification and pathway analysis of immediate hyperosmotic stress responsive molecular mechanisms in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2006a, **1**: 344-356.

- Fiol DF, Chan SY, Kültz D: **Regulation of osmotic stress transcription factor 1 (Ostf1) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelium during salinity stress.** *J Exp Biol* 2006b, **209**: 3257-3265.
- Fisher RA: **The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance.** *Trans R Soc Edinb* 1918, **52**: 399-433.
- Fisher RA: **The Genetical Theory of Natural Selection.** *Oxford University Press, Oxford* 1930.
- Flowers TJ, Koyama ML, Flowers SA, Sudhakar C, Singh KP, Yeo AR: **QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity.** *J Exp Bot* 2000, **51**: 99-106.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC: **14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2000, **40**: 617-647.
- Fuentes J, Soengas JL, Buceta M, Otero J, Rey P, Rebolledo E: **Kidney ATPase response in seawater-transferred rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect of salinity and fish size.** *Rev Esp Fisiol* 1996, **52**: 231-238.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE *et al.*: **Identification of a Mutation in Porcine Ryanodine Receptor Associated with Malignant Hyperthermia.** *Science* 1991, **253**: 448-451.
- Furlong EE, Andersen EC, Null B, White KP, Scott MP: **Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development.** *Science* 2001, **293**: 1629-1633.
- Furuta K, Sato S, Yamauchi T, Kakumu S: **Changes in intrahepatic gene expression profiles from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection.** *Hepatol Res* 2008, **38**: 673-682.
- Georges M: **Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait Loci in domestic animals.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007, **8**: 131-162.
- Gibson G, Weir B: **The quantitative genetics of transcription.** *Trends Genet* 2005, **21**: 616-623.

- Giger T, Excoffier L, Amstutz U, Day PJ, Champigneulle A, Hansen MM *et al.*: **Population transcriptomics of life-history variation in the genus *Salmo***. *Mol Ecol* 2008, **17**: 3095-3108.
- Gilbert H, Le Roy P: **Comparison of three multitrait methods for QTL detection**. *Genetics Selection Evolution* 2003, **35**: 281-304.
- Gilbert H, Le Roy P: **Methods for the detection of multiple linked QTL applied to a mixture of full and half sib families**. *Genetics Selection Evolution* 2007, **39**: 139-158.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N: **eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation**. *Annual Review of Biochemistry* 1999, **68**: 913-963.
- Goffinet B, Beckmann J, Boichard D, Causse M, Charcosset A, Chevalet C *et al.*: **Méthodes mathématiques pour l'étude des gènes contrôlant des caractères quantitatifs**. *Genet Sel Evol* 1994, **26**: 9s-20s.
- Gohin M, Bobe J, Chesnel F: **Comparative transcriptomic analysis of follicle-enclosed oocyte maturational and developmental competence acquisition in two non-mammalian vertebrates**. *BMC Genomics* 2010, **11**: 18.
- Gouraud S, Laera A, Calamita G, Carmosino M, Procino G, Rossetto O *et al.*: **Functional involvement of VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells**. *J Cell Sci* 2002, **115**: 3667-3674.
- Grad I, Picard D: **The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones**. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007, **275**: 2-12.
- Greenwood AK, Butler PC, White RB, DeMarco U, Pearce D, Fernald RD: **Multiple Corticosteroid Receptors in a Teleost Fish: Distinct Sequences, Expression Patterns, and Transcriptional Activities**. *Endocrinology* 2003, **144**: 4226-4236.
- Grosell M, Gilmour KM, Perry SF: **Intestinal carbonic anhydrase, bicarbonate, and proton carriers play a role in the acclimation of rainbow trout to seawater**. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **293**: R2099-R2111.

- Grosso AR, Gomes AQ, Barbosa-Morais NL, Caldeira S, Thorne NP, Grech G *et al.*: **Tissue-specific splicing factor gene expression signatures.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**: 4823-4832.
- Guthke R, Moller U, Hoffmann M, Thies F, Topfer S: **Dynamic network reconstruction from gene expression data applied to immune response during bacterial infection.** *Bioinformatics* 2005, **21**: 1626-1634.
- Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, Krieg F *et al.*: **A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms.** *BMC Genomics* 2006, **7**: 30.
- Haidle L, Janssen JE, Gharbi K, Moghadam HK, Ferguson MM, Danzmann RG: **Determination of quantitative trait loci (QTL) for early maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Mar Biotechnol (NY)* 2008, **10**: 579-592.
- Haley CS, Knott SA: **A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers.** *Heredity* 1992, **69**: 315-324.
- Harache Y, Boeuf G: **les caractéristiques de l'élevage des salmonidés en milieu marin.** *Aquaculture* 1986, 609-626.
- Harache Y, Fauré A: **Osmotic regulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following transfer to sea water.** *Pisc Fr* 1986, **86**: 38-43.
- Hirasawa T, Ashitani K, Yoshikawa K, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y *et al.*: **Comparison of transcriptional responses to osmotic stresses induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray.** *J Biosci Bioeng* 2006, **102**: 568-571.
- Hiroi J, McCormick SD: **Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*.** *J Exp Biol* 2007, **210**: 1015-1024.
- Hoffmann EK, Hoffmann E, Lang F, Zadunaisky JA: **Control of Cl⁻ transport in the operculum epithelium of *Fundulus heteroclitus*: long- and short-term salinity adaptation.** *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2002, **1566**: 129-139.

- Hook SE, Skillman AD, Gopalan B, Small JA, Schultz IR: **Gene expression profiles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a simple chemical mixture.** *Toxicol Sci* 2008, **102**: 42-60.
- Hook SE, Lampi MA, Febbo EJ, Ward JA, Parkerton TF: **Hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to different hydrocarbon mixtures.** *Environ Toxicol Chem* 2010a, **29**: 2034-2043.
- Hook SE, Lampi MA, Febbo EJ, Ward JA, Parkerton TF: **Temporal patterns in the transcriptomic response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to crude oil.** *Aquat Toxicol* 2010b, **99**: 320-329.
- Hornig JL, Lin LY, Huang CJ, Katoh F, Kaneko T, Hwang PP: **Knockdown of V-ATPase subunit A (*atp6v1a*) impairs acid secretion and ion balance in zebrafish (*Danio rerio*).** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **292**: R2068-R2076.
- Huynh H, Ng CY, Ong CK, Lim KB, Chan TW: **Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland.** *Endocrinology* 2001, **142**: 3607-3615.
- Hwang PP, Lee TH: **New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **148**: 479-497.
- Hyde GN, Seale AP, Grau EG, Borski RJ: **Cortisol rapidly suppresses intracellular calcium and voltage-gated calcium channel activity in prolactin cells of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*).** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**: E626-E633.
- Ishida T, Nakajima T, Kudo A, Kawakami A: **Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish.** *Dev Biol* 2010, **340**: 468-479.
- Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, Takai M, Muraoka S, Matsuda T *et al.*: **Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy.** *J Mol Cell Cardiol* 2008, **44**: 927-937.
- Jansen RC, Nap JP: **Genetical genomics: the added value from segregation.** *Trends Genet* 2001, **17**: 388-391.

- Jiang C, Zeng ZB: **Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci.** *Genetics* 1995, **140**: 1111-1127.
- Jiang Jq, Young G, Kobayashi T, Nagahama Y: **Eel (*Anguilla japonica*) testis 11[beta]-hydroxylase gene is expressed in interrenal tissue and its product lacks aldosterone synthesizing activity.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998, **146**: 207-211.
- Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC: **Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, **48**: 3161-3177.
- Johnsson JI, Clarke WC, Blackburn J: **Hybridization with Domesticated Rainbow-Trout Reduces Seasonal-Variation in Seawater Adaptability of Steelhead Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*).** *Aquaculture* 1994, **121**: 73-77.
- Johnston CE, Cheverie JC: **Comparative analysis of ionoregulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of different sizes following rapid and slow salinity adaptation.** *Can J Fish Aquat Sci* 1985, **42**: 1994-2003.
- Kalujnaia S, McWilliam IS, Zaguinaiko VA, Feilen AL, Nicholson J, Hazon N *et al.*: **Salinity adaptation and gene profiling analysis in the European eel (*Anguilla anguilla*) using microarray technology.** *General and Comparative Endocrinology* 2007a, **152**: 274-280.
- Kalujnaia S, McWilliam IS, Zaguinaiko VA, Feilen AL, Nicholson J, Hazon N *et al.*: **Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*.** *Physiol Genomics* 2007b, **31**: 385-401.
- Karin M: **Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades as Regulators of Stress Responses.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998, **851**: 139-146.
- Kasai T, Inoue M, Koshiha S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E *et al.*: **Solution structure of a BOLA-like protein from *Mus musculus*.** *Protein Sci* 2004, **13**: 545-548.
- Khoo SK, Ozaki A, Nakamura F, Arakawa T, Ishimoto S, Nickolov R *et al.*: **Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Fish Pathology* 2004, **39**: 95-101.

- Kiani SP, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A *et al.*: **Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments.** *Plant Science* 2007, **172**: 773-787.
- Kiilerich P, Kristiansen K, Madsen SS: **Hormone receptors in gills of smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*: expression of growth hormone, prolactin, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.** *Gen Comp Endocrinol* 2007, **152**: 295-303.
- Kiilerich P, Pedersen SH, Kristiansen K, Madsen SS: **Corticosteroid regulation of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase alpha1-isoform expression in Atlantic salmon gill during smolt development.** *Gen Comp Endocrinol* soumis1.
- Kiilerich P, Milla S, Sturm A, Terrien X, Chevolleau S, Giton F *et al.*: **Implication of the mineralocorticoid axis in rainbow trout osmoregulation during salinity acclimation.** *J Endocrinol* soumis2.
- Kim MJ, Kwon JS, Suh SH, Suh JK, Jung J, Lee SN *et al.*: **Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na⁺,K⁺-ATPase.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008, **44**: 151-159.
- Klaren PHM, Guzman JM, Reutelingsperger SJ, Mancera JM, Flik G: **Low salinity acclimation and thyroid hormone metabolizing enzymes in gilthead seabream (*Sparus auratus*).** *General and Comparative Endocrinology* 2007, **152**: 215-222.
- Klaus F, Palmada M, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F *et al.*: **Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1.** *J Physiol* 2008, **586**: 1539-1547.
- Knapp SJ, Bridges WC, Birkes D: **Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1990, **79**: 583-592.
- Knepper MA, Inoue T: **Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**: 560-564.

- Kobayashi MS, Asai S, Ishikawa K, Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y: **Global profiling of influence of intra-ischemic brain temperature on gene expression in rat brain.** *Brain Res Rev* 2008, **58**: 171-191.
- Kolditz CI, Plagnes-Juan E, Quillet E, Lefevre F, Medale F: **Changes in white muscle transcriptome induced by dietary energy levels in two lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for muscle fat content.** *Br J Nutr* 2010, **103**: 629-642.
- Koop BF, von Schalburg KR, Leong J, Walker N, Lieph R, Cooper GA *et al.*: **A salmonid EST genomic study: genes, duplications, phylogeny and microarrays.** *BMC Genomics* 2008, **9**: 545.
- Korol AB, Ronin YI, Kirzhner VM: **Interval mapping of quantitative trait loci employing correlated trait complexes.** *Genetics* 1995, **140**: 1137-1147.
- Koskinen H, Krasnov A, Rexroad C, Gorodilov Y, Afanasyev S, Molsa H: **The 14-3-3 proteins in the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *J Exp Biol* 2004, **207**: 3361-3368.
- Krogh A: **The use of isotopes as indicators in biological research.** *Science* 1937, **85**: 187-191.
- Kültz D, Somero GN: **Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*.** *J Exp Biol* 1995, **198**: 1883-1894.
- Kültz D, Jürss K, Jonas L: **Cellular and epithelial adjustments to altered salinity in the gill and opercular epithelium of a cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*).** *Cell and Tissue Research* 1995, **279**: 65-73.
- Kültz D, Burg MB: **Intracellular signaling in response to osmotic stress.** *Cell Volume Regulation* 1998, **123**: 94-109.
- Kültz D, Chakravarty D, Adilakshmi T: **A novel 14-3-3 gene is osmoregulated in gill epithelium of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*.** *J Exp Biol* 2001, **204**: 2975-2985.

- Kültz D, Avila K: **Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001, **129**: 821-829.
- Kültz D: **Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response.** *Annual Review of Physiology* 2005, **67**: 225-257.
- Kusakabe M, Nakamura I, Young G: **11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal changes in gonads.** *Endocrinology* 2003, **144**: 2534-2545.
- Laiz-Carrion R, Sangiao-Alvarellos S, Guzman JM, Martin del Rio M, Miguez J, Soengas JL *et al.*: **Energy Metabolism in Fish Tissues Related to Osmoregulation and Cortisol Action.** *Fish Physiology and Biochemistry* 2002, **27**: 179-188.
- Lake J, Gravel C, Koko GK, Robert C, Vandenberg GW: **Combining suppressive subtractive hybridization and cDNA microarrays to identify dietary phosphorus-responsive genes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney.** *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2010, **5**: 24-35.
- Lamitina T, Huang CG, Strange K: **Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**: 12173-12178.
- Lander ES, Botstein D: **Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using Rflp Linkage Maps.** *Genetics* 1989, **121**: 185-199.
- Lander E, Kruglyak L: **Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results.** *Nat Genet* 1995, **11**: 241-247.
- Lang F, Cohen P: **Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms.** *Sci STKE* 2001, **2001**: re17.
- Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD, Loeschcke V: **Intraspecific variation in expression of candidate genes for osmoregulation, heme biosynthesis and stress resistance suggests local adaptation in European flounder (*Platichthys flesus*).** *Heredity* 2008, **101**: 247-259.
- Laurent P, Dunel S: **Morphology of gill epithelia in fish.** *Am J Physiol* 1980, **238**: 147-159.

- Le Roy P, Naveau J, Elsen J-M, Sellier P: **Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs.** *Genet Res* 1990, **55**: 33-40.
- Le Roy P, Elsen JM, Boichard D, Mangin B, Bidanel JP, Goffinet B. **An algorithm for QTL detection in mixture of full and half sib families.** Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia 26, 257-260. 1998.
- Le Mignon G., Desert C, Pitel F, Leroux S, Demeure O, Guerne G *et al.*: **Using transcriptome profiling to characterize QTL regions on chicken chromosome 5.** *BMC Genomics* 2009, **10**: 575.
- Leguen I, Odjo N, Le BY, Luthringer B, Baron D, Monod G *et al.*: **Effect of seawater transfer on CYP1A gene expression in rainbow trout gills.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2010, **156**: 211-217.
- Lewis JM, Hori TS, Rise ML, Walsh PJ, Currie S: **Transcriptome responses to heat stress in the nucleated red blood cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Physiol Genomics* 2010, **42**: 361-373.
- Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV *et al.*: **Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions.** *Hum Mol Genet* 2004, **13**: 609-616.
- Lie KK, Lanzen A, Breilid H, Olsvik PA: **Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray.** *Environ Toxicol Chem* 2009, **28**: 1711-1721.
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A *et al.*: **Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor.** *Cell* 2000, **103**: 525-535.
- Lilley JM, Ludlow MM, McCouch SR, O'Toole JC: **Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice.** *J Exp Bot* 1996, **47**: 1427-1436.
- Lima RN, Kültz D: **Laser scanning cytometry and tissue microarray analysis of salinity effects on killifish chloride cells.** *J Exp Biol* 2004, **207**: 1729-1739.

- Lin H, Pfeiffer D, Vogl A, Pan J, Randall D: **Immunolocalization of H⁺-ATPase in the gill epithelia of rainbow trout.** *J Exp Biol* 1994, **195**: 169-183.
- Liu HC, Cheng HH, Tirunagaru V, Sofer L, Burnside J: **A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping.** *Anim Genet* 2001, **32**: 351-359.
- Lopez-Bojorquez L, Villalobos P, Garcia G, Orozco A, Valverde R: **Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (FhDio2).** *J Exp Biol* 2007, **210**: 3126-3132.
- Loretz CA, Pollina C, Hyodo S, Takei Y: **Extracellular calcium-sensing receptor distribution in osmoregulatory and endocrine tissues of the tilapia.** *General and Comparative Endocrinology* 2009, **161**: 216-228.
- Lu C, Kasik J, Stephan DA, Yang S, Sperling MA, Menon RK: **Grtp1, a novel gene regulated by growth hormone.** *Endocrinology* 2001, **142**: 4568-4571.
- Lytle C, Xu JC, Biemesderfer D, Forbush B, III: **Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies.** *Am J Physiol Cell Physiol* 1995, **269**: C1496-C1505.
- MacCrimmon HR: **World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Journal of Fisheries and Research Board of Canada* 1971, **28**: 663-704.
- Mackay TFC: **The genetic architecture of quantitative traits.** *Annual Review of Genetics* 2001, **35**: 303-339.
- MacKenzie S, Balasch JC, Novoa B, Ribas L, Roher N, Krasnov A *et al.*: **Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation.** *BMC Genomics* 2008, **9**: 141.
- Mackie PM, Gharbi K, Ballantyne JS, McCormick SD, Wright PA: **Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR gill expression after seawater transfer in smolts (0+) of different Atlantic salmon (*Salmo salar*) families.** *Aquaculture* 2007, **272**: 625-635.

- Madsen SS, Jensen MK, Nhr J, Kristiansen K: **Expression of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1995, **269**: R1339-R1345.
- Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma YQ *et al.*: **A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans.** *Nat Med* 2009, **15**: 313-318.
- Mangin B, Goffinet B, Rebai A: **Constructing confidence intervals for QTL location.** *Genetics* 1994, **138**: 1301-1308.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP: **TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**: 179-185.
- Marshall WS, Lynch EM, Cozzi RR: **Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water.** *J Exp Biol* 2002, **205**: 1265-1273.
- Marshall WS, Ossum CG, Hoffmann EK: **Hypotonic shock mediation by p38 MAPK, JNK, PKC, FAK, OSR1 and SPAK in osmosensing chloride secreting cells of killifish opercular epithelium.** *J Exp Biol* 2005, **208**: 1063-1077.
- Marshall WS, Katoh F, Main HP, Sers N, Cozzi RRF: **Focal adhesion kinase and [beta]1 integrin regulation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in osmosensing ion transporting cells of killifish, *Fundulus heteroclitus*.** *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2008, **150**: 288-300.
- Marshall WS, Bryson SE, Midelfart A, Hamilton WF: **Low-conductance anion channel activated by cAMP in teleost Cl⁻-secreting cells.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1995, **268**: R963-R969.
- Martinez O, Curnow RN: **Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1992, **85**: 480-488.
- May SA, Degnan KJ: **cAMP-mediated regulation of chloride secretion by the opercular epithelium.** *Am J Physiol* 1984, **246**: R741-R746.

Mazurais D, Ducouret B, Tujague M, Valotaire Y, D'Cotta H, Gallais C *et al.*: **Regulation of the glucocorticoid receptor mRNA levels in the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification.** *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 1998, 499-510.

McCormick SD: **Hormonal Control of Gill Na⁺,K⁺-ATPase and Chloride Cell Function.** In *Fish Physiology*. Volume 14 edition. Edited by Chris MWaT. Academic Press; 1995:285-315.

McCormick SD: **Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish.** *Amer Zool* 2001, **41**: 781-794.

McCormick SD, Sundell K, Bjornsson BT, Brown CL, Hiroi J: **Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*).** *J Exp Biol* 2003, **206**: 4575-4583.

McCormick SD, Regish A, O'Dea MF, Shrimpton JM: **Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon.** *General and Comparative Endocrinology* 2008, **157**: 35-40.

McGuire A, Aluru N, Takemura A, Weil R, Wilson JM, Vijayan MM: **Hyperosmotic shock adaptation by cortisol involves upregulation of branchial osmotic stress transcription factor 1 gene expression in Mozambique Tilapia.** *General and Comparative Endocrinology* 2010, **165**: 321-329.

Miyazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, Takei Y: **Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**: 15782-15787.

Mizuno S, Ura K, Onodera SS, Fukada H, Misaka N, Hara A *et al.*: **Changes in transcript levels of gill cortisol receptor during smoltification in wild masu salmon, *Oncorhynchus masou*.** *Zoological Science* 2001, **18**: 211-268.

Modig C, Olsson PE, Barasoain I, de IC, Andreu JM, Roach MC *et al.*: **Identification of betaIII- and betaIV-tubulin isotypes in cold-adapted microtubules from Atlantic cod**

- (*Gadus morhua*): antibody mapping and cDNA sequencing.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1999, **42**: 315-330.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW: **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1999, **9**: 211-268.
- Momoda TS, Schwindt AR, Feist GW, Gerwick L, Bayne CJ, Schreck CB: **Gene expression in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during the stress response.** *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2007, **2**: 303-315.
- Monks SA, Leonardson A, Zhu H, Cundiff P, Pietrusiak P, Edwards S *et al.*: **Genetic inheritance of gene expression in human cell lines.** *Am J Hum Genet* 2004, **75**: 1094-1105.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J *et al.*: **PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.** *Nat Genet* 2003, **34**: 267-273.
- Morgan JD, Iwama GK: **Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 1991, **48**: 2083-2094.
- Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS *et al.*: **Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression.** *Nature* 2004, **430**: 743-747.
- Myers JJ, Kohler CC: **Acute Responses to Salinity for Sunshine Bass and Palmetto Bass.** *North American Journal of Aquaculture* 2000, **62**: 195-202.
- Nearing J, Betka M, Quinn S, Hentschel H, Elger M, Baum M *et al.*: **Polyvalent cation receptor proteins (CaRs) are salinity sensors in fish.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**: 9231-9236.
- Neimann-Sorensen A, Robertson A: **The association between blood groups and several production characters in three danish cattle breeds.** *Acta Agric Scand* 1961, **11**: 163-196.
- Nichols KM, Young WP, Danzmann RG, Robison BD, Rexroad C, Noakes M *et al.*: **A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Anim Genet* 2003, **34**: 102-115.

- Nichols KM, Edo AF, Wheeler PA, Thorgaard GH: **The Genetic Basis of Smoltification-Related Traits in *Oncorhynchus mykiss***. *Genetics* 2008, **179**: 1559-1575.
- Nilsen TO, Ebbesson LOE, Kiilerich P, Bjørnsson BrT, Madsen SS, McCormick SD *et al.*: **Endocrine systems in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*): Seasonal development and seawater acclimation**. *General and Comparative Endocrinology* 2008, **155**: 762-772.
- O'Regan S, Traiffort E, Ruat M, Cha N, Compaore D, Meunier FM: **An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**: 1835-1840.
- Ollivier H, Pichavant K, Puill-Stephan E, Roy S, Calves P, Nonnotte L *et al.*: **Volume regulation following hyposmotic shock in isolated turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes**. *J Comp Physiol B* 2006, **176**: 393-403.
- Ollivier L, Sellier P, Monin G: **Déterminisme génétique du syndrome d'hyperthermie maligne chez le porc de Piétrain**. *Ann Génét Sél Anim* 1975, **7**: 159-169.
- Ong CK, Ng CY, Leong C, Ng CP, Foo KT, Tan PH *et al.*: **Genomic structure of human OKL38 gene and its differential expression in kidney carcinogenesis**. *J Biol Chem* 2004, **279**: 743-754.
- Orozco A, Villalobos P, Valverde R: **Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver, kidney and gill in the rainbow trout**. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2002, **131**: 387-395.
- Otsu K, Khanna VK, Archibald AL, MacLennan DH: **Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families**. *Genomics* 1991, **11**: 744-750.
- Ozaki A, Khoo SK, Yoshiura Y, Ototake M, Sakamoto T, Dijkstra JM *et al.*: **Identification of Additional Quantitative Trait Loci (QTL) Responsible for Susceptibility to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Rainbow Trout**. *Fish Pathology* 2007, **42**: 131-140.

- Palstra AP, Crespo D, van den Thillart GE, Planas JV: **Saving energy to fuel exercise: swimming suppresses oocyte development and downregulates ovarian transcriptomic response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, **299**: R486-R499.
- Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K: **Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction.** *Oncogene* 2004, **23**: 1985-1997.
- Pan F, Zarate J, Bradley TM: **A homolog of the E3 ubiquitin ligase Rbx1 is induced during hyperosmotic stress of salmon.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, **282**: R1643-R1653.
- Payan P, Girarad JP, Mayer-Gostan N: **Branchial ion movemen in teleosts: the role of respiratory and chloride cells.** *In: Fish Physiology (eds W S Hoar and D J Randall)* 1984, **10B**: 129-176.
- Pedersen SF, Mills JW, Hoffmann EK: **Role of the F-actin Cytoskeleton in the RVD and RVI Processes in Ehrlich Ascites Tumor Cells.** *Experimental Cell Research* 1999, **252**: 63-74.
- Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW: **The cytoskeleton and cell volume regulation.** *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2001, **130**: 385-399.
- Pelis RM, McCormick SD: **Effects of Growth Hormone and Cortisol on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Localization and Abundance in the Gills of Atlantic Salmon.** *General and Comparative Endocrinology* 2001, **124**: 134-143.
- Pennacchio LA, Loots GG, Nobrega MA, Ovcharenko I: **Predicting tissue-specific enhancers in the human genome.** *Genome Res* 2007, **17**: 201-211.
- Perez-Enciso M: **In silico study of transcriptome genetic variation in outbred populations.** *Genetics* 2004, **166**: 547-554.
- Perry GML, Ferguson MM, Sakamoto T, Danzmann RG: **Sex-linked Quantitative Trait Loci for Thermotolerance and Length in the Rainbow Trout.** *Journal of Heredity* 2005, **96**: 97-107.

- Petretto E, Mangion J, Dickens NJ, Cook SA, Kumaran MK, Lu H *et al.*: **Heritability and tissue specificity of expression quantitative trait loci.** *PLoS Genet* 2006, **2**: e172.
- Ponsuksili S, Jonas E, Murani E, Phatsara C, Srikanchai T, Walz C *et al.*: **Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle.** *BMC Genomics* 2008, **9**: 367.
- Pottinger TG, Carrick TR: **A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout.** *Aquaculture* 1999a, **175**: 351-363.
- Pottinger TG, Carrick TR: **Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding.** *General and Comparative Endocrinology* 1999b, **116**: 122-132.
- Prud'homme B, Gompel N, Carroll SB: **Emerging principles of regulatory evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104 Suppl 1**: 8605-8612.
- Prunet P, Cairns MT, Winberg S, Pottinger TG: **Functional Genomics of Stress Responses in Fish.** *Reviews in Fisheries Science* 2008, **16**: 157-166.
- Randall D, Burggren W, French K: **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations, 5th eds.** *W H Freeman and Co , New York* 2002, 736.
- Reecy JM, Spurlock DM, Stahl CH: **Gene expression profiling: insights into skeletal muscle growth and development.** *J Anim Sci* 2006, **84 Suppl**: E150-E154.
- Reid SD, Hawkings GS, Galvez F, Goss GG: **Localization and characterization of phenamil-sensitive Na⁺ influx in isolated rainbow trout gill epithelial cells.** *J Exp Biol* 2003, **206**: 551-559.
- Rexroad C, Palti Y, Gahr S, Vallejo R: **A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *BMC Genetics* 2008, **9**: 74.
- Richards JG, Semple JW, Bystriansky JS, Schulte PM: **Na⁺/K⁺-ATPase {alpha}-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer.** *J Exp Biol* 2003, **206**: 4475-4486.

- Rockman MV, Kruglyak L: **Genetics of global gene expression.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**: 862-872.
- Rodriguez MF, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B: **Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses.** *Aquaculture* 2004, **241**: 93-115.
- Russel MJ, Klemmer AM, Olson KR: **Angiotensin signaling and receptor types in teleost fish.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, **128**: 41-51.
- Saint-Gelais S, Larrivee DH: **Culture du saumon de l'Atlantique *Salmo salar* en eau salée dans l'estuaire du St-Laurent, Quebec (Canada) avec hivernage en eau douce.** *Aquacultural Engineering* 1986, **5**: 17-32.
- Sakamoto T, Uchida K, Yokota S: **Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities.** *Zoolog Sci* 2001, **18**: 1163-1174.
- Salem M, Kenney B, Rexroad III CE, Yao J: **Development of a 37K high-density oligo-nucleotide microarray for rainbow trout.** *Journal of Fish Biology* 2008, **72**: 2187-2206.
- Saran S, Schaap P: **Adenylyl Cyclase G Is Activated by an Intramolecular Osmosensor.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**: 1479-1486.
- Sardet C: **Freeze fracture of the gill epithelium of euryhaline teleost fish.** *Am J Physiol* 1980, **238**: R207-R212.
- Schadt EE, Monks SA, Drake TA, Lusk AJ, Che N, Colinayo V *et al.*: **Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man.** *Nature* 2003, **422**: 297-302.
- Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D *et al.*: **An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease.** *Nat Genet* 2005, **37**: 710-717.
- Schmitz M: **Seasonal changes in hypoosmoregulatory ability in landlocked and anadromous populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* and Atlantic salmon, *Salmo salar*.** *Environmental Biology of Fishes* 1995, **42**: 401-412.

- Scott GR, Keir KR, Schulte PM: **Effects of spironolactone and RU486 on gene expression and cell proliferation after freshwater transfer in the euryhaline killifish.** *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 2005, **175**: 499-510.
- Scott GR, Richards JG, Forbush B, Isenring P, Schulte PM: **Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **287**: C300-C309.
- Scotto L, Narayan G, Nandula SV, Subramaniam S, Kaufmann AM, Wright JD *et al.*: **Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha.** *Mol Cancer* 2008, **7**: 58.
- Seale AP, Richman NH, III, Hirano T, Cooke I, Grau EG: **Evidence that signal transduction for osmoreception is mediated by stretch-activated ion channels in tilapia.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003a, **284**: C1290-C1296.
- Seale AP, Richman NH, III, Hirano T, Cooke I, Grau EG: **Cell volume increase and extracellular Ca²⁺ are needed for hyposmotically induced prolactin release in tilapia.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003b, **284**: C1280-C1289.
- Seear PJ, Carmichael SN, Talbot R, Taggart JB, Bron JE, Sweeney GE: **Differential gene expression during smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a first large-scale microarray study.** *Mar Biotechnol (NY)* 2010, **12**: 126-140.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P *et al.*: **Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray.** *Plant Cell* 2001, **13**: 61-72.
- Selye H: **A syndrome produced by diverse nocuous agents.** *Nature* 1936, **138**.
- Shan J, Wang P, Zhou J, Wu D, Shi H, Huo K: **RIOK3 interacts with caspase-10 and negatively regulates the NF-kappaB signaling pathway.** *Mol Cell Biochem* 2009, **332**: 113-120.

- Shaw JR, Sato JD, VanderHeide J, LaCasse T, Stanton CR, Lankowski A *et al.*: **The role of SGK and CFTR in acute adaptation to seawater in *Fundulus heteroclitus*.** *Cell Physiol Biochem* 2008, **22**: 69-78.
- Shelford VE: **Animal Communities in Temperate America.** *Chicago: Univ Chicago Press* 1913, 362.
- Shepherd BS, Drennon K, Johnson J, Nichols JW, Playle RC, Singer TD *et al.*: **Salinity acclimation affects the somatotropic axis in rainbow trout.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**: R1385-R1395.
- Shrimpton JM, McCormick SD: **Responsiveness of gill Na⁺/K⁺-ATPase to cortisol is related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbow trout.** *J Exp Biol* 1999, **202**: 987-995.
- Singer TD, Tucker SJ, Marshall WS, Higgins CF: **A divergent CFTR homologue: highly regulated salt transport in the euryhaline teleost *F. heteroclitus*.** *Am J Physiol* 1998, **274**: C715-C723.
- Singer TD, Raptis S, Sathiyaa R, Nichols JW, Playle RC, Vijayan MM: **Tissue-specific modulation of glucocorticoid receptor expression in response to salinity acclimation in rainbow trout.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2007, **146**: 271-278.
- Slovan KA, Desforges PR, Gilmour KM: **Evidence for a mineralocorticoid-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout.** *J Exp Biol* 2001, **204**: 3953-3961.
- Smith HW: **The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts.** *Am J Physiol* 1930, **93**: 480-505.
- Smith TR, Bradley TM: **Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress.** *J Exp Zool* 1999, **284**: 286-298.
- Staurnes M, Lysfjord G, Berg OK: **Parr-smolt transformation of a nonanadromous population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway.** *Can J Zool* 1992, **70**: 197-199.

- Stolte EH, de Mazon AF, Leon-Koosterziel KM, Jesiak M, Bury NR, Sturm A *et al.*: **Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*.** *J Endocrinol* 2008, **198**: 403-417.
- Storey JD, Akey JM, Kruglyak L: **Multiple locus linkage analysis of genomewide expression in yeast.** *PLoS Biol* 2005, **3**: e267.
- Stranger BE, Forrest MS, Clark AG, Minichiello MJ, Deutsch S, Lyle R *et al.*: **Genome-wide associations of gene expression variation in humans.** *PLoS Genet* 2005, **1**: e78.
- Stuart RO, Pavlova A, Beier D, Li Z, Krijanovski Y, Nigam SK: **EEG1, a putative transporter expressed during epithelial organogenesis: comparison with embryonic transporter expression during nephrogenesis.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, **281**: F1148-F1156.
- Sturm A, Bury N, Dengreville L, Fagart J, Flouriot G, Rafestin-Oblin ME *et al.*: **11-Deoxycorticosterone Is a Potent Agonist of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mineralocorticoid Receptor.** *Endocrinology* 2005, **146**: 47-55.
- Sullivan GV, Fryer JN, Perry SF: **Localization of mRNA for the proton pump (H⁺-ATPase) and Cl⁻ HCO₃⁻ exchanger in the rainbow trout gill.** *Canadian journal of zoology* 1996, **74**: 2095-2103.
- Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S *et al.*: **Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation.** *Nat Med* 2009, **15**: 306-312.
- Tang CH, Lee TH: **The effect of environmental salinity on the protein expression of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, **147**: 521-528.
- Tchernavin V: **The origin of salmon.** *Salmon Trout Mag* 1939, **95**: 120-140.
- Textor B, Licht AH, Tuckermann JP, Jessberger R, Razin E, Angel P *et al.*: **JunB is required for IgE-mediated degranulation and cytokine release of mast cells.** *J Immunol* 2007, **179**: 6873-6880.

- Thrower F, Guthrie C, Nielsen J, Joyce J: **A Comparison of Genetic Variation Between an Anadromous Steelhead, *Oncorhynchus mykiss*, Population and Seven Derived Populations Sequestered in Freshwater for 70 Years.** *Environmental Biology of Fishes* 2004, **69**: 111-125.
- Tipsmark CK, Madsen SS, Seidelin M, Christensen AS, Cutler CP, Cramb G: **Dynamics of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter and Na^+ , K^+ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *J Exp Zool* 2002, **293**: 106-118.
- Tipsmark CK, Madsen SS, Borski RJ: **Effect of salinity on expression of branchial ion transporters in striped bass (*Morone saxatilis*).** *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004, **301**: 979-991.
- Tipsmark CK, Sorensen KJ, Madsen SS: **Aquaporin expression dynamics in osmoregulatory tissues of Atlantic salmon during smoltification and seawater acclimation.** *J Exp Biol* 2010, **213**: 368-379.
- Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z *et al.*: **VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways.** *Blood* 2008, **111**: 3665-3674.
- Toker A: **Signaling through protein kinase C.** *Front Biosci* 1998, **3**: 1134-1147.
- Tomita S, Okuyama E, Ohnishi T, Ichikawa Y: **Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1290**: 273-281.
- Tong EHY, Guo JJ, Huang AL, Liu H, Hu CD, Chung SSM *et al.*: **Regulation of Nucleocytoplasmic Trafficking of Transcription Factor OREBP/TonEBP/NFAT5.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**: 23870-23879.
- Tresguerres M, Levin LR, Buck J, Grosell M: **Modulation of NaCl absorption by $[\text{HCO}_3^-]$ in the marine teleost intestine is mediated by soluble adenylyl cyclase.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, **299**: R62-R71.

- Tse WK, Au DW, Wong CK: **Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill chloride and pavement cells of seawater acclimating eels.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **346**: 1181-1190.
- Tse WK, Au DW, Wong CK: **Effect of osmotic shrinkage and hormones on the expression of Na⁺/H⁺ exchanger-1, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺ -ATPase in gill pavement cells of freshwater adapted Japanese eel, *Anguilla japonica*.** *J Exp Biol* 2007, **210**: 2113-2120.
- Tseng YC, Lee JR, Chang JCH, Kuo CH, Lee SJ, Hwang PP: **Regulation of lactate dehydrogenase in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gills during acclimation to salinity challenge.** *Zoological Studies* 2008, **47**: 473-480.
- Tymchuk W, Sakhrani D, Devlin R: **Domestication causes large-scale effects on gene expression in rainbow trout: analysis of muscle, liver and brain transcriptomes.** *Gen Comp Endocrinol* 2009, **164**: 175-183.
- Uchida K, Kaneko T: **Enhanced Chloride Cell Turnover in the Gills of Chum Salmon Fry in Seawater.** *Zoological Science* 1996, **13**: 655-660.
- van der Heijden M, Pickkers P, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW, Bouw MP, van der Hoeven JG *et al.*: **Circulating angiotensin-2 levels in the course of septic shock: relation with fluid balance, pulmonary dysfunction and mortality.** *Intensive Care Med* 2009, **35**: 1567-1574.
- Venero JL, Vizuete ML, Ilundáin AA, Machado A, Echevarria M, Cano J: **Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs.** *Neuroscience* 1999, **94**: 239-250.
- Vijayan M, Morgan J, Sakamoto T, Grau E, Iwama G: **Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes.** *J Exp Biol* 1996, **199**: 2467-2475.
- Visscher PM, Thompson R, Haley CS: **Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping.** *Genetics* 1996, **143**: 1013-1020.
- Vuylsteke M, Daele H, Vercauteren A, Zabeau M, Kuiper M: **Genetic dissection of transcriptional regulation by cDNA-AFLP.** *Plant J* 2006, **45**: 439-446.

- Walker PA, Kille P, Hurley A, Bury NR, Hogstrand C: **An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **230**: 67-77.
- Wayne ML, McIntyre LM: **Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**: 14903-14906.
- Wendelaar Bonga SE: **The stress response in fish.** *Physiol Rev* 1997, **77**: 591-625.
- Westberry JM, Sadosky PW, Hubler TR, Gross KL, Scammell JG: **Glucocorticoid resistance in squirrel monkeys results from a combination of a transcriptionally incompetent glucocorticoid receptor and overexpression of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP51.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006, **100**: 34-41.
- Whitehead A: **Comparative mitochondrial genomics within and among species of killifish.** *Bmc Evolutionary Biology* 2009, **9**.
- Whitehead A, Crawford DL: **Variation in tissue-specific gene expression among natural populations.** *Genome Biol* 2005, **6**: R13.
- Williams RB, Cotsapas CJ, Cowley MJ, Chan E, Nott DJ, Little PF: **Normalization procedures and detection of linkage signal in genetical-genomics experiments.** *Nat Genet* 2006, **38**: 855-856.
- Williams RB, Chan EK, Cowley MJ, Little PF: **The influence of genetic variation on gene expression.** *Genome Res* 2007, **17**: 1707-1716.
- Wilson JM, Laurent P, Tufts BL, Benos DJ, Donowitz M, Vogl AW *et al.*: **NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization.** *J Exp Biol* 2000, **203**: 2279-2296.
- Wilson J, Leitúo A, Gonçalves A, Ferreira C, Reis-Santos P, Fonseca AV *et al.*: **Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L.).** *Marine Biology* 2007, **151**: 1633-1645.
- Wilson JM, Laurent P: **Fish gill morphology: inside out.** *J Exp Zool* 2002, **293**: 192-213.

- Wringe BF, Devlin RH, Ferguson MM, Moghadam HK, Sakhrani D, Danzmann RG: **Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *BMC Genet* 2010, **11**: 63.
- Wu C, Delano DL, Mitro N, Su SV, Janes J, McClurg P *et al.*: **Gene set enrichment in eQTL data identifies novel annotations and pathway regulators.** *PLoS Genet* 2008, **4**: e1000070.
- Xu S, Wong CCL, Tong EHY, Chung SSM, Yates JR, Yin Y *et al.*: **Phosphorylation by Casein Kinase 1 Regulates Tonicity-induced Osmotic Response Element-binding Protein/Tonicity Enhancer-binding Protein Nucleocytoplasmic Trafficking.** *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**: 17624-17634.
- Yamashita M, Ojima N, Sakamoto T: **Molecular cloning and cold-inducible gene expression of ferritin H subunit isoforms in rainbow trout cells.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 26908-26913.
- Yamashita S, Wakazono K, Nomoto T, Tsujino Y, Kuramoto T, Ushijima T: **Expression quantitative trait loci analysis of 13 genes in the rat prostate.** *Genetics* 2005, **171**: 1231-1238.
- Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L *et al.*: **Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice.** *Genome Res* 2006, **16**: 995-1004.
- Zhang X, Clark AF, Yorio T: **FK506-Binding Protein 51 Regulates Nuclear Transport of the Glucocorticoid Receptor and Glucocorticoid Responsiveness.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2008, **49**: 1037-1047.
- Zimmerman A, Evenhuis J, Thorgaard G, Ristow S: **A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout.** *Immunogenetics* 2004, **55**: 825-835.

Annexes

Fichier additionnel de l'article QTL

- Numéros de soumission GenBank dbSNP des SNP utilisés dans le scan génome

local_identifier	NCBI_ss#
OmyD00021INRA	275362975
OmyD00029INRA	283950563
OmyD00082INRA	283950661
OmyD00096INRA	275362985
OmyD00173INRA	275363001
OmyD00259INRA	275363025
OmyD00306INRA	275363036
OmyD00353INRA	283950582
OmyD00371INRA	283950560
OmyD00405INRA	283950557
OmyD00415INRA	275363052
OmyD00499INRA	283950635
OmyD00553INRA	275363070
OmyD00554INRA	275363076
OmyD00563INRA	275363100
OmyD00565INRA	283950608
OmyD00567INRA	275515738
OmyD00576INRA	283950629
OmyD00578INRA	283950642
OmyS00006INRA	275362966
OmyS00008INRA	275362970
OmyS00011INRA	283950586
OmyS00013INRA	283950590
OmyS00016INRA	283950592
OmyS00020INRA	275362972
OmyS00037INRA	283950576
OmyS00038INRA	283950640
OmyS00044INRA	283950572
OmyS00049INRA	283950594
OmyS00051INRA	275362978
OmyS00078INRA	283950637
OmyS00081INRA	283950596
OmyS00090INRA	275362983
OmyS00099INRA	275362990
OmyS00118INRA	283950602
OmyS00135INRA	275362994
OmyS00160INRA	283950627
OmyS00168INRA	283950645
OmyS00172INRA	275362997
OmyS00225INRA	283950600
OmyS00238INRA	283950566
OmyS00252INRA	283950654
OmyS00254INRA	283950588
OmyS00266INRA	275363029
OmyS00268INRA	275363031

OmyS00274INRA	283950656
OmyS00309INRA	275363039
OmyS00361INRA	283950657
OmyS00370INRA	275363043
OmyS00379INRA	283950647
OmyS00387INRA	283950633
OmyS00397INRA	283950603
OmyS00398INRA	275363046
OmyS00399INRA	275363050
OmyS00401INRA	283950578
OmyS00424INRA	275363056
OmyS00426INRA	283950664
OmyS00442INRA	283950660
OmyS00458INRA	283950650
OmyS00464INRA	275363057
OmyS00470INRA	275363061
OmyS00476INRA	283950623
OmyS00477INRA	275363063
OmyS00498INRA	275363068
OmyS00550INRA	283950565
OmyS00551INRA	283950580
OmyS00555INRA	275363078
OmyS00556INRA	275363081
OmyS00557INRA	275363085
OmyS00558INRA	275363088
OmyS00559INRA	275363090
OmyS00560INRA	283950573
OmyS00561INRA	275363093
OmyS00562INRA	275363097
OmyS00564INRA	275363103
OmyS00566INRA	275363106
OmyS00568INRA	275363109
OmyS00569INRA	283950568
OmyS00570INRA	275363112
OmyS00574INRA	283950598
OmyS00575INRA	283950624
OmyS00579INRA	283950652
OmyS00580INRA	283950606
OmyS00581INRA	283950631
OmyS00582INRA	283950583

Informations relatives aux parties transcriptomique différentielle et QTL

-Tableau reprenant les gènes candidats de l'expérience de transcriptomique différentielle du chapitre II à un seuil FDR de 5

-Généalogie des individus utilisés pour les analyses de détection de QTL et eQTL

-Carte génétique utilisée lors des analyses de détection de QTL et eQTL

Gènes candidats des analyses de transcriptomie différentielle du chapitre II.

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
2 hours				
tcay0018.l10	0	BX309261	BX309261.s.om.10	[BBH] PSF1_HUMAN (sp:Q14691) DNA replication complex GINS protein PSF1 OS=Homo sapiens GN=GINS1 PE=1 SV=1
tcbk0034.n.16	0	CU073536	CU073536.s.om.10	(sp:Q6GLW8) Apoptosis-inducing factor 2 OS=Xenopus laevis GN=aifm2 PE=2 SV=1
8 hours				
tcay0023.a.19	0	BX310197	BX310197.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransférase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcay0010.l23	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransférase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
IRT47H11_B_D06	0	CA379523	CA387790.s.om.10	ref[NP_001139846.1] Zinc finger CCCH domain-containing protein 15 [Salmo salar]
24 hours (1/6)				
IRT120G22_C_D11	0	CA362233	CU069974.s.om.10	Oncorhynchus mykiss toxin-1 (LOC100135970), mRNA
IRT39D23_B_B12	0	CA377594	CA346323.s.om.10	[BBH] EIF3D_DANRE (sp:Q6TH15) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Danio rerio GN=eif3d PE=2 SV=1
IRT55D21_B_B11	0	CA381160	CA354351.s.om.10	[BBH] MED10_DANRE (sp:Q0VIA1) Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10 OS=Danio rerio GN=med10 PE=2 SV=1
tcac0004.a.22	0	BX083957	BX083956.s.om.10	(sp:A6NN14) Zinc finger protein 729 OS=Homo sapiens GN=ZNF729 PE=2 SV=3
tcac0004.o.05	0	BX084437	BX084437.s.om.10	(sp:Q9UJW8) Zinc finger protein 180 OS=Homo sapiens GN=ZNF180 PE=1 SV=2
tcad0002.p.17	0	BX075597	BX075597.s.om.10	(sp:Q5JTW2) Centrosomal protein of 78 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP78 PE=1 SV=1
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcab0002.k.12	0	CT962667	FYV3OTN01BVNEO.s.o m.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcav0001.j.20	0	BX085582	BX085582.s.om.10	(sp:Q9BXX0) EMILIN-2 OS=Homo sapiens GN=EMILIN2 PE=1 SV=2
tcav0004.b.11	0	BX087315	BX087314.s.om.10	(sp:Q99MK2) Histone acetyltransférase KAT5 OS=Rattus norvegicus GN=Kat5 PE=1 SV=2
tcav0004.f.06	0	BX086372	BX310251.s.om.10	(sp:Q3T144) Transmembrane protein 106C OS=Bos taurus GN=TMEM106C PE=2 SV=1
tcay0003.p.11	0	BX297901	BX297900.s.om.10	(sp:Q15828) Cystatin-M OS=Homo sapiens GN=CST6 PE=1 SV=1
tcce0015c.f.10	0	CU070049	CU070049.s.om.10	Salmo salar NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 (ubc12), mRNA
tcay0016.p.14	0	BX308015	BX308015.s.om.10	0
tcay0026.g.05	0	BX313035	BX313035.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransférase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcba0001.o.24	0	BX857505	BX859454.s.om.10	(sp:P06761) 78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1
tcba0003.d.20	0	BX856445	CU071578.s.om.10	[BBH] PARP4_HUMAN (sp:Q9UKK3) Poly [ADP-ribose] polymerase 4 OS=Homo sapiens GN=PARP4 PE=1 SV=2
tcba0018.p.09	0	BX864334	CA387160.s.om.10	[BBH] SGK2_HUMAN (sp:Q9HBY8) Serine/threonine-protein kinase Sgk2 OS=Homo sapiens GN=SGK2 PE=1 SV=1
tcbk0010.l08	0	BX873389	BX885361.s.om.10	[BBH] AMP1D_DANRE (sp:Q4VBS4) Methionine aminopeptidase 1D, mitochondrial OS=Danio rerio GN=map1d PE=2 SV=1
tcbk0024.h.21	0	BX875321	BX875321.s.om.10	(sp:Q3SYU2) Elongation factor 2 OS=Bos taurus GN=EEF2 PE=2 SV=3
tcbk0030.l05	0	BX886340	BX886340.s.om.10	(sp:Q9HB89) Neuromedin-U receptor 1 OS=Homo sapiens GN=NMUR1 PE=2 SV=1
tcbk0040.h.23	0	BX879105	BX305206.s.om.10	[BBH] NOCT_MOUSE (sp:O35710) Nocturnin OS=Mus musculus GN=Cern41 PE=2 SV=3
IRT108C22_C_B11	0	CA363333	BX862694.s.om.10	(sp:P15429) Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3
tcay0021.g.10	0	BX310003	CA344558.s.om.10	(sp:Q9D0E1) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnmpm PE=1 SV=3
IRT129G21_A_D11	0			
tcce0003.o.17	0	CU070136	CU070136.s.om.10	[BBH] NHRF3_RAT (sp:Q9JJ40) Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdzk1 PE=1 SV=2
tcce0004.j.04	0	CU066754	BX082871.s.om.10	(sp:Q6P819) Cell differentiation protein RCD1 homolog OS=Xenopus tropicalis GN=rqcd1 PE=2 SV=1
tcce0012.c.02	0	CU068339	BX080225.s.om.10	0
tcce0022.b.04	0	CU073097	CX149178.s.om.10	0
tcba0009.m.07	0	CU071857	CA349629.s.om.10	0
tcce0015.l21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransférase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
24 hours (2/6)				
IRT112H04_D_D02	5	CA363475	FP322783.s.om.10	(sp:Q7ZVF3) Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Danio rerio GN=sdha PE=2 SV=2
IRT114J21_B_E11	5	CA365617	CA365617.s.om.10	(sp:O75312) Zinc finger protein ZPR1 OS=Homo sapiens GN=ZNF259 PE=1 SV=1
IRT116K18_C_F09	5	CA366266	CA366266.s.om.10	[BBH] MMP9_HUMAN (sp:P14780) Matrix metalloproteinase-9 OS=Homo sapiens GN=MMP9 PE=1 SV=3
IRT129F24_D_C12	5	CA362985	AF329700.s.om.10	(sp:P11364) T-cell receptor beta chain T17T-22 OS=Feline leukemia virus GN=V-TCR PE=4 SV=1
IRT130N16_D_G08	5	CA341830	CA357294.s.om.10	[BBH] CTNB1_MOUSE (sp:Q02248) Catenin beta-1 OS=Mus musculus GN=Ctnnb1 PE=1 SV=1
IRT134K08_C_F04	5	CA386115	CA386115.s.om.10	(sp:P07222) Nucleophosmin OS=Xenopus laevis GN=npml PE=1 SV=1
IRT139I10_C_E05	5	CA384731	CA343749.s.om.10	(sp:O57521) Heat shock protein HSP 90-beta OS=Danio rerio GN=hsp90ab1 PE=2 SV=2
IRT148D09_B_B05	5	CA367978	CA367978.s.om.10	[BBH] PRP31_DANRE (sp:Q7SXM7) U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31 OS=Danio rerio GN=prp31 PE=2 SV=1
IRT29F03_B_C02	5	CA383420	CA348390.s.om.10	(sp:Q6NYB7) Ras-related protein Rab-1A OS=Rattus norvegicus GN=Rab1A PE=1 SV=3
IRT29I11_A_E06	5	CA372100	CA372100.s.om.10	[BBH] GP132_MOUSE (sp:Q9Z282) Probable G-protein coupled receptor 132 OS=Mus musculus GN=Gpr132 PE=1 SV=1
IRT29K07_A_F04	5	CA372109	CA372109.s.om.10	[BBH] ZNFX1_MOUSE (sp:Q8R151) NFX1-type zinc finger-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Znf1 PE=2 SV=2
IRT29N14_D_G07	5	CA372283	U73841.s.om.10	[BBH] ARNT_ONCMY (sp:P79832) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator OS=Oncorhynchus mykiss GN=arnt PE=1 SV=1
IRT41P24_D_H12	5	CA377031	CA386186.s.om.10	[BBH] TAF7_PONAB (sp:Q5R7L9) Transcription initiation factor TFIID subunit 7 OS=Pongo abelii GN=TAF7 PE=2 SV=1
IRT42C11_A_B06	5	CA377972	AF345876.s.om.10	(sp:P04431) Ig kappa chain V-I region Walker OS=Homo sapiens PE=4 SV=1
IRT45H23_B_D12	5	CA379210	CA357975.s.om.10	[BBH] AMYP_STRCA (sp:P83053) Pancreatic alpha-amylase OS=Struthio camelus PE=1 SV=1
IRT48M17_A_G09	5	CA379854	CA379854.s.om.10	(sp:P11881) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 OS=Mus musculus GN=Itpr1 PE=1 SV=1
IRT49B05_B_A03	5	CA380040	CA380040.s.om.10	(sp:P50121) Retinol-binding protein 2 OS=Sus scrofa GN=RBP2 PE=2 SV=2
IRT51G15_A_D08	5	CA342677	CA342677.s.om.10	[BBH] UBE4A_PONAB (sp:Q5R9G3) Ubiquitin conjugation factor E4 A OS=Pongo abelii GN=UBE4A PE=2 SV=2
IRT51H10_D_D05	5	CA380787	CA353649.s.om.10	(sp:Q93008) Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X OS=Homo sapiens GN=USP9X PE=1 SV=2
IRT51P09_B_H05	5	CA380677	CA370307.s.om.10	(sp:Q5ZL72) 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Gallus gallus GN=HSPD1 PE=1 SV=1
IRT54K11_A_F06	5	CA351440	AF401631.s.om.10	[BBH] TNF6B_HUMAN (sp:O95407) Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B OS=Homo sapiens GN=TNFRSF6B PE=1 SV=1
IRT54P10_D_H05	5	CA351120	CA351120.s.om.10	(sp:Q9NWW6) Nicotinamide riboside kinase 1 OS=Homo sapiens GN=NRK1 PE=1 SV=1
IRT55I22_C_E11	5	CA381354	CT569405.s.om.10	(sp:P70083) Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS=Makaira nigricans GN=atp2a1 PE=2 SV=2
IRT55O13_A_H07	5	CA381302	CU070936.s.om.10	(sp:Q9EPW1) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arntl PE=2 SV=4
IRT57O07_A_H04	5	CA381546	CA381546.s.om.10	(sp:Q4R5P6) Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2 OS=Macaca fascicularis GN=DYNC1L12 PE=2 SV=1
IRT58E09_A_C05	5	CA351266	AM051358.s.om.10	[BBH] BECN1_RAT (sp:Q91XJ1) Beclin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Becn1 PE=2 SV=1
IRT63I02_C_E01	5	CA343008	CA343140.s.om.10	(sp:Q32LQ4) Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Danio rerio GN=bhmt PE=2 SV=1
IRT69P12_D_H06	5	CA353563	CA353563.s.om.10	(sp:Q4FZT9) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Psm2 PE=2 SV=1
IRT70L11_B_F06	5	CA364771	CA342907.s.om.10	(sp:P35979) 60S ribosomal protein L12 OS=Mus musculus GN=Rpl12 PE=1 SV=2
IRT74K10_C_F05	5	CA353846	CA346619.s.om.10	(sp:P62909) 40S ribosomal protein S3 OS=Rattus norvegicus GN=Rps3 PE=2 SV=1
IRT74K23_A_F12	5	CA353624	CA353624.s.om.10	(sp:P0C605) cGMP-dependent protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Prkg1 PE=1 SV=1
IRT78F21_B_C11	5	CA354628	AF483533.s.om.10	(sp:Q3MHZ8) Galectin-9 OS=Bos taurus GN=LGALS9 PE=2 SV=1
IRT78G05_A_D03	5	CA354544	CA354544.s.om.10	(sp:O00410) Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4
IRT79J05_B_E03	5	CA354961	CA345893.s.om.10	(sp:O43570) Carbonic anhydrase 12 OS=Homo sapiens GN=CA12 PE=1 SV=1
IRT93E11_A_C06	5	CA346264	CU070240.s.om.10	(sp:O57521) Heat shock protein HSP 90-beta OS=Danio rerio GN=hsp90ab1 PE=2 SV=2
IRT94B04_D_A02	5	CA348066	BX870419.s.om.10	(sp:Q8HY11) C-type lectin domain family 4 member M OS=Hylobates syndactylus GN=CLEC4M PE=3 SV=1
IRT96B07_B_A04	5	CA356380	CA356380.s.om.10	[BBH] PGK_CHICK (sp:P51903) Phosphoglycerate kinase OS=Gallus gallus GN=PGK PE=2 SV=2

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
24 hours (3/6)				
tcac0001.n.23	5	BX072921	BX072920.s.om.10	(sp:O54873) Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1 OS=Cricetulus griseus GN=AIMP1 PE=2 SV=1
tcab0002.g.18	5	BX080638	BX080638.s.om.10	[BBH] TRM11_MOUSE (sp:Q9CWH5) tRNA guanosine-2'-O-methyltransferase TRM11 homolog OS=Mus musculus GN=Trmt11 PE=2 SV=1
tcac0004.b.05	5	BX083968	CA348416.s.om.10	(sp:Q5XH16) NHP2-like protein 1 OS=Xenopus laevis GN=nhp2l1 PE=2 SV=1
tcac0004.l01	5	BX083602	BX083601.s.om.10	(sp:P36896) Activin receptor type-1B OS=Homo sapiens GN=ACVR1B PE=1 SV=1
tcac0005.b.05	5	BX083462	BX083462.s.om.10	(sp:Q9D7M8) DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4 OS=Mus musculus GN=Polr2d PE=2 SV=2
tcac0005.h.05	5	BX084882	CA345978.s.om.10	[BBH] ZN511_DANRE (sp:Q7ZZ00) Zinc finger protein 511 OS=Danio rerio GN=znf511 PE=2 SV=1
tcad0003.b.03	5	BX074651	M22732.s.om.10	[BBH] SOMA2_ONCMY (sp:P20332) Somatotropin-2 OS=Oncorhynchus mykiss GN=gh2 PE=2 SV=2
tcad0003.k.22	5	BX074011	BX074011.s.om.10	(sp:Q96P26) Cytosolic 5'-nucleotidase 1B OS=Homo sapiens GN=NT5C1B PE=2 SV=2
tcad0004.m.09	5	BX077513	BX077513.s.om.10	(sp:Q9BE74) Low-density lipoprotein receptor-related protein 12 (Fragment) OS=Macaca fascicularis GN=LRP12 PE=2 SV=2
tcad0004.m.19	5	BX077532	BX077531.s.om.10	[BBH] TMM69_XENTR (sp:Q0V9J0) Transmembrane protein 69 OS=Xenopus tropicalis GN=tmem69 PE=2 SV=1
tcad0005.b.09	5	BX076224	BX076224.s.om.10	(sp:O94919) Endonuclease domain-containing 1 protein OS=Homo sapiens GN=ENDOD1 PE=1 SV=2
tcad0005.e.15	5	BX076567	CA356021.s.om.10	0
tcad0005.j.10	5	BX076877	CA343337.s.om.10	[BBH] G3BP1_BOVIN (sp:Q32LC7) Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=G3BP PE=2 SV=1
tcad0006.c.04	5	BX075964	CX033165.s.om.10	(sp:Q5E9E4) Translocon-associated protein subunit beta OS=Bos taurus GN=SSR2 PE=2 SV=1
tcad0006.h.11	5	BX077704	BX077703.s.om.10	(sp:Q10739) Matrix metalloproteinase-14 OS=Rattus norvegicus GN=Mmp14 PE=2 SV=2
tcad0006.o.06	5	BX079001	CA351441.s.om.10	(sp:P50143) T-complex protein 1 subunit gamma OS=Xenopus laevis GN=cct3 PE=2 SV=2
tcad0008.p.20	5	BX077667	BX077667.s.om.10	(sp:Q8WTV0) Scavenger receptor class B member 1 OS=Homo sapiens GN=SCARB1 PE=1 SV=1
tcad0009.a.04	5	BX077683	FP319224.s.om.10	[BBH] RAB28_MOUSE (sp:Q99KL7) Ras-related protein Rab-28 OS=Mus musculus GN=Rab28 PE=2 SV=1
tcad0009.f.17	5	BX079628	CA352314.s.om.10	[BBH] IMA2_MOUSE (sp:P52293) Importin subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Kpna2 PE=1 SV=2
tcad0009.l.20	5	BX079600	AJ312346.s.om.10	[BBH] URP2_MOUSE (sp:Q8K1B8) Fermitin family homolog 3 OS=Mus musculus GN=Fermt3 PE=1 SV=1
tcad0009.n.08	5	BX081093	CA373077.s.om.10	(sp:Q2KIG0) Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ETFDH PE=2 SV=1
tcad0001.p.03	5	CT962706	U55380.s.om.10	(sp:P15979) Class I histocompatibility antigen, F10 alpha chain OS=Gallus gallus PE=2 SV=1
tcad0002.c.04	5	CT962711	BX868386.s.om.10	(sp:Q8CI94) Glycogen phosphorylase, brain form OS=Mus musculus GN=Pygb PE=1 SV=3
tcad0001.g.24	5	CT962723	CA379233.s.om.10	[BBH] S35E3_DANRE (sp:Q1JQ66) Solute carrier family 35 member E3 OS=Danio rerio GN=slc35e3 PE=2 SV=1
tcav0001.c.23	5	BX085218	BX085218.s.om.10	(sp:O60870) DNA/RNA-binding protein KIN17 OS=Homo sapiens GN=KIN PE=1 SV=2
tcav0004.c.07	5	BX087351	CR374874.s.om.10	(sp:Q92122) Pyruvate kinase muscle isozyme OS=Xenopus laevis GN=pkm PE=2 SV=1
tcav0004.h.07	5	BX087860	BX085754.s.om.10	(sp:O00482) Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 OS=Homo sapiens GN=NR5A2 PE=1 SV=2
tcav0005.m.01	5	BX087250	BX087250.s.om.10	(sp:Q92090) Cytochrome P450 2K1 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp2k1 PE=2 SV=1
tcav0005.p.22	5	BX087918	BX087918.s.om.10	0
tcay0001.c.01	5	BX297070	BX297070.s.om.10	Salmo salar BRI3-binding protein (bri3b), mRNA
tcay0001.g.18	5	CU068041	CU068041.s.om.10	(sp:Q8WWA0) Intelectin-1 OS=Homo sapiens GN=ITLN1 PE=1 SV=1
tcay0008.f.19	5	BX301535	BX301535.s.om.10	(sp:Q99P82) Claudin-11 OS=Rattus norvegicus GN=Cldn11 PE=1 SV=1
tcay0008.p.16	5	BX321163	CA358312.s.om.10	(sp:Q5RBK4) H(+)/Cl(-) exchange transporter 5 OS=Pongo abelii GN=CLCN5 PE=2 SV=1
tcay0009.e.24	5	BX302760	BX302760.s.om.10	(sp:Q5EA28) CpG-binding protein OS=Bos taurus GN=CXXC1 PE=2 SV=1
tcay0009.g.17	5	BX302128	BX302128.s.om.10	(sp:Q66HY7) Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3 OS=Danio rerio GN=eif4e3 PE=2 SV=1
tcay0011.f.24	5	BX303309	BX074576.s.om.10	[BBH] MCEE_HUMAN (sp:Q96PE7) Methylmalonyl-CoA epimerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MCEE PE=1 SV=1
tcay0013.h.17	5	BX305152	BX305152.s.om.10	(sp:Q3V6T2) Girdin OS=Homo sapiens GN=CCDC88A PE=1 SV=2
tcay0014.e.15	5	BX304530	BX304530.s.om.10	Salmo salar paired-like homeodomain transcription factor 1 alpha (LOC100136800), mRNA

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
24 hours (4/6)				
tcay0014.g.05	5	BX305411	BX305411.s.om.10	(sp:Q6DRD3) DNA polymerase beta OS=Danio rerio GN=polb PE=2 SV=2
tcay0015.a.12	5	BX306294	BX306294.s.om.10	[BBH] GPR6_MOUSE (sp:Q6YNI2) G-protein coupled receptor 6 OS=Mus musculus GN=Gpr6 PE=2 SV=1
tcay0016.n.19	5	BX307936	CA354872.s.om.10	(sp:Q32NP8) Forkhead box protein C1-B OS=Xenopus laevis GN=foxc1-B PE=2 SV=1
tcay0021.f.07	5	BX309957	CA369536.s.om.10	[BBH] UBE3A_HUMAN (sp:Q05086) Ubiquitin-protein ligase E3A OS=Homo sapiens GN=UBE3A PE=1 SV=4
tcay0021.h.10	5	BX310050	BX310050.s.om.10	[BBH] PHOP2_BOVIN (sp:Q2KI06) Pyridoxal phosphate phosphatase PHOSPHO2 OS=Bos taurus GN=PHOSPHO2 PE=2 SV=1
tcay0022.l.14	5	BX309878	BX309878.s.om.10	(sp:Q9BY12) S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum OS=Homo sapiens GN=SCAPER PE=1 SV=1
tcay0022.n.19	5	BX311483	BX311483.s.om.10	[BBH] TRPC3_MOUSE (sp:Q9QZC1) Short transient receptor potential channel 3 OS=Mus musculus GN=Trpc3 PE=2 SV=1
tcay0025.i.08	5	BX312229	BX312229.s.om.10	PREDICTED: ReO_6-like [Danio rerio]
tcay0028.g.13	5	BX321530	BX321530.s.om.10	(sp:Q7RTR2) Protein NLRC3 OS=Homo sapiens GN=NLRC3 PE=2 SV=2
tcay0030.g.21	5	BX316652	CA386021.s.om.10	[BBH] OXA1L_MOUSE (sp:Q8BGA9) Mitochondrial inner membrane protein OXA1L OS=Mus musculus GN=Oxa1l PE=2 SV=1
tcay0031.o.13	5	BX315964	BX315964.s.om.10	[BBH] RPAP3_HUMAN (sp:Q9H6T3) RNA polymerase II-associated protein 3 OS=Homo sapiens GN=RPAP3 PE=1 SV=2
tcay0033.m.19	5	BX317334	BX305511.s.om.10	[BBH] STK35_MOUSE (sp:Q80ZW0) Serine/threonine-protein kinase 35 OS=Mus musculus GN=Stk35 PE=2 SV=3
tcay0033.m.20	5	BX317335	CX253798.s.om.10	(sp:Q6AW46) Carboxylesterase 7 OS=Mus musculus GN=Ces7 PE=2 SV=1
tcay0036.a.02	5	BX319253	D83256.s.om.10	[BBH] SOX8_TETNG (sp:Q6IZ48) Transcription factor Sox-8 OS=Tetraodon nigroviridis GN=sox8 PE=2 SV=2
tcay0038.f.17	5	BX321019	BX308750.s.om.10	kinesin family member 2C [Danio rerio]
tcay0040.p.08	5	BX859824	CU071543.s.om.10	(sp:Q9QW08) Phosducin OS=Mus musculus GN=Pdc PE=2 SV=1
tcba0001.a.01	5	BX857653	BX857653.s.om.10	[BBH] TCTE1_MACFA (sp:Q4R642) T-complex-associated testis-expressed protein 1 OS=Macaca fascicularis GN=TCTE1 PE=2 SV=1
tcba0001.a.05	5	BX857691	BX912393.s.om.10	(sp:Q62760) Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Tomm20 PE=1 SV=2
tcba0003.e.04	5	BX856482	CU071569.s.om.10	[BBH] TUTLB_HUMAN (sp:Q9UPX0) Protein turtle homolog B OS=Homo sapiens GN=IGSF9B PE=2 SV=2
tcba0003.i.22	5	BX858082	BX858082.s.om.10	PREDICTED: GTPase IMAP family member 4-like [Danio rerio]
tcba0005.l.22	5	BX856804	FP320200.s.om.10	(sp:Q90593) 78 kDa glucose-regulated protein OS=Gallus gallus GN=HSPA5 PE=2 SV=1
tcba0007.l.09	5	BX860114	BX317233.s.om.10	(sp:Q80Y19) Rho GTPase-activating protein 11A OS=Mus musculus GN=Arhgap11a PE=1 SV=1
tcba0010.g.16	5	BX862434	CR364602.s.om.10	[BBH] TM144_MOUSE (sp:Q8VEH0) Transmembrane protein 144 OS=Mus musculus GN=Tmem144 PE=2 SV=1
tcba0014.b.11	5	BX863429	BX859460.s.om.10	(sp:Q7ZUC7) Prostaglandin E synthase 2 OS=Danio rerio GN=ptgs2 PE=2 SV=1
tcba0014.b.19	5	BX863434	BX318476.s.om.10	(sp:Q9UMS0) NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NFU1 PE=1 SV=2
tcba0015.o.11	5	BX863355	BX087503.s.om.10	(sp:Q802G7) Selenoprotein M OS=Danio rerio GN=sepm PE=2 SV=2
tcba0015.p.10	5	BX863377	BX087124.s.om.10	[BBH] MIDN_DANRE (sp:Q6NYU6) Midnolin OS=Danio rerio GN=midn PE=2 SV=1
tcba0020.g.20	5	BX864474	CX254298.s.om.10	(sp:Q41720) Caffoyl-CoA O-methyltransferase OS=Zinnia elegans GN=CCOAMT PE=2 SV=1
tcba0023.h.11	5	BX867062	CU072107.s.om.10	(sp:Q86Y56) HEAT repeat-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=HEATR2 PE=1 SV=3
tcba0028.f.09	5	BX865185	BX865185.s.om.10	(sp:Q2T9T0) Uncharacterized protein C11orf66 homolog OS=Bos taurus PE=2 SV=1
tcba0029.k.15	5	BX866351	CU072099.s.om.10	(sp:P42125) 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dci PE=2 SV=1
tcbi0009.k.09	5	BX857421	BX075748.s.om.10	[BBH] MINA_HUMAN (sp:Q8IUF8) MYC-induced nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=MINA PE=1 SV=1
tcbi0011.e.06	5	BX855920	CU064635.s.om.10	[BBH] M10L1_HUMAN (sp:Q9BXT6) Putative helicase Mov10l1 OS=Homo sapiens GN=MOV10L1 PE=1 SV=1
tcbi0011.p.19	5	BX859303	BX859303.s.om.10	[BBH] TRH_ONCNE (sp:Q8QFQ9) Prothyroliberin type A OS=Oncorhynchus nerka GN=trha PE=2 SV=1
tcbk0001.b.10	5	BX874751	BX870702.s.om.10	(sp:Q5ZIJ0) BUD13 homolog OS=Gallus gallus GN=BUD13 PE=2 SV=1
tcbk0002.g.18	5	BX871421	BX871421.s.om.10	(sp:Q8K4T1) Alpha-2,8-sialyltransferase 8F OS=Mus musculus GN=St8sia6
tcbk0005.j.08	5	BX875132	BX875132.s.om.10	(sp:Q9BZ72) Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2 OS=Homo sapiens GN=PITPNM2 PE=1 SV=1
tcbk0005.l.14	5	BX876756	FYV30TN01A22HW.s.o m.10	(sp:Q02566) Myosin-6 OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
24 hours (5/6)				
tcbk0006.b.10	5	BX869229	BX869229.s.om.10	(sp:Q9ERE6) Myosin phosphatase Rho-interacting protein OS=Rattus norvegicus GN=Mrip1 PE=1 SV=1
tcbk0009.f.05	5	BX872297	BX872297.s.om.10	0
tcbk0012.g.07	5	BX877270	BX877270.s.om.10	(sp:Q9UK61) Uncharacterized protein C3orf63 OS=Homo sapiens GN=C3orf63 PE=1 SV=3
tcbk0016.m.02	5	BX870594	CB495977.s.om.10	[BBH] 2AAB_PIG (sp:P54613) Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (Fragment) OS=Sus scrofa GN=PPP2R1B PE=2 SV=1
tcbk0019.b.16	5	BX868909	BX877407.s.om.10	[BBH] TF2AY_MOUSE (sp:Q8R414) TFIIA-alpha and beta-like factor OS=Mus musculus GN=Gtf2a11 PE=2 SV=2
tcbk0021.a.06	5	BX870116	BX870116.s.om.10	(sp:Q9P2H3) Intraflagellar transport protein 80 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT80 PE=1 SV=2
tcbk0022.j.18	5	BX869848	BX869848.s.om.10	(sp:P45985) Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP2K4 PE=1 SV=1
tcbk0024.g.16	5	BX875281	BX875281.s.om.10	Salmo salar hypothetical protein LOC100194706 (LOC100194706), mRNA
tcbk0027.g.10	5	BX887625	BX887625.s.om.10	(sp:P57999) Zonadhesin (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=ZAN PE=2 SV=2
tcbk0027.o.14	5	BX888307	CX143447.s.om.10	(sp:Q5VYY2) Lipase member M OS=Homo sapiens GN=LIPM PE=2 SV=2
tcbk0028.h.02	5	BX888892	BX888892.s.om.10	(sp:A4IF62) DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 OS=Bos taurus GN=POLR3A PE=2 SV=1
tcbk0030.j.21	5	BX886380	CU071854.s.om.10	(sp:Q497V5) S1 RNA-binding domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Srbd1 PE=1 SV=2
tcbk0039.e.09	5	BX889913	BX876876.s.om.10	(sp:O77735) Secretory carrier-associated membrane protein 1 OS=Sus scrofa GN=SCAMP1 PE=2 SV=1
tcbk0040.b.08	5	BX887066	CA383211.s.om.10	(sp:P23219) Prostaglandin G/H synthase 1 OS=Homo sapiens GN=PTGS1 PE=1 SV=1
tcbk0042.h.08	5	BX888136	CF752808.s.om.10	(sp:P11021) 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
tcbk0047.p.09	5	BX886145	CA350443.s.om.10	[BBH] DDX21_HUMAN (sp:Q9NR30) Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 PE=1 SV=5
tcbk0048.a.02	5	BX886158	FP319847.s.om.10	(sp:Q2KJC9) Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase OS=Bos taurus GN=ALDH7A1 PE=2 SV=3
tcbk0048.p.10	5	BX884149	CA362730.s.om.10	(sp:Q03637) Acetylcholinesterase collagenic tail peptide OS=Torpedo marmorata PE=1 SV=1
tcbk0049.b.11	5	BX885803	BX319917.s.om.10	[BBH] GPDA_TAKRU (sp:O57656) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cytoplasmic OS=Takifugu rubripes GN=gpd1 PE=3 SV=1
tcbk0051.o.20	5	BX885165	BX885165.s.om.10	(sp:Q5R5E8) Serine protease hepsin OS=Pongo abeli GN=HPN PE=2 SV=1
tcbk0055.j.12	5	BX881479	BX304160.s.om.10	(sp:O43715) TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1 OS=Homo sapiens GN=TRIP1 PE=1 SV=1
tcbk0058.c.02	5	BX879961	BX909843.s.om.10	(sp:Q80XI3) Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Mus musculus GN=Eif4g3 PE=1 SV=2
tcbk0058.m.12	5	BX882038	BX300176.s.om.10	(sp:P50157) T-complex protein 1 subunit alpha (Fragment) OS=Ambystoma mexicanum PE=2 SV=1
IRT161B10_D_A05	5	CA382574	CA367546.s.om.10	[BBH] THIM_RAT (sp:P13437) 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=1 SV=1
IRT29E12_C_C06	5	CA372174	CA372174.s.om.10	[BBH] RYR3_HUMAN (sp:Q15413) Ryanodine receptor 3 OS=Homo sapiens GN=RYR3 PE=1 SV=2
IRT47H23_B_D12	5	CA379528	CA379528.s.om.10	(sp:Q86UW6) NEDD4-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=N4BP2 PE=1 SV=2
IRT48M14_C_G07	5	CA379712	CA372491.s.om.10	(sp:O70277) Tripartite motif-containing protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Trim3 PE=1 SV=1
IRT50C19_A_B10	5	CA380474	AB010741.s.om.10	(sp:Q66JF1) Transcription factor Sox-11 OS=Xenopus tropicalis GN=sox11 PE=2 SV=1
IRT51B19_B_A10	5	CA380610	CA380610.s.om.10	(sp:Q86YS7) Uncharacterized protein KIAA0528 OS=Homo sapiens GN=KIAA0528 PE=1 SV=1
IRT51H11_B_D06	5	CA380637	FP321301.s.om.10	(sp:Q2YDM1) ADP-ribosylation factor-like protein 1 OS=Bos taurus GN=ARL1 PE=2 SV=1
IRT52A16_C_A08	5	CA380919	CA380919.s.om.10	(sp:O08688) Calpain-5 OS=Mus musculus GN=Capn5 PE=2 SV=1
IRT54N16_D_G08	5	CA351112	CA351112.s.om.10	[BBH] RT18A_MOUSE (sp:Q99N85) 28S ribosomal protein S18a, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mtprs18a PE=2 SV=1
IRT55C08_C_B04	5	CA381320	CA345946.s.om.10	[BBH] CHERP_HUMAN (sp:Q8IWX8) Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=CHERP PE=1 SV=2
IRT56H17_B_D09	5	CA351661	CA351661.s.om.10	(sp:P57776) Elongation factor 1-delta OS=Mus musculus GN=Eef1d PE=1 SV=3
IRT57H13_B_D07	5	CA381590	BX311341.s.om.10	(sp:Q9Z252) Protein lin-7 homolog B OS=Rattus norvegicus GN=Lin7b PE=1 SV=1
IRT58D06_D_B03	5	CA351928	BX297512.s.om.10	[BBH] ARP6_HUMAN (sp:Q9GZ11) Actin-related protein 6 OS=Homo sapiens GN=ACTR6 PE=1 SV=1

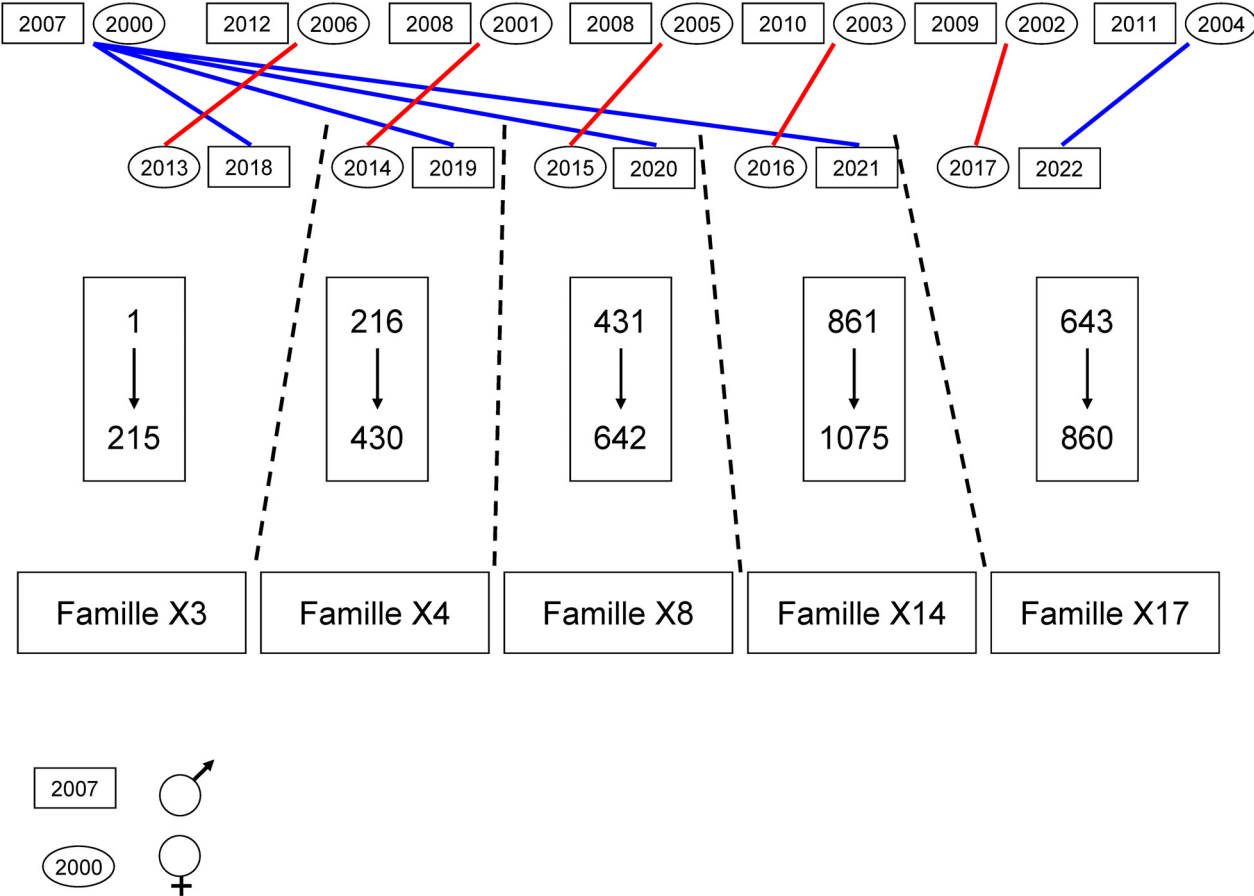
clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
24 hours (6/6)				
IRT58E08_C_C04	5	CA351852	CA351852.s.om.10	[BBH] AGTR2_HUMAN (sp:P50052) Type-2 angiotensin II receptor OS=Homo sapiens GN=AGTR2 PE=1 SV=1
IRT58L18_D_F09	5	CA351977	CA370348.s.om.10	[BBH] SELW_DANRE (sp:Q568W0) Selenoprotein W OS=Danio rerio GN=sepw1 PE=2 SV=3
IRT73G14_C_D07	5	CA344034	CA344034.s.om.10	[BBH] NCOA7_MOUSE (sp:Q6DFV7) Nuclear receptor coactivator 7 OS=Mus musculus GN=Ncoa7 PE=2 SV=2
tcad0003.n.22	5	BX075396	BX074021.s.om.10	(sp:Q10835) Collagenase 3 (Fragment) OS=Xenopus laevis GN=mmp13 PE=2 SV=1
tcav0004.i.17	5	BX088440	BX088440.s.om.10	(sp:Q4QQT2) Protein FAM118B OS=Rattus norvegicus GN=Fam118b PE=2 SV=1
tcay0017.b.05	5	BX307075	BX307075.s.om.10	(sp:Q97583) Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2 OS=Bos taurus GN=NDST2 PE=2 SV=1
tcay0022.h.20	5	BX310336	BX310336.s.om.10	0
tcbk0020.d.02	5	BX870212	BX870212.s.om.10	(sp:Q568A0) PRKR-interacting protein 1 homolog OS=Danio rerio GN=prkrip1 PE=2 SV=1
tcce0002.d.10	5	CU071188	CA355061.s.om.10	(sp:Q9BXJ9) NMDA receptor-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=NARG1 PE=1 SV=1
tcce0003.b.09	5	CU068255	CU068255.s.om.10	(sp:Q9Y226) Solute carrier family 22 member 13 OS=Homo sapiens GN=SLC22A13 PE=2 SV=2
tcce0020.d.16	5	CU072142	CU072142.s.om.10	0
tcce0020.f.23	5	CU072358	CU072358.s.om.10	Salmo salar C-C chemokine receptor type 3 (ccr3), mRNA
tcce0022.c.24	5	CU072978	CU072978.s.om.10	0
tcce0016c.c.09	5	CU068166	CA350710.s.om.10	(sp:Q6PDC8) Major facilitator superfamily domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Mfsd4 PE=2 SV=2
IRT160L20_D_F10	5			
tcce0002d.p.14	5	CU071260	CU071260.s.om.10	Salmo salar Alkaline phosphatase (ppb), mRNA
tcab0001.a.21	5	BX080748	CA346457.s.om.10	0
tcce0004.g.15	5	CU068098	CA379061.s.om.10	0
tcce0004.j.06	5	CU068836	CU068836.s.om.10	Oncorhynchus mykiss Rhcg1-a (LOC100136341), mRNA
tcce0004.k.06	5	CU069569	CU069569.s.om.10	0
tcce0004.l.04	5	CU070479	CU070479.s.om.10	0
tcce0004.n.08	5	CU070982	BX317580.s.om.10	0
tcce0005.i.01	5	CU070682	BX300744.s.om.10	(sp:P11607) Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Sus scrofa GN=ATP2A2 PE=2 SV=1
tcce0005.l.24	5	CU067394	CA364777.s.om.10	(sp:Q8IWT3) Cullin-9 OS=Homo sapiens GN=CUL9 PE=1 SV=2
tcce0006.g.19	5	CU068805	AJ417832.s.om.10	[BBH] CSF11_TAKRU (sp:P79750) Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor 1 OS=Takifugu rubripes GN=csf1r1 PE=3 SV=1
tcce0006.j.10	5	CU068631	CA375433.s.om.10	Salmo salar Ammonium transporter Rh type B (rhbg), mRNA
tcce0006.l.04	5	CU068027	CU068027.s.om.10	Salmo salar FUS-interacting serine-arginine-rich protein 1 (fusip), mRNA
tcce0007.k.14	5	CU068141	BX302565.s.om.10	(sp:P13272) Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Bos taurus GN=UQCRFS1 PE=1 SV=3
tcce0011.j.17	5	CU067588	BX073237.s.om.10	Salmo salar Serine/threonine-protein kinase Sgk2 (sgk2), mRNA
tcce0018.b.06	5	CU071497	CU071497.s.om.10	0
tcce0019.d.16	5	CU071734	CU071734.s.om.10	(sp:Q8VBT1) Beta-taxilin OS=Mus musculus GN=Txlnb PE=2 SV=2
tcce0019.f.03	5	CU072009	CU072009.s.om.10	0
tcce0020.l.07	5	CU072131	CU072131.s.om.10	(sp:Q9NZM5) Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein OS=Homo sapiens GN=GLTSCR2 PE=1 SV=2
TCCE0018c.C.23	5	CU071438	CU071438.s.om.10	Oncorhynchus mykiss SoxP1 (LOC100136292), mRNA
tcad0008.o.20	5	CU068468	CA371475.s.om.10	(sp:Q92072) DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 OS=Gallus gallus GN=DNMT1 PE=1 SV=1
tcbk0061.a.04	5	BX880945	CB491523.s.om.10	(sp:P98164) Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRP2 PE=1 SV=3
tcbk0061.a.10	5	BX879687	BX879687.s.om.10	(sp:Q6DRL5) Myb-binding protein 1A-like protein OS=Danio rerio GN=mybbp1a PE=1 SV=1
tcbk0061.b.13	5	BX881541	BX881541.s.om.10	[BBH] PPM1E_MOUSE (sp:Q80TL0) Protein phosphatase 1E OS=Mus musculus GN=Ppm1e PE=1 SV=2
tcbk0061.p.16	5	BX881542	BX869369.s.om.10	0
48 hours (1/2)				
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcay0027.f.19	0	BX313510	BX313509.s.om.10	[BBH] PPR1B_BOVIN (sp:P07516) Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B OS=Bos taurus GN=PPR1B PE=1 SV=1
tcay0033.a.08	0	BX317005	BX317005.s.om.10	(sp:Q75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcce0003.o.17	0	CU070136	CU070136.s.om.10	[BBH] NHRF3_RAT (sp:Q9JJ40) Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdzk1 PE=1 SV=2

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
48 hours (2/2)				
tcee0004.j.04	0	CU066754	BX082871.s.om.10	(sp:Q6P819) Cell differentiation protein RCD1 homolog OS=Xenopus tropicalis GN=rqcd1 PE=2 SV=1
tcee0004.p.08	0	CU066753	CX030763.s.om.10	(sp:Q6BEA2) Serine protease 27 OS=Rattus norvegicus GN=Prss27 PE=2 SV=1
1RT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
4 days				
1RT93D06_D_B03	0	CA346182	CA342041.s.om.10	[BBH] HBB4_ONCMY (sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.a.15	0	CT962636	CT962636.s.om.10	(sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tca0001.g.09	0	CT962927	CT962927.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcay0003.p.11	0	BX297901	BX297900.s.om.10	(sp:Q15828) Cystatin-M OS=Homo sapiens GN=CST6 PE=1 SV=1
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcay0033.a.08	0	BX317005	BX317005.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcee0015.l21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcee0004.n.08	5	CU070982	BX317580.s.om.10	0
tcay0019.b.04	5	BX309771	BX309770.s.om.10	[BBH] CX065_BOVIN (sp:Q32LJ3) Uncharacterized protein CXorf65 homolog OS=Bos taurus PE=2 SV=1
tcba0014.c.14	5	BX863437	CA350243.s.om.10	(sp:Q9D2Y9) Elongation of very long chain fatty acids protein 7 OS=Mus musculus GN=Elavl7 PE=2 SV=1
tcee0006.k.22	5	CU068035	CU068035.s.om.10	(sp:Q80SW1) Putative adenosylhomocysteinase 2 OS=Mus musculus GN=Ahcy11 PE=1 SV=1
tcee0014.a.12	5	CU067976	CU067976.s.om.10	Oncorhynchus mykiss carbonic anhydrase-related protein (car8), mRNA
tcee0014.a.16	5	CU068701	CA345142.s.om.10	[BBH] ZBT12_HUMAN (sp:Q9Y330) Zinc finger and BTB domain-containing protein 12 OS=Homo sapiens GN=ZBTB12 PE=1 SV=1
tcee0014.k.06	5	CU068640	CA342211.s.om.10	(sp:P70083) Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS=Makaira nigricans GN=atp2a1 PE=2 SV=2
11 days				
1RT120G22_C_D11	0	CA362233	CU069974.s.om.10	Oncorhynchus mykiss toxin-1 (LOC100135970), mRNA
1RT149K02_C_F01	0	CA350801	CA348639.s.om.10	(sp:Q9WU45) Chloride channel protein 2 OS=Cavia porcellus GN=CLCN2 PE=2 SV=1
1RT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
1RT79D04_D_B02	0	CA355095	CA355095.s.om.10	[BBH] CRVP1_ENHPO (sp:Q2XXQ3) Cysteine-rich secretory protein ENH1 OS=Enhydryis polylepsis PE=2 SV=1
tcac0006.b.03	0	BX084907	U83980.s.om.10	[BBH] COX6A_ONCMY (sp:O13085) Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcab0002.k.12	0	CT962667	FYV3OTN01BVNEO.s.o m.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcay0026.g.05	0	BX313035	BX313035.s.om.10	(sp:O75897) Sulfotransferase 1C4 OS=Homo sapiens GN=SULT1C4 PE=1 SV=2
tcay0030.j.21	0	BX316785	BX073791.s.om.10	(sp:P30042) ES1 protein homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C21orf33 PE=1 SV=3
1RT148G11_A_D06	0	CU069663	CU069663.s.om.10	(sp:Q68FL4) Putative adenosylhomocysteinase 3 OS=Mus musculus GN=Ahcy12 PE=1 SV=1
tcee0015.l21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
1RT129G21_A_D11	0			
tcbk0016.d.04	0	BX871706	BX304275.s.om.10	[BBH] RAB19_MOUSE (sp:P35294) Ras-related protein Rab-19 OS=Mus musculus GN=Rab19 PE=2 SV=3
1RT106F19_B_C10	5	CA366003	CA367318.s.om.10	(sp:Q6WG18) Sulfotransferase 6B1 OS=Pan troglodytes GN=SULT6B1 PE=3 SV=2
1RT156N09_B_G05	5	CA387116	CA351758.s.om.10	(sp:Q99PV0) Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Mus musculus GN=Prpf8 PE=1 SV=2
tcac0002.k.18	5	BX082593	CU070871.s.om.10	Oncorhynchus mykiss Coronin-1C (cor1c), mRNA

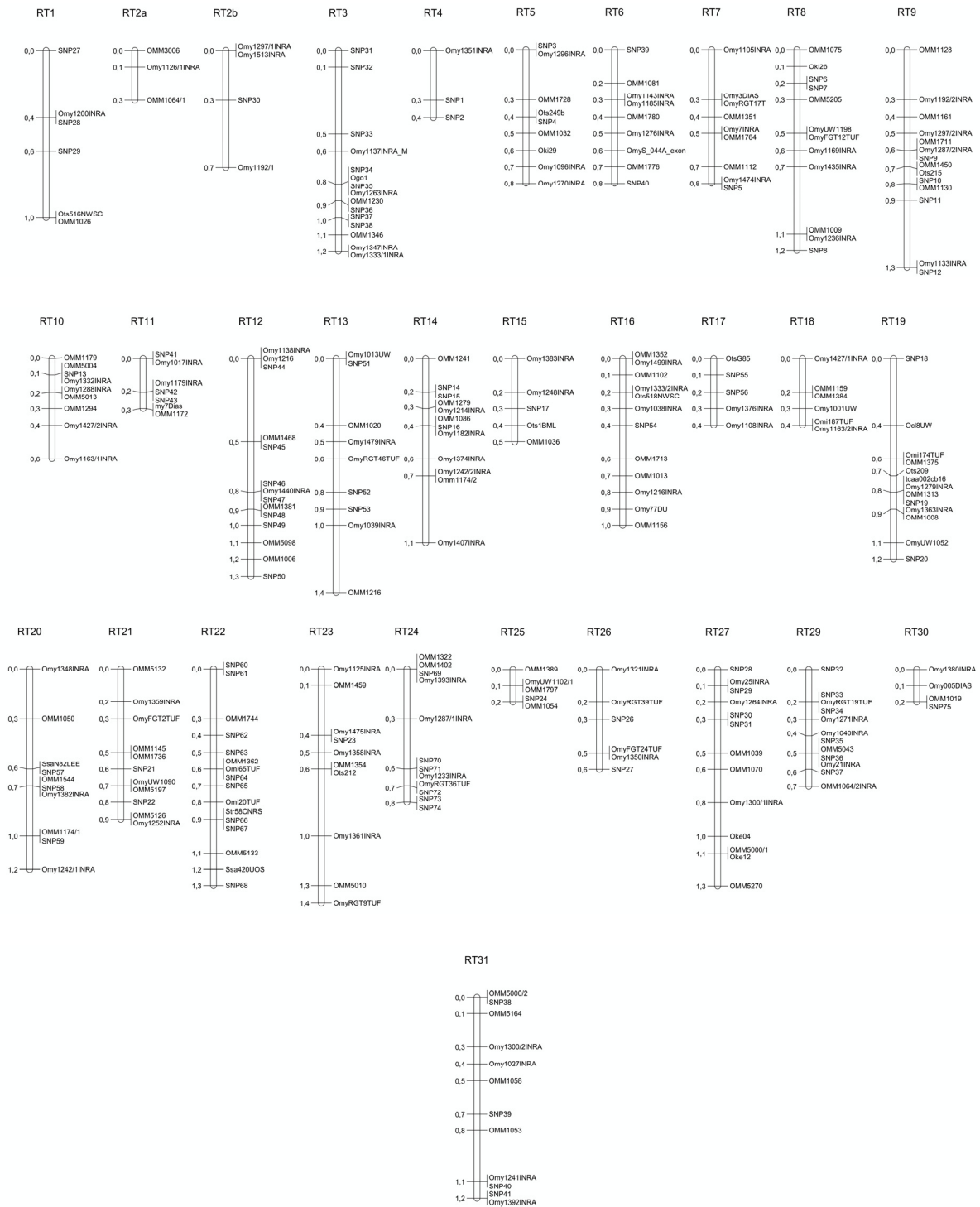
clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
11 days (3/3)				
tcad0001.f22	5	3 contig differents		
tcad0001.g.06	5	BX073907	AF115522.s.om.10	NP544030 GB AF115522.1 AAD53019.1 MHC class I heavy chain precursor [Oncorhynchus mykiss]
tcay0031.b.01	5	BX315485	CU066433.s.om.10	(sp:Q8N8N0) RING finger protein 152 OS=Homo sapiens GN=RNF152 PE=2 SV=1
tcbk0017.j.01	5	BX873204	CX246972.s.om.10	[BBH] FITM1_DANRE (sp:Q5CZ0) Fat storage-inducing transmembrane protein 1 OS=Danio rerio GN=fitm1 PE=2 SV=1
tcbk0051.k.09	5	BX889699	BX073797.s.om.10	(sp:P06730) Eukaryotic translation initiation factor 4E OS=Homo sapiens GN=EIF4E PE=1 SV=2
tcbk0055.c.17	5	BX883002	BX883002.s.om.10	(sp:P11799) Myosin light chain kinase, smooth muscle OS=Gallus gallus PE=1 SV=2
tce0004.c.19	5	CU070598	CU070598.s.om.10	0
TCCE0008.P.18	5	CU069646		0
tcay0003.p.13	5	CU074546	CA362148.s.om.10	[BBH] SPAG8_HUMAN (sp:Q99932) Sperm-associated antigen 8 OS=Homo sapiens GN=SPAG8 PE=1 SV=2
tcay0037.f.03	5	BX320526	CA371676.s.om.10	(sp:P07339) Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1
23 days (1/3)				
IRT129L03_B_F02	0	CA383772	CA383772.s.om.10	[BBH] AR6P1_PONAB (sp:Q5R454) ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1 OS=Pongo abelii GN=ARL6IP1 PE=2 SV=1
IRT66C18_C_B09	0	CA364502	CA358273.s.om.10	(sp:Q9YH26) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Oreochromis mossambicus GN=atp1a1 PE=2 SV=2
tcac0006.b.03	0	BX084907	U83980.s.om.10	[BBH] COX6A_ONCMY (sp:O13085) Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial OS=Oncorhynchus mykiss PE=3 SV=1
tcag0002.a.15	0	CT962636	CT962636.s.om.10	(sp:P02141) Hemoglobin subunit beta-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb4 PE=1 SV=3
tcag0002.n.03	0	CT962587	AF059711.s.om.10	(sp:Q92109) Cytochrome P450 1A3 OS=Oncorhynchus mykiss GN=cyp1a3 PE=2 SV=2
tcai0001.a.01	0	CT962742	CB494976.s.om.10	PREDICTED: Danio rerio exportin 1-like (LOC100331410), mRNA
tcak0001.a.17	0	CU068508	CX136447.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcai0001.g.09	0	CT962927	CT962927.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcai0001.i.08	0	CT962881	CT962881.s.om.10	(sp:P14527) Hemoglobin subunit alpha-4 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hba4 PE=1 SV=1
tcai0001.k.08	0	CT962918	CA347919.s.om.10	[BBH] HBB1_ONCMY (sp:P02142) Hemoglobin subunit beta-1 OS=Oncorhynchus mykiss GN=hbb1 PE=1 SV=1
tcay0023.a.19	0	BX310198	BX310198.s.om.10	(sp:Q7T2V2) Cytosolic sulfotransferase 3 OS=Danio rerio GN=sult1st3 PE=1 SV=1
tcba0014.d.23	0	BX863016	BX299376.s.om.10	(sp:Q80X32) UPF0461 protein C5orf24 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=1
tce0003.k.09	0	CU070569	CU070569.s.om.10	0
tce0015.l21	0	CU069536	CA383196.s.om.10	(sp:Q7ZUS4) Cytosolic sulfotransferase 2 OS=Danio rerio GN=sult1st2 PE=1 SV=1
tcai0001.o.16	0			
IRT124J24_D_E12	5	CA341588	CA341588.s.om.10	[BBH] DEPD5_HUMAN (sp:O75140) DEP domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=DEPDC5 PE=2 SV=1
IRT24F23_B_C12	5	CA383515	CU071287.s.om.10	Salmo salar Acyl-coenzyme A thioesterase 5 (acot5), mRNA
tcak0001.e.11	5	CT962797	BX081014.s.om.10	[BBH] ANM1_XENTR (sp:Q28F07) Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Xenopus tropicalis GN=prmt1 PE=2 SV=1
tcak0001.i.19	5	CU069656	CA357671.s.om.10	(sp:A0JP85) CCR4-NOT transcription complex subunit 1 OS=Xenopus tropicalis GN=cnot1 PE=2 SV=1
tcam0001.f.15	5	CT962989	CT962989.s.om.10	(sp:P06813) Calpain small subunit 1 OS=Oryctolagus cuniculus GN=CAPNS1 PE=1 SV=1
tcay0008.f.19	5	BX301535	BX301535.s.om.10	(sp:Q99P82) Claudin-11 OS=Rattus norvegicus GN=Cldn11 PE=1 SV=1
tcay0022.l.06	5	BX309863	BX309862.s.om.10	(sp:Q5ZK55) Apolipoprotein O-like OS=Gallus gallus GN=APOOL PE=2 SV=1
tcay0025.l.22	5	BX312548	CA368787.s.om.10	[BBH] RPAC2_XENLA (sp:Q5XK67) DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2 OS=Xenopus laevis GN=polr1d PE=3 SV=1
tcay0032.n.06	5	BX317898	BX317898.s.om.10	(sp:Q5RFH0) ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Pongo abelii GN=ATP5L PE=3 SV=1
tcba0027.i.19	5	BX868512	BX868512.s.om.10	(sp:P37285) Kinesin light chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klc1 PE=2 SV=2
tcba0027.j.04	5	BX868517	BX868517.s.om.10	(sp:O14495) Lipid phosphate phosphohydrolase 3 OS=Homo sapiens GN=PPAP2B PE=1 SV=1
tcba0030.a.02	5	BX865955	CA359355.s.om.10	(sp:P03934) Transposable element Tc1 transposase OS=Caenorhabditis elegans GN=tc1a PE=3 SV=1
tcbk0018.g.18	5	BX869100	CA358797.s.om.10	[BBH] IPYR_MACFA (sp:Q4R543) Inorganic pyrophosphatase OS=Macaca fascicularis GN=PPA1 PE=2 SV=2

clone name	FDR	number accession	contig Sigenae	Description (assemblage s.om.10 Sigenae)
23 days (2/3)				
tcbk0018.h.03	5	BX869108	BX298534.s.om.10	(sp:P82179) Triadin OS=Canis familiaris GN=TRDN PE=1 SV=2
tcbk0018.h.17	5	BX877520	BX877520.s.om.10	(sp:Q9EQY0) Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1 OS=Mus musculus GN=Ern1 PE=2 SV=1
tcbk0025.c.19	5	BX873534	BX873534.s.om.10	(sp:Q1AGS6) Hemoglobin subunit beta-2 OS=Boreogadus saida GN=hbb2 PE=1 SV=3
tcbk0031.f.11	5	BX886388	BX886388.s.om.10	(sp:Q8NEZ4) Histone-lysine N-methyltransferase MLL3 OS=Homo sapiens GN=MLL3 PE=1 SV=3
IRT97L06_D_F03	5	CU070089	BX315635.s.om.10	Salmo salar Transmembrane protein 180 (tm180), mRNA
23 days (3/3)				
IRT124E01_A_C01	5	CU068092	CU068092.s.om.10	Salmo salar Churchill protein (chur), mRNA
IRT82I20_C_E10	5	CA355701	CA355701.s.om.10	(sp:Q8VCX1) 3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Akr1d1 PE=2 SV=1
tcak0001.g.07	5	CU074520	CA364316.s.om.10	[BBH] RS15A_RAT (sp:P62246) 40S ribosomal protein S15a OS=Rattus norvegicus GN=Rps15a PE=1 SV=2

Généalogie complète du protocole QTL / eQTL des chapitres III et IV. Sont présentés les numéros d'identifiants des individus et leurs familles d'appartenance.



Carte génétique utilisée dans les chapitres III et IV pour la détection de QTL.



Protocoles utilisés

-Extraction d'ARN

-Rétro-transcription

-Normalisation pour la RT-PCRq

-Analyse de l'expression de gènes via l'utilisation de puces à ADN AGILENT

-Dosage RIA du cortisol plasmatique

Extraction ARN

Attention : porter des gants et travailler à 0°C (pour inhiber RNase)

Principe

Cette technique permet d'extraire les ARN totaux à partir de culture de cellules eucaryotes et procaryotes ou d'organes prélevés sur des animaux de laboratoire. Le rapport poids de l'organe/ volume de trizol nécessaire à l'extraction n'est là qu'à titre indicatif. En effet, suivant la richesse de l'organe en RNAses, en protéines (vitellogénine, mucus...), ou en ADN (testicule), les volumes d'extraction doivent être préalablement optimisés.

Les ARN totaux extraits à l'aide de cette technique peuvent être utilisés pour des Northern blot, pour la sélection d'ARN poly A+, pour des expériences de traduction in vitro, pour la rétro-transcription, ou pour le marquage.

Cette technique d'extraction et de purification de l'ARN total est basée sur la technique dite de Chomczynski (Chomczynski P. and Sacchi N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159). Les organes sont broyés dans la solution de Trizol contenant de l'isothiocyanate de guanidium (inhibiteur des RNAses), du phénol (solvant organique capable de solubiliser les protéines), et de l'acétate de sodium (permet de précipiter les acides nucléiques lors des étapes ultérieures). Après addition de chloroforme, les échantillons sont centrifugés afin de séparer les protéines (phase organique inférieure) et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (interphase) de l'ARN total (phase aqueuse supérieure). La phase aqueuse est extraite puis les ARN totaux sont reconcentrés par précipitation alcoolique classique.

Réactifs utilisés, préparations et stockage :

Il est difficile d'éliminer l'activité RNase. C'est pourquoi, il est nécessaire de porter des gants jetables tout au long de la procédure de préparation des solutions et d'extraction des ARN totaux. Eviter également toute contamination microbienne en utilisant du matériel et des solutions préalablement stérilisées (140°C, 40 min., 1 bar). Si nécessaire, le matériel plastique doit être décontaminé au moins 10 min. dans 0.5 M NaOH et le matériel en verre doit être pasteurisé (150°C, pendant 4 heures).

- ❖ Trizol (Gibco BRL, Cat No 15596): produit prêt à l'emploi, stockage à 4°C pendant 12 mois.
- ❖ Eau traitée DEPC stérile: Ajouter le Diethyl Pyrocarbonate (DEPC: Sigma Cat No D5758) dans l'eau distillée à raison de 10/100 (**ATTENTION** travailler sous la hotte car le DEPC est explosif), bien mélanger, laisser incuber une nuit sous agitation puis autoclaver la solution (cycle 140 °C, 40 min., 1 bar) pour éliminer le DEPC.
- ❖ Isopropanol : prêt à l'emploi, stockage à température ambiante
- ❖ Alcool à 70%: stockage à température ambiante
- ❖ RNAsin (Promega, Cat No N2111) : prêt à l'emploi, stockage à - 20°C.
- ❖ Eau ultrapure (RNase et DNase free)

Matériels :

Autoclave (AVX 130.E, SNI, Montpellier, France)
 Centrifugeuse (Sigma, 3K10)
 Broyeur (Kika Labortechnik, Ultra Turax T8) diamètre 5 mm ou 8mm
 Balance (Sartorius, L2200 P)
 Tubes Falcon de 50 mL
 Tubes Nalgène de 10 (code 3119-0010) ou 30ml (code 3119-0030) à stériliser
 Tubes Eppendorf 1.5 ml stériles
 Tubes eppendorf 2 ml stériles Rnase/Dnase free
 Tubes bactério 16 ml Sarstedt ref : 62515006
 Pointes de 200 et 1000 µl stériles
 Glace

Mode opératoire**Prélèvement et stockage des tissus**

Les tissus d'intérêt sont rapidement prélevés, sectionnés en morceaux de quelques millimètres de diamètre et congelés dans l'azote liquide.

Broyage (sous hotte, avec des gants)

1. La veille : Nettoyer la sonde du broyeur (TDF4, éthanol puis eau distillée) et la placer dans de l'eau oxygénée-DEPC (5mL eau oxygénée+25mL d'eau DEPC). Laisser toute une nuit. Préparer les bains d'eau DEPC (3 bains par échantillons +1 au début et à la fin) environ 25mL dans des falcons de 50mL. Stériliser une pince (la laisser tremper dans de l'alcool toute une nuit).
2. Rincer abondamment la sonde dans trois bains successifs d'eau DEPC (environ 25mL), mettre la sonde en marche et la laisser tourner dans les bains pour bien la rincer.
3. Sous une hotte, peser très rapidement la quantité de tissu désirée dans un tube adapté en fonction de la quantité de trizol utilisée. Attention, il faut aussi tenir compte de la place de la sonde dans le tube pour ne pas risquer de créer des projections de trizol. Au-delà de 15 mL de trizol, il vaut mieux faire deux extractions.

Pour des follicules de truites : tarer des tubes falcons de 50mL. Prélever avec une pince stérilisée à l'alcool le tissu d'intérêt et le peser dans le tube falcon.

Tube/volume de Trizol	< à 1 mL	1 à 3 mL	3 à 10 mL	10 à 15 mL
Eppendorf 2 mL	Sonde diamètre 5mm			
Falcon 50 mL		Sonde diamètre 8mm		

4. Ajouter **1 mL de trizol pour 100mg de tissu**. Le trizol est stocké à 4°C et doit être froid lorsqu'il est ajouté.
5. A température ambiante, sous une hotte, broyer le tissu pendant environ une minute en augmentant progressivement la vitesse de broyage. Aucun agrégat de tissu ne doit rester visible. Procéder rapidement pour éviter les réchauffements qui peuvent dégrader les ARNs. Toujours garder les tubes dans la glace. Pour de petites quantités d'organe (exemple, la gonade de truite avant la différenciation), le broyage s'effectue à l'aide d'une seringue à 65°C pendant 5 à 10 min.
6. Les tissus broyés sont aliquotés (1,6 ml dans des tubes eppendorf 2mL Rnase/Dnase free) et peuvent être stockés à -80°C.

Extraction ARN totaux (sous hotte, avec des gants)

Préalablement : réserver une hotte, les centrifugeuses.

Juste avant la manip : placer l'isopropanol à -20°C, faire refroidir les centrifugeuses.

1. Décongeler les tissus broyés (aliquots de 1,6mL) dans un bécher d'eau à T° ambiante.
 2. Laisser reposer 5 min à T° ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques.
 3. Ajouter 200 µL de chloroforme (sous la hotte)/ml de trizol utilisé. Utiliser une pipette en verre ou micropipette avec cône protégé (prendre ARN only, molecular biology tested).
 4. Mélanger vigoureusement à la main pendant 15 secondes (**NE PAS VORTEXER**)
 5. Incuber pendant 2 à 3 min à température ambiante. Laisser pendant 10 minutes pour des ovocytes entiers.
 6. Centrifuger 12 000g 15min à 4°C. Centrifuger pendant 30 minutes pour les ovocytes ou follicules entiers. Penser à refroidir la centrifugeuse en la faisant tourner avant.
 7. 3 phases :
 - phase aqueuse incolore = ARN (au-dessus)
 - interface = ADN+lipide
 - phase phénolique (en-dessous) rose = protéine
- Récupérer la phase aqueuse et la mettre dans un nouvel eppendorf (stérile). Pour éviter toute contamination avec l'ADN génomique, ne pas pipetter trop près de l'interphase. Sinon, dans le pire des cas, remettre tout dans l'eppendorf et recentrifuger. Attention aussi à prélever assez de la phase aqueuse sinon, il n'y aura pas assez d'ARN et pas de culot visible.
8. Ajouter 0,5 ml isopropyl éthanol/ml de trizol pour faire précipiter l'ARN. L'isopropanol est mis au froid (à -20°C) avant la manip et utiliser une pipette en verre.
 9. Mélanger vigoureusement et vortexer.
 10. Laisser à température ambiante pendant 10 min. Il est possible à ce stade de stocker les échantillons à -20°C au moins 30 minutes, cela facilitera la précipitation ultérieure.
 11. Mélanger vigoureusement et vortexer.
 12. Centrifuger à 12 000g pendant 15 min à 4°C. Centrifuger pendant 30 minutes pour les ovocytes entiers.
 13. Eliminer le surnageant en versant délicatement le tube, il y a alors un culot blanc opaque, assez compact d'ARN
 14. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 75% (environ 35mL d'éthanol absolu+50mL d'eau DEPC) /ml de trizol. Couler délicatement l'éthanol le long du tube pour ne pas casser le culot. Décoller le culot en inclinant ou secouant légèrement le tube, voire même vortexer rapidement si vraiment le culot ne se décolle pas.
 15. Centrifuger à 12000g pendant 10 min à 4°C. Centrifuger pendant 20 minutes pour les ovocytes ou follicules entiers.
 16. Eliminer le surnageant en versant délicatement le tube.
 17. Centrifuger en spot spin : monter à 5000g à 4°C puis stop.
 18. Sur paillasse, en condition RNase free, éliminer le reste d'éthanol avec une micropipette 200µL. Ne pas toucher le culot.
 19. Incliner les tubes la tête vers le bas et laisser sécher le culot pendant 5-10 minutes voire 30 min selon le cas. Surveiller que le culot ne s'assèche pas trop (il devient translucide) sinon la resuspension sera difficile.
 20. Dissoudre l'ARN dans un petit volume d'eau ultrapure (environ 50 µl pour 1mL de trizol). Déposer l'eau sur le culot.
 21. Laisser dissoudre les ARN dans cette eau quelques minutes.

22. Mélanger avec une micropipette par up and down et transférer dans un autre microtube eppendorf 1,7mL ou 0,5mL RNase free. Après resuspension, travailler sur glace pour ne pas dégrader les ARN.
23. Vortexer un peu les tubes (seule fois où les ARN sont vortexés) pour bien remettre en suspension et microcentrifuger.
24. Doser et vérifier la pureté des ARN au nanodrop après dilution au 1/10^{ième} généralement.
25. Ajouter 0,2µL de RNAsine (inhibiteur de RNAses) pour 100µL d'eau de suspension, agiter doucement le tube et microcentrifuger. Diluer préalablement la RNAsine au 10^{ième}.

Conditions de stockage des échantillons

Les échantillons d'ARN sont conservés repris dans l'eau à une concentration connue à -70°C ou précipités dans l'alcool à -20°C ou -80°C pour une longue durée.

Traitement et élimination des déchets

Le trizol, contenant du phénol, est éliminé comme le phénol. Il est donc transféré dans des bidons qui sont ensuite enlevés par l'Acomex.

L'isopropanol est récupéré dans un bidon pour l'Acomex.

Attention, chaque bidon ne contient qu'une sorte de produit et doit être étiqueté.

L'alcool peut être jeté à l'évier.

Hygiène et sécurité

Tout au long de la manipulation, il faut porter des gants, qu'il faudra changer régulièrement. Pour plusieurs raisons : d'une part à cause des RNAses que l'on a sur les doigts et qui pourraient dégrader les ARN, et d'autre part à cause du trizol qui contient du phénol et à cause du chloroforme.

La blouse est également de rigueur, surtout pour des éventuelles éclaboussures.

Tout le début de la manipulation se fera sous la hotte, ce n'est qu'à partir de la précipitation que l'on pourra aller sur une paillasse avec de la glace.

Retro-transcription

Principe :

A partir d'ARN extrait, de l'ADNc va être synthétisé. Il est préférable de travailler sur des ADNc que sur des ARNs car l'ADN est plus stable. Il est possible de réaliser la RT à l'aide de Random primers ou d'oligodT, les oligodT permettant d'identifier les ARNs polyadénylés.

Réactifs utilisés, préparations et stockage :

dNTP (10mM tot soit 2,5mM each)

Retro-transcriptase (MMLV modifiée de stratagene : AffinityScript multiple temperature reverse transcriptase, réf : 600105)

Tampon 10X (fourni avec l'enzyme)

DTT 10mM (fourni avec l'enzyme)

Rnasine

Random primers (PROMEGA, réf : C1181, 0.5µg/µl) ou oligodT(15) (PROMEGA)

H₂O milliQ récente ou H₂O PPI ("Eau pour Préparations Injectables" achetée en pharmacie).

Petits matériels et appareillages:

*Pipettes automatiques P10, P100, P1000 + cônes stériles correspondants

*Tubes 0.2 ml en barrettes de 8 (Applied Biosystems, réf. N 801-0580)

*Bouchons en barrettes de 8 pour tubes 0.2 ml (Applied Biosystems, réf. N 801-0535)

*Tubes 1.5 ml ou 500 µl

*Centrifugeuse, pouvant atteindre 14000 g.

*Thermocycleur (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 2400)

*Vortex

*Glace

Mode opératoire :

1. Tout décongeler dans la glace
2. Dans un tube, déposer 5 µg d'ARN, ajouter les randoms primers (300 ng, soit 0.6µL) ou les oligodT (500 ng) et l'eau.
3. Mélanger doucement (ne pas vortexer) et centrifuger
4. Dénaturer à 65°C pendant 5 minutes
5. Laisser refroidir à température ambiante environ 10 minutes
6. Préparer un mix avec le tampon, les dNTP, la Rnasine et l'enzyme de retro-transcription (à sortir le moins longtemps possible) dans un eppendorf 1,5 ml, compter un échantillon en plus (marge)

MIX pour un échantillon

Tampon (10X)	2 µl
DTT (100mM)	2 µl
dNTP (10mMtot)	0.8 µl
Rnasine	0.625µL
Enzyme (AffinityScript)	1µL
	6,425 µL

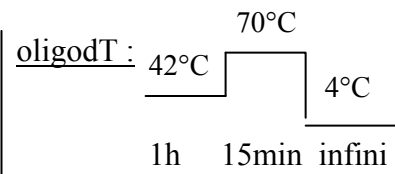
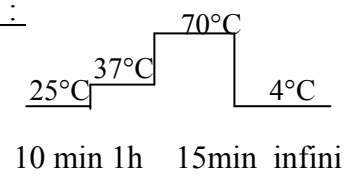
Préparer aussi un mix sans enzyme afin d'obtenir des échantillons RT-.

Le mix final doit être de 20µL (calculer le volume d'eau à ajouter de façon à ce que le volume final atteigne les 20µL).

7. Ajouter le mix. Vortexer et centrifuger.

07/11/2010

8. Incuber selon le protocole suivant :
Random primers :



9. stocker l'échantillon à -20°C

Normalisation des résultats de RT-PCRq

Définition de gènes de ménages internes :

Quand on veut valider des résultats de puces, le mieux, pour chercher des gènes de ménage, est d'en choisir plusieurs « internes » (de la puce) et un ou plusieurs « externes » (connus comme *ef1 α* , actine, 18S....).

Les gènes ménages internes sont déterminés lors de l'analyse statistique de la puce. Au lieu de choisir les gènes les plus différenciellement exprimés entre nos deux condition (p-value<0.01 par exemple), on va prendre les moins différenciellement exprimés (p-value>0.99, ou 0.999 ou plus si trop de gènes sortent).

Utilisation de plusieurs gènes ménages :

Si l'on détermine ainsi plusieurs gènes ménages, on choisira, par exemple, 5 gènes ménages « internes » et deux « externes ». Le choix se fera en sélectionnant ceux pour lesquels on disposera des meilleurs couples d'oligos (sur 10 gènes ménages « internes », on prendra les 5 meilleurs design d'oligos).

Il s'agit ensuite de tester les primers en passant une gamme en QPCR pour chaque gène ménage. On retiendra alors les gènes ménages qui se comportent le mieux (par exemple 2 ménages « internes » et un « externe »).

Une fois les QPCR réalisées sur les gènes cibles et les ménages, on peut déterminer le classement des gènes ménages en fonctions de leur stabilité d'expression relative ainsi que le nombre optimal de gènes ménages à utiliser pour la normalisation. Pour cela, utilisez le logiciel GeNorm (qui est en fait une macro Excel disponible dans la rubrique logiciel).

La normalisation utilisant plusieurs gènes ménages est particulière. En effet, il ne faut pas se contenter de faire une moyenne arithmétique standard des expressions de nos gènes ménages. Il faut faire une moyenne géométrique :

$$\sqrt{(X_a * Y_a)}$$

ou X_a est la valeur d'expression du gène ménage X pour l'individu a, et Y_a du gène Y.

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 1 sur 7

Low RNA Input Linear Amplification Kit, PLUS, One-Color.

Ce kit permet d'obtenir des cibles d'ARNc marquées à partir de 350ng d'ARN total.

Réf : 5188-5339

One-Color RNA Spike-In Kit.

Réf : 5188-5282

QIAGEN Rneasy Mini kit.

Réf : 74104

Gene Expression Hybridization Kit.

Réf: 5188-5242

Gene expression Wash Buffer 1 et 2.

Réf : 5188-5325 et 5188-5326

CONSERVATION ET STOCKAGE

Le kit de marquage est conservé à – 20°C.

Le kit de Spike-In est conservé à -80°C.

Les cyanines sont conservées à 4°C.

Le kit d'hybridation et les wash buffers sont conservés à TA.

MATERIEL NECESSAIRE

- bains-marie
- thermocycleur
- pipettes de précision
- tubes 1,5 ml RNase-free avec bouchon à vis

CONDITIONS SUR LE MATERIEL BIOLOGIQUE

La qualité des ARN est au préalable évaluée

- par le RIN (RNA Integrity Number) qui doit être supérieur à 9 dans le cas de lignées cellulaires et supérieur à 8 dans le cas de tissus.
- par le ratio 28S/18S > ou = à 1,8 (Agilent).
- par le ratio DO 260/280 nm > 1,8.
- par le ratio DO260/230 nm le plus élevé possible (proche de 2).

PREPARATIFS

- Ajuster la concentration des échantillons d'ARN à 100 ng/ μ l.
- Nettoyer la paillasse avec la solution de RNAZap puis rincer à l'éthanol.

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 2 sur 7

PRECAUTIONS

- Utiliser des gants sans talc et en changer fréquemment.
- Toujours décongeler les ARN sur glace.
- Conserver les ARN dans la glace pendant la manip.
- Les cyanines ainsi que les échantillons marqués doivent être protégés de la lumière.
- Utiliser toujours de l'eau RNase free.

PROTOCOLE

Faire chauffer les bains-marie à 37°C, 40°C et 65°C.
Faire chauffer le thermocycleur à 80°C.

1- Préparation du Mix de Spike.

Vortexer vigoureusement la solution stock de spikes.

Chauffer à 37°C pendant 5 min. Revortexer et spiner.

Diluer comme suit la solution de spike (vortex + spin entre chaque dilution).

- Dilution au 1/20 : 2µl de solution stock + 38µl de dilution buffer (DB).
- Dilution au 1/25 : 2µl de la dilution au 1/20 + 48µl de DB.
- Dilution au 1/10 : 4µl de la dilution au 1/25 + 36µl de DB.

*Remarque : La première dilution peut-être conservée à -80°C jusqu'à 2 mois.
Les deux autres dilutions doivent être jetées.*

2- Préparation des Echantillons

Décongeler les ARN sur la glace.

Reprendre au NanoDrop la DO des dilutions des ARN en duplicata puis les moyenner afin de déterminer le volume à pipetter pour avoir précisément 350ng. Préparer le volume exact préalablement à la manipulation.

Ajouter 3,5µl de la dilution finale de Spike.

Ajouter 1,2µl de T7 promoteur et ajuster le volume à 11,5 avec de l'eau RNase free.

Décongeler eau, DTT, Oligos T7, dNTP, 5X first strand buffer (portoir bleu). Vortexer les tubes puis faire une brève centrifugation (spin) et laisser à t° ambiante.

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 3 sur 7

3- Synthèse de l'ADNc double brin

Chauffer le Buffer 5X pendant 4min à 80 °C. Vortex et spin pendant la dénaturation des échantillons.

Attendre 1' pour redescendre à T° Ambiante (ne pas mettre dans la glace).

Etape 1	Dénaturation	10 min à 65°C
Etape 2	Cool	5 min au minimum sur glace
Etape 3	Spin	20 sec à T° ambiante

Placer les tubes dans la glace.

Agiter et centrifuger quelques secondes tous les réactifs à **T° ambiante**.

Sortir au dernier moment les enzymes sur la glace ou le bloc réfrigérant. Les homogénéiser par pipetage « up and down » et prélever avec un autre cône.

Préparer le mix à **T° ambiante**.

cDNA Master Mix	Volumes en µl pour 1 réaction
5X First Strand Buffer	4
0,1 DTT	2
10mM NTP	1
MMLV RT (4°C)	1
RNAse OUT (4°C)	0,5
Volume total	8,5

Etape 4	Ajout du cDNA Master Mix	8,5µl par tube, bien homogénéiser
---------	--------------------------	-----------------------------------

Etape 5	Incubation	2 h à 40 °C dans un bain-marie
---------	------------	---------------------------------------

Au terme des 2 heures d'incubation, décongeler, à T° ambiante, la Cyanine 3 et les différents réactifs : Eau, DTT, 4X transcription buffer, NTP mix, PEG 50%.

Etape 6	Dénaturation	10 min à 65°C
Etape 7	Cool	5 min au minimum sur glace
Etape 8	Spin	20 sec à T° ambiante

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 4 sur 7

4- Synthèse de l'ARNc marqué

Etape 9	Ajout de Cyanine 3	2,4µl par tube - <i>Vortex/Spin de la Cyanine</i> - <i>Déposer d'un côté du tube et rincer le cône par up/down de l'autre côté.</i>
---------	--------------------	---

Chauffer le PEG 1 min à 40°C. Vortexer et laisser à T° ambiante.

Agiter et centrifuger quelques secondes tous les réactifs à **T° ambiante**.
Sortir au dernier moment les enzymes sur la glace ou le bloc réfrigérant. Les homogénéiser par pipetage « up and down » et prélever avec un autre cône.

Préparer le mix de Transcription.

Transcription Master Mix	Volumes en µl pour 1 réaction
Nuclease free water	15,3
4X transcription buffer	20
0,1 DTT	6
NTP mix	8
50% PEG	6,4
RNAse OUT (4°C)	0,5
Inorganique Pyrophosphatase (4°C)	0,6
T7 RN Polymerase (4°C)	0,8
Volume total	57,6

Etape 10	Ajout du Transcription Master Mix	57,6µl par tube, bien homogénéiser
----------	-----------------------------------	------------------------------------

Etape 11	Incubation	2 h à 40 °C dans un bain-marie
----------	------------	---------------------------------------

Congélation – 20 °C possible.

5- Purification de l'ARNc marqué

Remarque : séries de 10 échantillons au maximum.

1. Ajouter 20µl d'eau nucléase free pour avoir un volume final de 100 µl.
2. Ajouter 350µl de Tampon RLT et vortexer les tubes 5 à 10 sec, au fur et à mesure.

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 5 sur 7

3. Ajouter 250µl d'Ethanol pur (95 %) filtré, vortexer 2 à 3'' mais ne pas centrifuger pour éviter toute précipitation. À la fin de la série, vortexer à nouveau tous les tubes.
4. Transférer les 700µl sur une colonne. Procéder délicatement, au goutte-à-goutte, au centre de la colonne. Centrifuger à 4 °C à 13000 rpm pendant 30s.
5. Vérifier que la membrane est colorée puis jeter l'éluat.
6. Changer de tube collecteur et déposer 500µl de tampon RPE. Centrifuger à 4 °C à 13000 rpm pendant 30s.
7. Jeter l'éluat et ajouter 500 µl de RPE. Centrifuger à 4 °C – 13000 rpm pendant 30s.
8. Jeter l'éluat et centrifuger à 4 °C à 13000 rpm pendant 30s pour sécher la colonne.
9. Placer la colonne sur un tube RNase free de 1,5 ml (sans bouchon) et déposer 30µl d'eau au centre de la membrane. Attendre 1 min et centrifuger à 4 °C à 13000 rpm pendant 30s.
10. Transférer l'éluat dans un tube à vis.
11. Recommencer les étapes 9 à 10.

Doser les ARNs marqués au Nanodrop.

Préparer 30µl d'une dilution à 100ng/µl.

Doser les dilutions à 100ng/µl en double au Nanodrop et moyenner les concentrations.

Mesurer l'incorporation au Nanodrop. Vérifier que la mesure se situe entre 1 et 2 pmol/µl.

Congélation à – 20 °C.

6- Hybridation

Faire chauffer le thermomixer à 60 °C.

Mettre le Wash Buffer 2 à 37°C.

Eventuellement, préparer le 10X blocking Agent en ajoutant 500 ou 1250 ul d'eau au lyophilisat (suivant le kit d'hybridation). Vortexer doucement et chauffer à 37°C pendant 4 à 5 min. **Conservation à –20°C jusqu'à 2 mois.**

L'hybridation se fait à T° ambiante

Prévoir l'étape de dépôt vers 16 h.

1. Préparation des cibles

Préparer le mix de fragmentation comme suit en fonction du format utilisé :

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 6 sur 7

Format	1×(22,44,244)K	2×105K	4×44K	8×15K
Echantillon Cy3	1,5µg	1,5µg	1,65µg	600ng
10X Bloking Agent	50µl	25µl	11µl	5µl
Eau	qsp 240µl	Qsp 120µl	Qsp 52,8µl	24µl
Fragmentation Buffer	10µl	5µl	2,2µl	1µl
Total	250µl	125µl	55µl	25µl

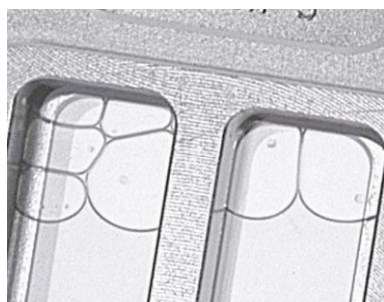
Incuber exactement 30 min à 60°C, à l'abri de la lumière.

Préparer le mix d'hybridation comme suit :

Format	1×(22,44)K	1×244K	2×105K	4×44K	8×15K
Echantillon Cy3 fragmenté	250µl	250µl	125µl	55µl	25µl
2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM		250µl	125µl	55µl	25µl
2X Hybridization Buffer	250µl				
Total	500µl	500µl	250µl	110µl	50µl

2. Dépôt sur la lame et montage de la chambre d'hybridation

- Déposer la backing slide sur le support de la chambre d'hybridation, joint vers le haut (« Agilent » vers soi).
- Déposer le mix d'hybridation sur la backing slide sans la toucher, en faisant une ligne de gouttes. Casser les éventuelles bulles avec une pointe de pipette ou le coin d'une lamelle.
- Déposer la lame Agilent « face Agilent contre Agilent », c'est-à-dire face active de la puce vers l'intérieur.
 - Fermer la chambre, toujours à plat, visser puis faire 1/4 de tour supplémentaire.
 - Mouiller les joints en tournant **très lentement** la chambre. S'assurer qu'il n'y a bien qu'une seule grosse bulle mobile et aucune bulle non mobile. Vérifier que le volume d'hybridation soit suffisant.



ACCEPTABLE



CORRECT



INCORRECT

PF Transcriptome	PROTOCOLE	18/09/07
Version 5.5	One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - AGILENT	Page 7 sur 7

Hybrider pendant 17 heures à 65°C, vitesse de rotation 10 rpm (2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM) ou 4 rpm (2X Hybridization Buffer).

7- Lavage

Attention : ne pas laver plus de 5 lames par bain.

- Démontez la chambre d'hybridation à plat.
- Désassemblez la lame et la backing slide dans le 1^{er} récipient de **Wash buffer 1** et décollez la lame à l'aide de la pincette fournie avec les chambres ; laissez la backing slide tomber au fond du cristalliseur.
- Laissez quelques secondes la lame dans le cristalliseur avant de l'immerger dans le 2^{ème} récipient de **Wash buffer 1** sous agitation douce.
- Mettez au fur et à mesure toutes les lames dans la même orientation et les laissez **1 min** à l'abri de la lumière.
- Transférez les lames dans le **Wash buffer 2** en vérifiant que la T° soit toujours à 37°. Les laissez **1min** sous agitation à l'abri de la lumière.
- Retirez très délicatement les lames du wash 2.

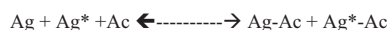
INRA – RENNES-Beaulieu SCRIBE	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 07/11/10
<i>Procédure expérimentale</i>		Page : 1/4
Type de technique : Titre : Dosage Radioimmunologique du cortisol		

I. Objet et domaine d'application (en particulier limites mini et maxi de la technique)

Dosage radioimmunologique (RIA) du cortisol dans le plasma de truite et les milieux de culture

II. Principe et références (documents associés si nécessaire)

Le principe du dosage RIA consiste en une compétition entre l'hormone à doser (de concentration inconnue) et la même hormone tritiée (traceur) en concentration faible et constante, vis à vis d'une quantité limitée d'anticorps. La liaison entre l'antigène (l'hormone à doser ou le traceur) et l'anticorps est une réaction réversible qui aboutit à la formation d'un complexe antigène anticorps (Ag-Ac).



La radioactivité permet de mesurer avec précision la fraction libre ou liée après leur séparation. Le pourcentage de liaison obtenu est rapporté à une gamme standard effectuée dans les mêmes conditions mais avec des concentrations connues d'hormone froide. La concentration d'hormone contenue dans un échantillon inconnu est déterminé en comparant la radioactivité liée par rapport à la courbe obtenue avec la gamme standard.

III. Réactifs utilisés, préparations et stockage (liste des produits avec référence)

Mélange Acétate d'éthyl/cyclohexane (1/1): 4 ml par échantillon

Acétate d'éthyl (Carlo Erba, 448256)

Cyclohexane (Carlo Erba, 436905)

Tampon phosphate : utilisé pour faire le TPG et le PEG (cf pour les volumes)

NaH₂PO₄ (Prolabo, 28011360) 0.01 M 1.38 g/l (1 H₂O)

Na₂HPO₄ (Prolabo, 28028298) 0.01 M 3.58 g/l (12 H₂O)

NaCl (Prolabo, 27800360) 0.15 M 9 g/l

Ajuster le pH à 7.25 avec NaOH 2N

Stockage à 4°C pendant un mois.

Tampon Phosphate Gélatiné (TPG) : 13 ml pour la gamme, 0.5 ml par échantillon après HPLC

0.2 ml par échantillon pour l'anticorps + 5 ml pour la gamme et référence

0.2 ml par échantillon pour le traceur + 5.8 ml pour la gamme et référence

Gélatine (Sigma, G2500) 1 ‰ 1 g/l

Dissoudre la gélatine dans une partie du tampon phosphate chauffé à 60°C, en agitant bien, ajouter ensuite le reste.

Stockage à 4°C quelques jours.

PEG : 4 ml par tube + 58 tubes de gamme et référence

Polyéthylène glycol 6000 (ACROS 192280010) 25 %

Pour 100 ml final : dissoudre 25 g dans 75 ml de tampon phosphate puis ajuster à 100 ml.

Stockage à 4°C pendant un mois.

Scintillateur : 5 ml par échantillon + 58 tubes de gamme et références

Insta Fluor Plus (Packard, 6013127)

Ethanol : Ethanol absolu (Prolabo, 20821.296)

Hydrocortisone : (Sigma, H-4001)

Solution mère à 100µl/ml dans l'éthanol

Stockée à 4°C dans une fiole à bouchon rodé.

γglobuline et anticorps

γglobuline (γG) : augmente l'encombrement (maillage avec l'anticorps) favorise la précipitation

Préparation des Immunoglobulines G (γG) nécessaires à la séparation des fractions libre et liée.

Le plasma obtenu à partir de sang de lapin blanc selon le protocole n°.

concentration initiale : 500 mg/100ml de tp phosphate

concentration d'utilisation (à préparer extemporanément) : 50 mg/100 ml soit une dilution au 1/10^{ème} dans le TPG

Volume désiré est le nombre de tubes x 0.1 ml + 1 ml pour les nuls.

Anticorps (Ac) :

La dilution est déterminée par les courbes de titration, dans notre cas dilution (saignée du lapin 44, réalisée le 29/01/96) dilution au 1/100^{ème} dans le TPG + γG.

Traceur de dosage :

Hydrocortisone (1.2.6.6-3H(N)^o ou Cortisol (Amersham, TRK407), concentration initiale : 1 µCi/µl

Rédigée par: Nom: Claudiane Valotaire Fonction: TRN Visa:	Revue par: Nom: Benoît Aupérin Fonction: IR Visa:	Approuvée par: Nom: Fonction: Visa:
Diffusion		Géré et Archivé :

INRA – RENNES-Beaulieu SCRIBE	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 07/11/10
<i>Procédure expérimentale</i>		Page : 2/4
Type de technique : Titre : Dosage Radioimmunologique du Cortisol		

Concentration d'utilisation : 15 à 20000 cpm/100µl
Il faut environ 20µl d'hydrocortisone marqué pour 37 ml de TPG.
Volume désiré : 0.1 ml par tube + 0.5 ml (volume mort)
Mettre le traceur initial dans un bécher, ajouter le TPG, agiter énergiquement
Mesurer au compteur pour vérifier le nombre de cpm (100µl de cette solution + 100µl d'éthanol + 2.5 ml de scintillateur Insta Fluor)

IV. Petits matériels et appareillages (lister tout le matériel nécessaire)

Il faut :

- un congélateur -20°C ou -80°C
- un agitateur magnétique chauffant et barreau aimanté
- tubes à hémolyse en verre de 5 ml : 11 pour la gamme + nb d'échantillons à extraire (Starlab THVE75)
- Colonne : ZORBAX SBC18, 4.6x250 mm, granulométrie : 5mm.
- un ou plusieurs portoirs pour tubes polypropylène 3 ml
- une plaque en plastique de la taille des portoirs de tubes 3 ml (ou un portoir supplémentaire)
- des tubes polypropylène de 3 ml en duplicat + 52 pour la gamme, les références, les B₀, les totaux et les nuls (Starlab TH3PRO).
- des obturateurs 10mm (Starlab OBS10)
- un pHmètre,
- un thermomètre,
- un distributeur manuel à répétition (Multipette Eppendorf)
- une micropipette (volume variable de 10 à 100 µl)
- une micropipette (volume variable de 100 à 1000 µl)
- deux béchers en verre < à 100 ml
- deux béchers > à 1 l
- un bécher < à 500 ml
- un vortex avec plateau
- une centrifugeuse (J6 MC Beckman) contient 504 tubes soit 453+47 (gamme) donc 226 échantillons maxi
- un compteur BETA (Packard Tri-Carb 2100TR)
- un appareil chauffant pouvant accueillir un ou plusieurs portoirs de tubes
- deux distributeurs à répétition sur bouteille (Varispenser Eppendorf)
- deux fioles jaugées de 10 ml
- du parafilm
- du papier aluminium
- un système pour flux d'air
- une cuvette

V. Nature des étalons et témoins

Gamme étalon :
Elle est réalisée à partir d'Hydrocortisone Sigma, H4001
A préparer à chaque dosage à partir de la solution mère conservée à 4°C
Solution mère : 100 µg/ml dans l'éthanol (Prolabo distillé)
Solution A : 1µg/ml (100µl de solution mère dans 9.9 ml de TPG)
Solution B : 100 ng/ml (1 ml de solution A dans 9 ml de TPG)

Référence doc :
15 ng/ml
1.5ng/ml
0.5 ng/ml
L'Hydrocortisone est diluée dans le TPG.
Cet étalon est conservé à -20°C, il est traité comme un échantillon (pas d'extraction) et il sert de contrôle entre chaque dosage

VI. Mode opératoire (avec éventuellement des références à d'autres fiches)

1) Technique de prélèvement

Le sang est prélevé sur les poissons anesthésiés, il est ensuite centrifugé à 2500G pendant 10 minutes à 4°C et la phase supérieure (le plasma) est prélevé et aliquoté en fonction des dosages à effectuer et des quantités utilisées. Pour le dosage qui nous concerne, il faut 200 µl minimum.

2) Conditions de stockage des échantillons

Le plasma est conservé à -20°C jusqu'à utilisation, le milieu de culture également.

3) Prétraitement des échantillons

Extraction des stéroïdes
Les échantillons sont décongelés puis 50µl ou 100µl sont répartis dans les tubes à hémolyse en verre identifiés, et préalablement rincés à l'eau distillée.
Ajouter 2 ml de mélange Acétate d'éthyl/cyclohexane sous hotte.
Vortexer chaque tube 2 fois 15 secondes puis recouvrir de parafilm et d'aluminium.
Congeler dans un congélateur à thermostat extérieur
-20°C pendant 1 heure
-70°C pendant 10 minutes le surnageant congèle si plus longtemps.
Préparer une deuxième série de tubes.

INRA – RENNES-Beaulieu SCRIBE	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 07/11/10
Procédure expérimentale		Page : 3/4
Type de technique : Titre : Dosage Radioimmunologique du Cortisol		

Lorsque la phase aqueuse est congelée (culot), mettre les tubes sur la glace (cela laisse plus de temps pour faire le transfert) et transvaser la phase organique dans la série de tubes propres.

Ajouter au culot décongelé 2 ml du mélange et vortexer à nouveau 2 fois 15 secondes chaque tube.

Recongeler.

La première série de tubes peut être partiellement évaporée sous hotte puis stockée à 4°C (dans un frigo sécurisé)

Quand la 2^{ème} série est congelée, ajouter le surnageant à la première série.

Evaporer la phase organique à sec, dans un bain d'eau tiède (accélère le processus) sous un flux d'air.

Rincer les parois avec 2 fois 100µl d'éthanol pour récupérer les stéroïdes au fond du tube.

Il est préférable de stocker à ce stade si le dosage n'est pas fait dans les jours qui suivent.

Il est possible également d'évaporer les échantillons à sec, puis d'y ajouter le volume désiré de TPG (300 µl minimum, 500µl pour 2 dosages).

Vortexer violemment 10 secondes chaque tube, les recouvrir de parafilm et les placer dans un bain à 37°C pdt 10 min.

Vortexer 10 secondes et remettre à 37°C 10 min.

Vortexer.

Eviter de conservés les échantillons trop longtemps à -20°C dans le TPG, les vortexer après la décongélation.

Faire la dilution si nécessaire, recouvrir de papier aluminium et mettre à 4°C

Marquer les tubes en polypropylène :

5 Totaux, 3 Nuls, 5 B₀, les 3 références et la gamme en triplicat et les échantillons en duplicat.

4) Préparation de la gamme étalon

Solution mère : 100 µg/ml dans l'éthanol (Prolabo distillé)

Solution A : 1µg/ml (100µl de solution mère dans 9.9 ml de TPG)

Solution B : 100 ng/ml (1 ml de solution A dans 9 ml de TPG)

Toujours mettre le tampon avant l'hormone

ng/ml	numéro	Volume de TPG	Volume de solution indiquée
100	12		Solution B pure
60	11	400	600 de solution B
30	10	700	300 de solution B
15	9	500	500 de 30 (n°10)
7.5	8	500	500 de 15 (n°9)
3.75	7	500	500 de 7.5 (n°8)
2.5	6	500	50 de 30 (n°10)
2	5	980	70 de 30 (n°10)
1.5	4	900	100 de 15 (n°9)
1	3	500	500 de 2 (n°5)
0.5	2	500	500 de 1 (n°3)
0.25	1	500	500 de 0.5 (n°2)

Bien vortexer entre chaque dilution.

5) Procédure

Tout repose sur la répétitivité, c'est à dire que le maniement des pipettes doit toujours être identique.

Premier jour

- Distribution des échantillons et de la gamme étalon :

Après décongélation et homogénéisation par vortex, 100 µl d'échantillon sont distribués en duplicat, dans des tubes en polypropylène de 3 ml, 100µl de la gamme étalon (extemporanément) sont distribués en triplicat (ne pas distribuer trop longtemps à l'avance car il y a absorption par les parois des tubes), le tout est fait sur la table froide ou bien dans la glace.

On ajoute à la gamme étalon :

5 tubes contenant uniquement le traceur (coups totaux) à boucher maintenant car pas de précipitation au PEG)

3 tubes contenant du TPG/γG et le traceur

5 tubes B₀ contenant le mélange anticorps/γG et le traceur (liaison totale de l'anticorps)

3x3 tubes de référence

	Nb de tubes	TPG	TPG/γG	Gamme ou référence	échantillon dans TPG	anticorps/γG	Incubation 2H à 4°C	traceur	Incubation 3H à 4°C	PEG
Totaux	5						oui	100µl	oui	
Nuls	3	100 µl	100 µl				oui	100 µl	oui	2 ml
B ₀	5	100 µl				100 µl	oui	100 µl	oui	2 ml
Gamme et référence	11x3 3x3			100 µl		100 µl	oui	100 µl	oui	2 ml
échantillon	2x				100 µl	100 µl	oui	100 µl	oui	2 ml

Avant chaque incubation, les tubes seront vortexés rapidement.

INRA – RENNES-Beaulieu SCRIBE	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 07/11/10
<i>Procédure expérimentale</i>		Page : 4/4
Type de technique : Titre : Dosage Radioimmunologique du Cortisol		

Le PEG est additionné sur la table froide, ne pas vortexer les tubes à cette étape, incubation toute la nuit à 4°C, le plateau sera recouvert d'un papier aluminium à chaque incubation.
Les totaux seront bouchés pour éviter d'y mettre du PEG, de les centrifuger et de les retourner.

Deuxième jour

Les tubes sont mis à centrifuger à 3200G pendant 1 heure à 12°C.
Ils sont ensuite retournés sur treillis pour éliminer le surnageant, les laisser s'égoutter ne pas hésiter à tapoter, le culot est bien accroché et éponger le dessous avec du sopalin.
Mettre à nouveau 2 ml de PEG par tube (pas besoin de table froide)
Centrifuger à 3200G pendant 45 minutes à 12°C
Retourner les tubes pour éliminer le PEG comme la première fois.
Distribuer 100 µl d'éthanol absolu dans tous les tubes y compris les totaux (l'éthanol augmente la polarité du liquide scintillant et permet, avec le vortexage, de dissoudre le culot).
Ajouter 2.5 ml de liquide scintillant non accepteur d'eau dans tous les tubes, les boucher.
Mettre les tubes 10min à 37°C dans un bain à sec.
Mélanger les tubes en les renversant et vérifier la dissolution du culot.
Disposer les tubes dans les racks du compteur et compter 4 minutes par tube.

6) Modifications apportées lorsque la procédure a été adaptées à d'autres modèles

VII. Calcul

Les calculs sont réalisés grâce à une feuille de calcul Excel. La courbe est tracée en linéaire (l'abscisse et l'ordonnée sont transformées en Ln et logit) à partir de la gamme étalon.

VIII Expression des résultats

La concentration des échantillons est donnée en pg/ml.
Ne pas oublier de tenir compte de la dilution au niveau de l'extraction.

IX. Traitements et éliminations des déchets

Les déchets Tritiés sont classés en 2 catégories : liquides et solides.
Tous les tubes avec scintillant sont considérés liquides, tout ce qui est cônes, gants, papier absorbant, bench-coat, tubes vides sont considérés solides.
Par contre, le PEG est retourné dans un réceptacle qui récolte le liquide radioactif.
Dans tous les cas, les déchets sont enlevés par l'ANDRA.
Les tubes en verre contenant le résidu de plasma après extraction sont jetés dans une poubelle déchets biologiques coupants.
De même pour les tubes en verre contenant le reste d'extrait.

X. Hygiène et sécurité

Toutes les manipulations de solvants doivent se faire sous la hotte avec une blouse et des gants en vinyl et éventuellement un masque filtrant.,
A partir du moment où la radioactivité est utilisée, il convient de porter des gants latex et la blouse.
De plus, la paillasse froide et la hotte sur lesquelles la manipulation se fait, doivent être protégées avec du drap médical et des frottis doivent être réalisés à la fin de la manipulation.
Le cahier entrée/sortie de radioactivité doit également être rempli.

Abstract

Euryhalin teleosts can live in freshwater as well as in seawater. The success of their survival depends then on their osmotic acclimation capacities. The objective of my work is to describe acclimation processes in the salted water at the rainbow trout by a study coupling functional genomic and genetic approaches.

From a first differential gill transcriptomic study, a list of candidates genes was established. This study also allowed to investigate the physiological answer to a hyperosmotic kinetics challenge. Main results reveal good euryhalinity capacities of the tested trouts and a maximum transcriptomic answer 24 h after the seawater transfer. Biological processes implicated in the acclimation mechanisms are also proposed.

A second part of this work consisted of the characterisation of the genetic control of processes linked to seawater acclimation in rainbow trout. Using as characters, a two times repeated 24h post seawater transfer plasma sodium and chloride levels, as well as gill weight, unis trait and multis trait analyses allowed to reveal 18 QTL among whom 9 are qualified as robust.

A last approach of eQTL detection then allowed, based on a gill transcriptomic analysis and on the results of the first two approaches, to offer 69 exclusive candidates genes. If the majority of these genes are offered as acting at functional level, some are suggested as positional candidates.

It is the first time that a blending transcriptomic differential approach coupled to a QTL / eQTL study is led to a non-sequenced genome aquacole interest teleost for the acclimation capacity to different osmotic environments. The existence of a genetic element having an influence on the capacities of osmoregulation in teleost is shown here. These results lay the road with cobblestones for a definite investigation of the genetic bases of seawater acclimation processes in teleosts.

Key words : osmoregulation, genetic, genomic, transcriptomic, microarray, QTL, eQTL, teleost, trout, *Oncorhynchus mykiss*, gill.

Résumé

Les téléostéens euryhalins peuvent vivre dans des milieux à salinité très différentes. Le succès de leur survie dépend alors de leurs capacités d'acclimatation à un environnement osmotique différent. L'objectif de mon travail est de décrire les processus d'acclimatation à l'eau salée chez la truite arc-en-ciel par une étude couplant approches de génomique fonctionnelle et génétique.

A partir d'une première approche de transcriptomique différentielle menée sur la branchie, une liste de gènes candidats a été établie. Cette étude a également permis d'étudier la réponse physiologique à un challenge hyperosmotique au cours d'une cinétique. Les principaux résultats révèlent de bonnes capacités d'euryhalinité de la part des truites utilisées et une réponse transcriptomique maximum 24h après le transfert en eau de mer. Des processus biologiques impliqués dans les mécanismes d'acclimatation sont également proposés.

Une seconde partie de ce travail consistait en la caractérisation d'un contrôle génétique des processus liés à l'acclimatation à l'eau de mer chez la truite. Utilisant comme caractères, les teneurs plasmatiques en sodium et en chlore mesurées 24h après un transfert d'eau douce en eau salée répété à 2 reprises, ainsi que le poids branchial, des analyses univariées et multivariées ont permis de détecter 18 QTL dont 9 sont qualifiés de robustes.

Une dernière étape de détection de QTL d'expression a alors permis, en se basant sur les résultats des deux premières approches et sur une nouvelle analyse transcriptomique dans la branchie, de proposer 69 gènes candidats de premier choix. Si la majorité de ces gènes est proposée comme agissant au niveau fonctionnel, certains sont suggérés comme candidats positionnels.

C'est la première fois qu'une approche mêlant transcriptomique différentielle et approche QTL / eQTL est menée chez une espèce d'intérêt aquacole au génome non séquencé pour la capacité d'acclimatation à un milieu osmotique différent. L'existence d'une composante génétique influant sur les capacités d'osmorégulation chez un téléostéen est ici montrée. Ces résultats pavent la route pour une investigation précise des bases génétiques des processus d'acclimatation à l'eau de mer chez les téléostéens.

Mots-clés : osmorégulation, génétique, génomique, transcriptomique, puce à ADN, QTL, eQTL, téléostéen, truite, *Oncorhynchus mykiss*, branchie.