HAL
open science

Etude des bases moléculaires du déterminisme sexuel et de la différenciation chez une espèce hétérogamétique femelle ZZ-ZW : Schistosoma mansoni

Marion Picard

To cite this version:

Marion Picard. Etude des bases moléculaires du déterminisme sexuel et de la différenciation chez une espèce hétérogamétique femelle ZZ-ZW : Schistosoma mansoni. Génétique. Université de Perpignan, 2015. Français. NNT : 2015PERP0032 . tel-01280876v2

HAL Id: tel-01280876

https://theses.hal.science/tel-01280876v2

Submitted on 1 Mar 2016

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
Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale ED305
Et de l'unité de recherche UMR5244 - IHPE

Spécialité : BIOLOGIE

Présentée par PICARD MARION ANNE-LISE

Etude des bases moléculaires du déterminisme sexuel et de la différenciation chez une espèce hétérogamétique femelle ZZ-ZW : *Schistosoma mansoni*.

Soutenue le 1er décembre 2015 devant le jury composé de

M. CORDAUX Richard, DR2 CNRS, UMR7267	Rapporteur
M. ESCRIVA Hector, DR2 CNRS, UMR7232	Rapporteur
Mme DISSOUS Colette, DR2 INSERM, U1019-UMR8204	Examinatrice
M. VEYRUNES Frédéric, CR CNRS, UMR5544	Examinateur
M. MITTA Guillaume, PR, UPVD	Examinateur
Mme COSSEAU Céline, MC, UPVD	Co-directrice de thèse
M. BOISSIER Jérôme, MC HDR, UPVD	Directeur de thèse

Table des matières

TABLE DES MATIERES 2

TABLE DES ILLUSTRATIONS 5

SOUTIEN FINANCIER 10

REMERCIEMENTS 10

INTRODUCTION 12

Partie1 : De la reproduction sexuée aux déterminants moléculaires du sexe 20

A. Sexualité et reproduction sexuée 20

1. La sexualité : définition(s) générale(s) et origine(s) 20

2. La reproduction sexuée : des mécanismes spécifiques au service de l'originalité génétique 22

a. La méiose 22

b. Les gamètes 24

c. La fécondation 24

3. Pourquoi choisir la reproduction sexuée ? 25

a. Quelle(s) alternative(s) ? Les modes non-sexués de reproduction 25

b. Quelle(s) alternative(s) ? La parthénogenèse, un mode de reproduction intermédiaire 26

c. Maintien de la reproduction sexuée au cours de l'évolution 26

4. Reproduction sexuée et parasitisme 30

B. Questions d'identité(s) sexuelle(s) 31

1. Etre « un » ou « deux » (ou « plus »)? Hermaphroditisme, gonochorisme (et types de compatibilité) 31

a. L'hermaphrodisme 31

b. Gonochorisme, sélection sexuelle et dimorphisme 31

2. Quels sont les mécanismes conduisant à l'apparition du dimorphisme sexuel ? 33

a. Déterminisme *versus* différenciation 33

b. Le déterminisme sexuel : une énigme 34

c. Le déterminisme chromosomique du sexe: aspects évolutifs 37

d. Les acteurs moléculaires du sexe 42

Partie 2: *Schistosoma mansoni*, de la maladie tropicale négligée aux questions de reproduction sexuée 48

A. Les schistosomiases, des maladies tropicales négligées 48

1. Données épidémiologiques 48

2. Le cycle de vie hétéroxène de *Schistosoma mansoni* 50

3. La bilharziose intestinale, du parasitisme silencieux à la pathologie sévère 51

4. Prise en charge récente d'une maladie (au moins) antique 52

B. Les schistosomes, des plathelminthes gonochoriques atypiques ! 54

1. Leur position dans la classification du monde vivant 54

2. Un scandale évolutif 55

3. Les schistosomes et la Reine Rouge 57

a. Reproduction sexuée puis gonochorisme, le choix de la diversité 57

b. Un cycle de vie hétéroxène : un « double avantage » ? 58

c. Cas particuliers 59

4. Les sexes séparés des schistosomes ou la « théorie du genre »... ? 59

a. Gonochorisme et dimorphisme sexuel, un coup d'œil évolutif 59

b. Monogamie : un pseudo-hermaphrodisme ? 60

c. Apparition du dimorphisme sexuel au cours du cycle vie 61

5. Traits d'histoire de vie mâles et femelles au cours du cycle 66

a. Les stades « pré-vertébrés » 66

b. Le stade vertébré : pathogénicité, immunogénicité et *sex-ratio* biaisé mâle 67

C. Tour d'horizon du sexe moléculaire connu chez *Schistosoma mansoni* 69

1. Déterminisme chromosomique du sexe 69

a. Evolution des chromosomes sexuels chez les schistosomes 69

b. Caractérisation des chromosomes sexuels chez *Schistosoma mansoni* 71

2. Les acteurs génétiques et épigénétiques connus du sexe chez *Schistosoma mansoni* 71

a. Analyses transcriptomiques 71

b. Les facteurs « épigénétiques » 73

Partie 3: Le projet 75

A. Intérêt et objectifs 75

B. Repositionnement des stades développementaux étudiés 75

RESULTATS 77

Partie 1: Approche ciblée: Revue, et étude des gènes *DMRT* chez *Schistosoma mansoni* 78

The roles of *DMRT* genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom 80

Atypical female-biased expression pattern of *DMRT* genes through *in vivo* developmental stages of *Schistosoma mansoni* 95

Functional validation of *DMRT* genes in *Schistosoma mansoni*: Burroughs Wellcome Fund (BWF) schistosome toolbox travel award report 107

Partie 2: Déterminisme et différenciation sexuelle de *Schistosoma mansoni*: implication de facteurs génétiques et/ou épigénétiques 113

Sex-specific transcriptome of *Schistosoma mansoni* through *in vivo* development: genetic and epigenetic interplay to trigger off the sexual differentiation 115

Partie 3 : La compensation de dose chez *Schistosoma mansoni* : études transcriptomiques et structurales 138

Partie 4 : Développement méthodologique de la culture *in vitro* des stades schistosomules 144

SYNTHESE ET PERSPECTIVES 152

Partie 1: Synthèse 153

Partie 2: Perspectives 159

Les gènes à empreinte parentale chez *Schistosoma mansoni* 159

D'autres horizons 159

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 163

ANNEXE 1 – *Supplementary files* 186

ANNEXE 2 – *Curriculum vitae* 201

Tables des illustrations

INTRODUCTION

Figures

Figure 1. Méiose et innovation génétique 23
Figure 2. Chevauchement des différentes stratégies de reproduction et de création de diversité génétique 28
Figure 3. La conversion génique et ses conséquences évolutives chez les organismes améiotiques 29
Figure 4. Confrontation de la structure génomique d'une espèce à reproduction sexuée et d'une espèce améiotique 29
Figure 5. Comparaison des concepts de « déterminisme » et de « différenciation » chez les mammifères et le poulet 34
Figure 6. Diversité des modes de déterminismes sexuels au sein de différents *taxa* animaux 36
Figure 7. Mécanisme théorique de l'évolution des chromosomes sexuels. Exemple d'un hetérogamétisme mâle XY 37
Figure 8. Certaines espèces sont des « arrêts sur image » du schéma évolutif des gonosomes 38
Figure 9. Phylogénie des chromosomes sexuels de différents groupes de vertébrés 39
Figure 10. Les différentes modalités de compensation de dose génique 41
Figure 11. Les différentes stratégies de compensation de dose génique chez les espèces hétérogamétiques mâles 41
Figure 12 Phylogénie représentant tous les métazoaires chez lesquels les gènes de la famille des *DMRT*s ont un rôle dans le développement du sexe 43
Figure 13. Distribution globale des différentes espèces de schistosomes pathogènes pour l'Homme 49
Figure 14. La bilharziose en Corse 49
Figure 15. Cycle de vie hétéroxène de *Schistosoma mansoni* 50
Figure 16. Migration du parasite *Schistosoma mansoni* dans son hôte vertébré 51
Figure 17. Les *Schistosomatidae*, gonochoriques, sont atypiques parmi 24000 espèces de plathelminthes hermaphrodites, dont la plupart sont des parasites (*i.e.* trématodes) 55
Figure 18. Arbre de similarités entre différentes espèces de parasites sanguins, dont les *Schistosomatidae*, basé sur l'analyse des séquences ribosomales 18s et 28s et mitochondriales de la cytochrome-oxydase 57
Figure 19. Le cycle hétéroxène des schistosomes, comme celui de tous les trématodes digènes, combine les bénéfices de la multiplication asexuée et de la reproduction sexuée 58
Figure 20. Détermination syngamique et absence de différenciation phénotypique dans les stades larvaires de *Schistosoma mansoni* 62
Figure 21. Observation des organes reproducteurs femelles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin 64
Figure 22. Observation des organes reproducteurs mâles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin ou DAPI et Phalloïdine 65

Figure 23. Développement des organes reproducteurs mâles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin 66
Figure 24. Développement des organes reproducteurs femelles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin 66
Figure 25. Modèle corrélant différents aspects de la biologie reproductive chez *S. mansoni* 67
Figure 26. Position de l'ancêtre commun des *Schistosomatidae* et d'*Echinococcus* et homologies chromosomiques entre les deux trématodes 70
Figure 27. Scenario évolutif des chromosomes sexuels chez les schistosomes 70
Figure 28. Composition structurale des gonosomes de *S. mansoni* 71
Figure 29. Les différentes phases du cycle de vie de *S. mansoni* étudiées dans ce travail 76
Figure 30. Méthode d'obtention des populations clonales mâles et femelles 76

Tableaux

Tableau 1. Sexualités horizontales : différents types de transferts horizontaux générateurs de diversité génétique 21
Tableau 2. La sexualité : différentes modalités, différentes origines 22
Tableau 3. Partage des différents déterminants géniques du sexe à travers le règne animal 42
Tableau 4. Répartition géographique des schistosomiases humaines en fonction des organes atteints et de l'espèce du parasite. En gris, l'espèce qui fait l'objet de notre étude, et qui est la plus répandue : *S. mansoni* 49
Tableau 5. Avantages et inconvénients du seul traitement actuellement utilisé contre les schistosomiases : le Praziquantel® 53
Tableau 6. Classification phylogénique des schistosomes 54
Tableau 7. Principales études de transcriptomique globale sur différents stades développementaux et/ou par comparaison entre les sexes 73

Images

Image 1. *Kryptoperidinium foliaceum* 20
Image 2. Accouplement de deux protistes *Tetrahymena* 21
Image 3. Principe du « cliquet » 27
Image 4. *Adineta vaga* 29
Image 5. Illustration de John Tenniel des « Aventures d'Alice au pays des merveilles » de Lewis Carroll (1866) 30
Image 6. Roue du paon mâle 32
Image 7. *Gallus gallus* gynandromorphe 33
Image 8. Libération de spores haploïdes à partir d'un sporophyte mûr (diploïde) de l'algue brune *Ectocarpus* 36
Image 9. Rhinocéros Cosmique, ou Chair de Poule Rhinocérontique. Salvador DALI 47
Image 10. Un opistobranche hermaphrodite 47
Image 11. Caractères hermaphrodites chez un « mâle » *S. mansoni* 59
Image 12. Dimorphisme sexuel prononcé chez des vers adultes *Schistosoma mansoni* 60
Image 13. Couple monogame de *Schistosoma mansoni* 61
Image 14. Femelles *Schistosoma mansoni*. 62

Encarts

Encart 1. Le scandale des rotifères bdelloïdes 29
Encart 2. Et s'il existait un « art du vivant » ? 47

RESULTATS

Partie 1. Approche ciblée: Revue, et étude des gènes *DMRT* chez *Schistosoma mansoni* 79

The roles of DMRT *genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom* 81

Figures

Figure 1. Analysis of the conserved DM domain among the different proteins 90

Tables

Table 1. Comparative spatial expression of different *Dmrt* genes in mollusks 83
Table 2. Comparative spatial expressions of different *Dmrt* genes in *Rana rugosa* 85
Table 3. Comparative spatial expression of different *Dmrt* genes in fishes 88
Table 4. *Dmrt* gene families according to different phyla 91

Atypical female-biased expression pattern of DMRT *genes through* in vivo *developmental stages of* Schistoma mansoni 96

Figures

Figure 1. « Schistogram » of the three developmental stages of schistosomula analysed in this study 100
Figure 2. Developmental asynchrony in schistosomulum stage 101
Figure 3. Amino-acid alignment of the *DMRT* genes of *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Clonorchis sinensis* (Cs), *Schistosoma mansoni* (Sm) and *Schmidtea mediterranea* (Sme) 102
Figure 4. Maximum likelihood tree of DM domains from seven species 103
Figure 5. Male *vs* female expression of three *DMRT* genes at five different lifecycle stages of *Schistosoma mansoni* 104

Tables

Table 1. qPCR primers used in this study 99
Table 2. Chromosomal location of *Schistosoma mansoni* DM domain genes 101

Picture

Picture 1. Sexual dimorphism in *Schistosoma mansoni* adult worms 96

Functional validation of DMRT *genes in* Schistosoma mansoni*: Burroughs Wellcome Fund (BWF) schistosome toolbox travel award report* 108

Figures

Figure 1. dsRNA experiment on *in vitro* newly transformed schistosomula (NTS) 109
Figure 2. dsRNA experiment on *in vivo* developed schistosomula 109

Figure 3. siRNA experiment on *in vitro* transformed schistosomula (NTS) 109

Tables

Table 1. *Schistosoma mansoni DMRT* genes 110
Table 2. Location of *DMRT* gene exons 110
Table 3. dsRNA experiment: primer for matrix synthesis 111
Table 4. dsRNA experiment: primer for dsRNA synthesis 111
Table 5. siRNA experiment: siRNA sequences against *Sm_dmd3* 111
Table 6. Tanscriptomic evaluation of silencing experiments: qPCR primers 112

Partie 2. Déterminisme et différenciation sexuelle de *Schistosoma mansoni:* implication de facteurs génétiques et/ou épigénétiques 114

Sex-specific transcriptome of Schistosoma mansoni *through* in vivo *development: genetic and epigenetic interplay to trigger off the sexual differentiation* 116

Figures

Figure 1. Venn diagram of sex-associated transcripts in three developmental stages 123
Figure 2. Super-network of sex-biased candidate regulators of sexual differentiation 126
Figure 3. Overview of the 39 homeotic genes displaying a sex-biased pattern of expression in at least one stage of development 128
Figure 4. Overview of the 45 splicing-linked genes presenting a sex-biased pattern of expression in at least one stage of development 130
Figure 5. Overview of the 16 sex-associated miRNAs through 3 stages of the schistosome life cycle 131
Figure 6. H3K27me3 EpiChIP profile on chromosome 1 132
Figure 7. General model for sex-associated molecular events during *Schistosoma mansoni* development 136

Tables

Table 1. Chromatin structure associated GO terms in male and female vertebrate stages 124
Table 2. Sex-biased hits associated with lipid metabolism and steroid pathway 129

Partie 3. La compensation de dose chez *Schistosoma mansoni* : études transcriptomique et structurale 139

Figures

Figure 1. Distribution des gènes biaisés mâles et femelles le long du chromosome sexuel Z, aux stades cercaire, schistosomule et adulte 140
Figure 2. Chez la femelle : niveau d'expression de l'ensemble des gènes aux stades cercaire, schistosomule et adulte 140
Figure 3. Profils d'enrichissement moyen des marques H4K20Me3 et H3K4Me3 en fonction de la région des chromosomes sexuels Z-spécifique ou pseudoautosomale, chez les adultes et les cercaires, chez la femelle 141
Figure 4. Evolution de la structure chromatinienne du chromosome Z femelle entre les stades cercaires et adultes 142
Figure 5. Evolution de la structure chromatinienne des chromosomes sexuels femelles entre les stades cercaires et adultes 143

Tableaux

Tableau 1. Ratio de l'expression moyenne des gènes autosomaux sur l'expression moyenne des gènes Z-spécifiques chez *S. mansoni* 139
Tableau 2. Confrontation des enrichissements d'H4K20Me3 et H3K4Me3 sur les chromosomes sexuels femelles 142

Partie 4. Développement méthodologique de la culture *in vitro* sur les stades schistosomules 144

Figures

Figure 1. Critères morphologiques de mortalité 147
Figure 2. Marquage à l'Iodure de Propidium 147
Figure 3. Estimation du taux de mortalité des schistosomules en fonction de caractères de mobilité et de morphologie 149
Figure 4. Estimation du taux de mortalité des schistosomules par marquage à l'Iodure de Propidium 149
Figure 5. Apparition du pigment digestif chez les schistosomules en culture 149
Figure 6. Pigment digestif chez les schistosomules en culture, dix jours après la transformation 150
Figure 7. Les différents stades de développement schistosomules *in vivo* 150
Figure 8. Evolution morphométrique des schistosomules en culture 151

Tableaux

Tableau 1. Milieu Basch 169 146
Tableau 2. Comparaison du nombre d'individus obtenus par les deux méthodes de transformation 148

Soutien financier

Ce travail a bénéficié du soutien financier de la Région Languedoc-Roussillon, au travers du projet chercheur d'avenir « *SchistoSex* » porté par Jérôme Boissier.

Mon séjour au sein du *Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases* (CDIPD) de l'Université de Californie de San Francisco (UCSF, USA) a été financé par la *Schistosome Toolbox Travel Award*, une bourse de la fondation *Burroughs Wellcome Fund* (BWF).

Je tenais à remercier l'école doctorale ED305 pour son soutien financier et son engagement auprès des doctorants, qui nous a notamment permis l'organisation du « *1er congrès des doctorants de l'UPVD* », une jolie aventure. Merci à ses directeurs successifs Xavier Py et Didier Aussel ainsi que Solange Pinol et Jocelyne Pla, pour leur soutien.

Je remercie également le laboratoire 2ei, devenu IHPE, et son directeur Guillaume Mitta pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans des conditions humaines et matérielles parfaites (Il manque juste un hamac dans le patio et une démoustication….).

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier les membres du jury : Mme Colette Dissous, Mr Hector Escriva, Mr Richard Cordaux, Mr Frédéric Veyrunes et Mr Guillaume Mitta, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, j'espère que les discussions seront animées et enrichissantes ! Merci particulièrement Richard, pour votre soutien et votre aide précieuse lors de mes comités de suivi de thèse. Merci Frédéric pour nos échanges lors des conférences Jacques Monod à Roscoff, et pour m'avoir soutenue dans mes tentatives infructueuses d'approche de D.B. (Cela est devenu un élément de langue courante « Se faire B******guiser », ou état de « B******guisation » : état de détresse face à un contact humain ne pouvant définitivement pas être établi). Merci évidemment Guillaume, pour un coup de fil inattendu à 8h45, un matin du mois de juin 2011… le début de l'aventure! Merci pour voir la recherche comme un sport, et pour être un super coach : pour les ravitaillements quand la pente était rude, les coups de pieds aux fesses, les mains tendues. Merci pour ton humanité. Merci mille fois pour ta présence et ta bienveillance.

Merci à mes directeurs de thèse, Jérôme Boissier et Céline Cosseau, un exemple parfait de complémentarité et de « partage des tâches » :

Jérôme, tu es l'homme le plus bavard que je connaisse ! Merci de ne jamais avoir perdu patience durant ma lente appropriation des concepts de biologie évolutive (Les stat', j'ai laissé tomber.). Merci de m'avoir fait bénéficier de ta grande connaissance du modèle et de ses curiosités fascinantes, merci pour ton aide précieuse à la paillasse lors des longs échantillonnages de somules, merci pour mon aventure San Franciscaine, et m'aimer bien quand même malgré mon optimisme (!) à toute épreuve (oups).

Merci Céline pour ton dynamisme hors du commun! Nous avons franchi bien des parois ensemble, et parfois bien en tête !! Merci pour ton aide et ton engagement, pour le sauvetage des manips biomol' et pour faire attention à ne pas mettre trop de «rouge » dans les articles. Merci pour ta confiance et tes encouragements. Merci pour être un modèle à suivre, quand je serai grande, je voudrais être toi !

Un peu toi, et un peu Eve aussi ! Merci Eve pour ton écoute et ta psychologie de comptoir, toujours très bien à propos !! Grâce à toi je sais que l'on peut être grand (ce mot à bien plusieurs sens !) et ne pas renoncer à la « révolution des gentils ». Je me souviendrai longtemps encore de notre escapade ensemble avec Céline au Portugal, quelle équipe ! Tes premières bières (j'avais le droit d'en parler ?), notre vieil internat, le retour à 3 heures du mat'... Et merci pour les transferts de mails, on dirait que tu as bien fait d'insister….

Merci Christoph, pour ton grand flegme, et pour faire de chaque insuccès une réussite ! Merci de ton soutien et de ta collaboration toujours précieuse. Lors de mon arrivée au laboratoire, il y avait un petit attroupement sous le porche : les gens regardaient la vidéo d'un gecko dans une poêle Tefal… c'était ton idée : Je n'arrive plus à me souvenir s'il adhérait ou pas (!?) mais je me souviens très bien m'être dit « trop génial moi aussi je veux être chercheur ! ».

Merci André, merci pour tout ce temps (des mois entiers, je pense) passé « de l'autre côté de la paillasse » en salle du vivant (Pour tous : André dit des gros mots quand il y a des bactéries dans ses mollusques… !). Merci pour les supers images de mumules qui m'ont été indispensables !! Je vais maintenant chercher le « cocotier » adéquat pour relever le défi que vous nous avez lancé !!! (Même si Jérémie m'a grillé la pole-position la semaine dernière !)

Jérémie, évidemment merci à toi ! Ma meilleure copine…, merci pour les bouées de sauvetage qu'on ne compte plus et m'aider à vider les p'tits cailloux des chaussures. Merci aussi pour adorer les potins. (Désolée pour avoir oublié ton anniversaire je viens de m'en rendre compte.) Je signerais bien « Tchoutchou » ou « la Mèche », à toi de choisir ! Merci Clémence, pour ton amitié, ta douceur, ton sourire et tes recettes de cupcakes inégalables !

Merci ma Débo, ma Mini-Chef, pour m'avoir légué ton cahier de manip (…)! Pour les apéros transformés en pièges-piscine et pour les discussions en décalage-horaire !!

Merci ma Julie (L.), pour les pauses thés, pour ton tiroir plein de bouffe et d'ibuprofène, pour être une tornade au grand cœur.

Et merci Julie (C.), pour ton humour d'homme ! Comme prévu nous allons pondre ensemble…. Plein de bonheur à la petite famille !

Merci Marion, mon « homonyme diabolique »… je suis ravie de partager l'évidence des tests de psychopathie avec toi…!

Merci Valentina pour ton rire ! Et Erwan… tu es accepté aux apéros filles, ça veut tout dire !

Merci ma Sara !! Habibi ! Tu m'as manquée cette année, toi, tes fonds d'écran psychédéliques, tes petits gâteaux libanais et ton houmous. Mais surtout ta bonne humeur permanente et les longues fins d'après-midi passées ensemble autour d'une tisane réconfortante!

Anne, Diane, mes Moufettes, merci pour votre folie! Merci pour les pauses « bad-girls » (yeah) et le monde à refaire. Merci Anne, pour les petits gâteaux qui réchauffent le cœur et pour les papiers introuvables, et Diane pour être mon idole des comptes et problèmes administratifs en tout genre, merci pour tout rendre possible! Tank yu, Poopaye & Ka ga ! (Un merci aussi à Laurent pour son VIP accès quand j'étais pâle…!!)

Merci Cristian pour partager ton bureau de ministre avec moi, et donc… pour me supporter toute la journée !! Je vais te recommander pour la légion d'honneur. Merci pour ton soutien, tes conseils, pour tes blagues Rire-et-chansons et tes carrés de chocolat ! Ta pp !

Merci Benjamin, l'empailleur d'insectes, pour m'avoir légué les vieux bouquins de parasito qui trainaient dans ton bureau… ils vont prendre la poussière mais ils sont vraiment classes !! Merci aussi d'avoir gardé la porte ouverte, même quand Jérôme se cachait !

Merci Jeff ! Mes échantillons ne boucheront plus jamais la puce du LabChip maintenant… merci d'avoir toujours trouvé la solution, et de ne jamais m'avoir jeté de cailloux !

Merci Richard, pour ta finesse légendaire (!) et la lumière de l'autre côté du patio les soirs de rédaction !

Merci David (D.) pour avoir materné les schistosomules avec moi, même si on n'a pas été des supers parents finalement… Merci aussi pour ton regard critique sur mes *Nature* et mes *Science* des soirées Blast !

Merci Julien (P.) pour les gâteaux des semaines filles et pour les longues discussions !!

Gabi, merci pour les dessins de cercaires sur le coin de la table du vivant et la prise de mensuration des schistosomules… ou encore pour avoir partagé mes corrections des comptes-rendus de TPs : une pensée toute particulière… à l'oursin « Germaine » ! Merci pour ton rire qui ferait rire n'importe qui !

Merci Hélène pour tes encouragements !

Juliette, merci pour ta spontanéité et ton écoute !

Merci Nathalie, pour ta bonne humeur constante et pour passer tes journées à chantonner!

Merci Cécile, pour les petits post-it roses que tu colles sur les bureaux… mais bon… je ne voudrais surtout pas lancer de rumeurs ! (ps : « hip » !)

Pascal, ta musique électro est vraiment bizarre !

Merci Anne, pour ton aide en perf' et pour mettre RTL2 à la radio!!

Merci Rémi pour m'avoir fait comprendre que le principal problème de mon ordi c'était ce qui était situé entre la chaise et l'écran… m'enfin j'suis toujours convaincue qu'ils ont une vie à part et que leurs initiatives sont toujours mauvaises !! Et bonne année !!

Merci Anaïs, pour ton dynamisme et ton organisation inégalable. Merci pour m'avoir trainée au footing même si j'en fais des cauchemars parfois… j'suis trop fière de nous ! Tu es une battante et je suis certaine que tout se passera bien pour toi !!

Merci Silvain pour ton humour toujours juste ! Même si quand c'est sur moi ce n'est pas drôle. Bon courage, … je ne m'inquiète pas pour toi non plus !!

Merci Guillaume (T.) pour ta discrétion…. A moins que ?!! Merci en tout cas pour tes blagues méchantes qui font pas rire les chinois!

Merci Julien (KS.) pour ton super travail de master, j'ai été vraiment heureuse de voir ce projet se réaliser, merci de ton enthousiasme!! Je te souhaite tout le meilleur pour cette belle aventure qui commence, tu verras tu ne le regretteras pas !!!

Merci Kelly, ou Kéké, pour ta simplicité et ta sincérité, ton optimisme général. Le plus dur est derrière toi, il ne reste que le meilleur !! Bon courage avec tes plantes-cailloux carnivores !

Merci David (R.), l'homme qui a du fun en prenant sa marche, l'étalon canadien qui faisait pointer les daphnies chatoyantes !

Merci Rodolfôôôôôôô !! Eres valiente !!! Bientôt la fin de cette aventure ! Mais plein d'autres, encore plus merveilleuses t'attendent !!! Un abrazo !

Benoit, je n'ai toujours pas saisi les *ratios CpG* observés/attendus mais ça à l'air cool ! Bon courage à toi pour la suite !

Merci aux copains de passage : Ronaldo (à tes souhaits !), Nele, Mariana, Ania…

Merci à tous nos amis Montpelliérains : bonne route pour la nouvelle histoire IHPE !!

Merci Martine et Brigitte pour votre gentillesse.

Merci mon Bernardo, j'aurais aimé prendre l'apéro avec toi le grand jour !! Je n'oublierai pas tes courses effrénées en roul'pratic et en t-shirts Gaston. Merci pour le poête, l'écrivain, l'amateur d'art martiaux, de tous les arts, d'ailleurs…..

Merci à l'inventeur des cupnoodles.

Merci à mes L2 Bio-Eco pour les mardis matins ensemble ! Je vous souhaite bonne route !!!

Merci les copains d'en face : Christophe (B.) pour tes petits mots cachés dans les armoires à verrerie!! Merci Elodie pour ton sourire permanent malgré les galères et pour ton réconfort dans les moments de panique administrative… ! Félicitations !!!

Je voulais aussi remercier très sincèrement Conor Caffrey, pour son accueil et son enthousiasme lors de mon séjour dans son équipe à San Francisco. Merci Thavy pour m'avoir fait découvrir SF, le Trader Joe et l'improbable CalDay comme dans les films !! Merci Brrrrr pour le stylo *Eppendorf* et l'expédition à Bodega Bay ! Merci Amale et Karina pour avoir affronté le vent et le froid au phare des baleines, et pour l'incontournable match des Giants!

Je n'oublie pas non plus JoseVicente, mon premier chef pour son enthousiasme et ses encouragements ! « Il faut écrire !». Merci à tous les copains du Pays Basque : du labo de neuro et du master, la liste est longue… Eskerrik asko !!

Merci Florence pour ton encadrement en master 2, et tous les BEBR, Rémy, Johann, Manou (pour avoir été mon modèle de doctorante quand j'étais bébé chercheur), Adrien (mon voisin de bureau, toujours prêt à se faire morbackiser) et Jo (pour ta délicatesse euh… ou pas…. Je me demandais comment c'était possible de passer autant de temps dans un laboratoire, j'ai compris.)

Merci du fond du cœur à mes copines : Eva mon chamallow pour la vie, du yaourt du RU Boutonnet aux tapas du jeudi midi…. Les instants passés avec toi sont tous précieux. Ma Célia, ma NMA….tu es une nana extraordinaire et d'une vérité désarmante, je n'aurais pu partager des coups de fil du fin fond de ma baignoire avec personne d'autre ! Marlène… je ne suis toujours pas remise du scoop-biscotte…. Ton rire me manque souvent !! Et je sais que Léon sera le petit garçon le plus heureux du monde (Bon ce sera un peu grâce à toi aussi Roman, le mec-mignon-mais-qui-se-la-pète-de-P2-qui-en-fait-sort-avec-marlène-(!)). Je vous aime fort !

Merci, Marjorie, ma cracotte à l'ananas, pour ton accueil dans mes transits à Paris et nos calicéo-potins bisannuels… maintenant va falloir se le faire ce tour du monde !

Merci ma Laurix'me ! Ma covoitureuse préférée, et la plus courageuse !

Merci Elisabeth, pour nos rendez-vous du jeudi !

Merci Jean-Claude, mon beau-papou pour les petits rosés en terrasse et Lydie, pour votre tendresse, vos attentions et vos petits plats réconfortants. Un grand merci à toute la famille et une pensée toute particulière à Carla et Lisa, j'espère que la vie vous réserve de belles surprises !

Merci ma cousine, Marie, mon inégalable amie… quel chemin depuis le temps où nous posions nos petits culs sur les rochers mouillés pour contempler l'horizon et rêver d'aventures ! Merci aussi à ma Tatate Sylvie pour toutes ces belles aventures qu'elle nous a fait vivre. Et à tout le reste de la famille, je ne peux citer tout le monde… : j'ai les meilleurs cousins de la terre, les meilleures Tatas et les meilleurs Tontons. Ma petite Mamé, un grand merci à toi évidemment, pour ton esprit, pour m'avoir donné le goût de l'enseignement quand tu étais mon élève Clothilde (!)… je sais que tu seras là.

Merci à ma Tatie Zizou pour ces visites réconfortantes pendant mes années étudiantes à Montpellier. Tu venais très souvent au bon moment sans le savoir !! Merci pour toute ton affection !! Merci aussi à mon parrain chéri et toute la famille. Merci mon Pépé, le plus beau du monde, tu vois comme j'ai bien fait la mouche ???? Merci pour m'avoir donné le goût d'apprendre.

Je pense à toi aussi Mamie et m'efforce chaque jour d'être à la hauteur de ta gentillesse et de ta bonté.

Merci à ma marraine Annie, pour son soutien toute ces années.

Merci mes frères Mat et Nico, mes héros et c'est peu dire… merci de m'avoir offert la meilleure enfance possible et pour avoir été mes modèles. Des sorties d'école en bicross et les litres d'eau avalés en kite... il ne fait aucun doute que j'en suis là en grande partie grâce à vous ! Faisons de la nécessité un bonheur… (et de la vie, une nécessité.) ! Merci Sabrina, minha irma, pour ta joie de vivre. Merci ma petite Eva, tu te fais attendre… ton arrivée rend la vie plus belle encore !!

Merci à ma Maman, la meilleure d'entre toutes. Ta patience à toutes épreuves, le réconfort les jours d'appendicite, de grandes révisions et j'en passe... Merci pour avoir rendu tout cela possible, pour ton soutien sans limite et les meilleurs flans de l'univers.

Merci mon Papounet, de qui j'aurais aimé apprendre plus encore…

Merci Arnaud (je vais rester pudique sur les surnoms…), pour ta patience inégalable, pour avoir traversé cette grande aventure avec moi, et pour toutes celles qui nous attendent. Merci pour ton courage et pour les coups de casserole !

Certains auraient aimé que je fasse la liste des déboires accumulés ces dernières années, une sorte de memento ou de défi à relever, mais je crois que j'vais tout garder pour écrire un bouquin humoristico-dramatique. Finalement aujourd'hui il ne reste que le meilleur, si c'était à refaire je le referais dix fois (pas plus quand même… c'est fatiguant !).

Vous avez tous été d'extraordinaires compagnons de route, merci à tous et à chacun. Merci… ce mot est tout petit mais voyez-le grand… : MERCI !! Pour m'avoir portée, supportée et parfois même transportée !

« Si vous ne pouvez être des saints de la connaissance, soyez-en au moins les guerriers.»
Nietzsche

A mon Père, ce géant

Résumé

Etude des bases moléculaires du déterminisme sexuel et de la différenciation chez une espèce hétérogamétique femelle ZZ-ZW : *Schistosoma mansoni*.

Mot-clés : Déterminisme sexuel, Différenciation sexuelle, Développement parasitaire *in vivo*, Evolution des chromosomes sexuels, Compensation de dose génique, Mécanismes chromatiniens, Système hétérogamétique femelle ZZ/ZW, *Schistosoma mansoni,* Expression différentielle de gènes, Séquençage haut-débit (RNA-seq, ChIP-seq).

Parmi plus de 20000 espèces de trématodes hermaphrodites, les *Schistosomatidae* ont un statut particulier car ils sont gonochoriques (*i.e.* deux sexes séparés). Le gonochorisme chez ces espèces, et leur dimorphisme sexuel, seraient en fait une stratégie d'adaptation à leur habitat : le système veineux des vertébrés à sang chaud, dont l'Homme. Malgré un mode chromosomique de déterminisme sexuel (*i.e.* hétérogamétie femelle ZW), les individus mâles et femelles demeurent phénotypiquement identiques durant tous les stades larvaires de leur cycle de vie hétéroxène. La différenciation sexuelle n'a lieu qu'après l'infestation de leur hôte définitif. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs moléculaires déclenchant cette différenciation chez *Schistosoma mansoni*. Nous avons établi le profil d'expression sexe-dépendant de gènes conservés de la cascade de détermination/différenciation chez les animaux : les *DMRTs* (*Double-sex and Male-abnormal-3 Related Transcription Factors*). Nous avons par ailleurs généré un transcriptome comparatif mâle/femelle (RNA-seq) sur cinq stades de développement *in vivo*, dont trois stades « schistosomules » inédits. Cela nous a permis d'identifier de potentiels gènes « clés » de la différenciation sexuelle et de souligner l'importance de l'interaction hôte-parasite. Enfin, par la combinaison de cette approche transcriptomique et d'une analyse épigénomique (ChIP-seq), nous avons montré une dynamique de la compensation de dose génique au cours du cycle de vie chez les femelles ainsi que la mise en place d'une stratégie transcriptionnelle particulière chez les mâles, optimisant leur développement dans l'hôte et ainsi, leur succès reproducteur.

Abstract

Molecular bases of sex determination and sexual differentiation of a female heterogametic species ZZ/ZW: *Schistosoma mansoni.*

Key words : Sex determination, Sexual differentiation, *In vivo* parasite development, Sex chromosome evolution, Dosage compensation, Chromatin mechanisms, ZZ/ZW female heterogametic system, *Schistosoma mansoni,* Sex-biased genes, High-throughput sequencing (RNA-seq, ChIP-seq).

Parasitic flatworms include more than 20,000 species that are mainly hermaphrodites. Among them, the hundred species of *Schistosomatidae* are intriguing because they are gonochoric. The acquisition of gonochorism in these species is supposed to provide genetic and functional advantages to adapt to their hosts: warm-blooded animals. Sex of schistosomes is genetically determined at the time of fertilization (*i.e.* ZW female heterogametic system). However, there is no phenotypic dimorphism through all the larval stages of its complex lifecycle: sexual dimorphism appears only in the definitive host. The molecular mechanisms triggering this late sexual differentiation remain unclear, and this is precisely the topic of our present work. We performed transcriptomic (RNA-sequencing and quantitative-PCRs) and structural (ChIP-sequencing) analyses at different stages of *Schistosoma mansoni* development. Here, we present data suggesting that the sexual differentiation relies on a combination of genetic and epigenetic factors. In a genetic point of view, we show a sex-biased expression of the *DMRT* genes (*Double-sex and Mab-3 Related Transcription Factors*) that are known to be involved in sex determination/differentiation through all the animal kingdom. In addition, we propose new potential sex-determining key genes and a pivotal role of host-pathogen interaction at the time of development. In a structural point of view, we highlight a dynamic status of dosage compensation in females and chromatin modifications in males. This intense remodeling reveals a specific transcriptomic strategy which optimizes male development and beyond that, schistosomes reproductive success.

Introduction

Partie 1 : De la reproduction sexuée aux déterminants moléculaires du sexe.

"Sexual reproduction is the chef d'oeuvre, the masterpiece of nature." Erasmus Darwin

A. Sexualité et reproduction sexuée.

Différentes définitions de la sexualité peuvent être données selon (1) la datation des mécanismes: depuis l'apparition de la vie sur terre à nos jours ; (2) leur position sur l'arbre du vivant : chez les procaryotes, les protistes, les eumycètes, les végétaux, chez les plus petits ou les géants du règne animal; (3) le niveau d'organisation biologique considéré : phénotypique, organique, cellulaire ou moléculaire. Après un aperçu de ses **dimensions multiples** mais non moins chevauchantes, nous focaliserons sur **une des modalités de la sexualité : la reproduction sexuée**. Enfin, nous intéresserons plus précisément à la notion de **sexes biologiques** (*i.e.* mâles, femelles) et aux **mécanismes moléculaires** sous-jacents.

1. La sexualité : définition(s) générale(s) et origine(s).

Le terme de « sexualité » peut désigner différents concepts. Au sens morpho/physiologique du terme, et dans sa définition la plus large, la sexualité peut concerner l'ensemble du monde vivant. De ce point de vue, l'émergence de la sexualité suivrait de peu l'apparition de la vie sur terre, il y a près de 3,8 milliards d'années. Elle serait alors définie par des **échanges horizontaux, ou latéraux, de matériel génétique entre deux entités n'ayant pas de relation de descendance, permettant l'évolution de l'espèce** (Tableau 1). Dans **l'hypothèse du « monde à ARN »** formulée au début des années 80, l'Acide RiboNucléique (ARN) serait la première forme de vie : les ARNs de transfert (ARNt) constituraient un support d'information aussi capable d'activité catalytique (Guerrier-Takada et al. 1983; Kruger et al. 1982). L'autoreproduction de ces macromolécules d'ARNt et leur recombinaison pourrait être ainsi considérée comme le premier évènement ayant trait à la notion de sexualité (Eigen and Winkler-Oswatitsch 1981). Un autre postulat propose que les premiers échanges génétiques aient été en fait des transferts d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), toujours horizontaux, survenant dans les premières étapes de développement des proto-cellules: c'est la **théorie des « bulles libertines »**. Les « bulles » sont un assemblage de phospholipides protégeant les acides nucléiques de l'environnement, et leur activité « libertine » correspond à l'échange de ces acides nucléiques (Lodé 2011). Cette forme de **« sexualité horizontale »**, c'est-à-dire l'échange de matériel génétique sans rapport de descendance, persiste aujourd'hui fréquemment chez les procaryotes (archées et bactéries) : ils

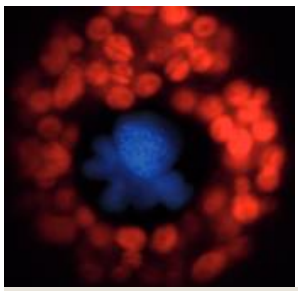


***Image 1*. Kryptoperidinium foliaceum** *(environ 20µm). Les noyaux des deux partenaires sont visibles côte à côte, en bleu : celui du dinoflagellé est rond et brillant, celui de la diatomée est multilobé et moins brillant. En rouge : les plastes chlorophylliens de la diatomée. © P.K*

échangent 1,5 à 14,5% de leur matériel génétique sous forme d'ADN lors des processus de conjugaison, transformation et transduction (Garcia-Vallvé et al. 2000). Il existe aussi des transferts génétiques horizontaux entre des eucaryotes de différents taxons (Keeling and Palmer 2008), franchissant ainsi à la fois non seulement l'obstacle physique de l'enveloppe nucléaire, mais surtout la barrière reproductive des espèces. Ces échanges peuvent être observés dans le cas de phénomènes endosymbiotiques comme dans le cas extrême du *Kryptoperidinium foliaceum* qui présente deux noyaux eucaryotes (Image 1) (Figueroa et al. 2009; Keeling and Palmer 2008). Plus étonnant encore : la coévolution parasitique ou endosymbiotique a souvent permis l'insertion de séquences procaryotes dans les génomes eucaryotes, et ce dans divers phyla (Gilbert and Cordaux 2013).

Tableau 1. Sexualités horizontales: différents types de transferts horizontaux générateurs de diversité génétique.

Type de transfert	Particularités	Apparition	Réf. principales
ADN procaryotes/procaryotes	Spécialisation et complexification des mécanismes : Conjugaison / Transformation / Transduction	Entre 3,8 et 2,5 milliards d'années	(Garcia-Vallvé, Romeu, and Palau 2000)
ADN eucaryotes/eucaryotes	Franchissement barrière reproductrice des espèces	Au cours de la coévolution symbiotique ou hôte parasite	(Keeling and Palmer 2008)
ADN eucaryotes/procaryotes			(Gilbert and Cordaux 2013)

Dans tous les cas que nous venons d'évoquer, la sexualité est principalement caractérisée par son **rôle générateur de diversité génétique**. De façon plus stricte, la sexualité est plus souvent définie non seulement par cet aspect de transmission de matériel génétique, mais aussi par son **but reproductif**. Ainsi, la « reproduction sexuée » peut être considérée comme l'une des modalités de la sexualité (Civard-Racinais and Gouyon 2009). Les quatre grands règnes eucaryotes, qu'ils soient unicellulaires (*i.e.* protistes, Image 2) ou pluricellulaires (champignons, végétaux et animaux), ont donc recours à une sexualité plus complexe, ayant pour but la création de nouveaux individus au patrimoine génétique original : on parle de « procréation ». Ici, le transfert génétique n'est donc pas horizontal (ou latéral) mais vertical, c'est-à-dire d'une génération à la suivante. Le fossile eucaryote le plus ancien montrant des traces de reproduction sexuée est une algue rouge, *Bangiomorpha pubescens*, datant d'1,2 milliard d'années (Butterfield 2000). Dans ce contexte, la sexualité peut être définie comme **l'ensemble des mécanismes moléculaires, physiologiques et éthologiques qui permettent la procréation, à l'échelle d'un individu ou d'une espèce.** La procréation, ou reproduction sexuée, est elle-même caractérisée par la notion **d'originalité génétique et de reproduction** (Tableau 2 pour synthèse).

Image 2. Accouplement de deux protistes **Tetrahymena**.
© ASSET Program, Cornell University.

Tableau 2. La sexualité : différentes modalités, différentes origines.

Type de sexualité	Rôle(s)	Matériel échangé	Apparition		Références principales
Echanges Horizontaux	Création de diversité génétique	ARN	Hypothèse du monde à ARN	+/- 3,8 Ga	(Eigen and Winkler-Oswatitsch 1981)
		ADN	Théorie des bulles libertines		(Lodé 2011)
Reproduction sexuée	Création de diversité génétique et reproduction	ADN	Plus ancien fossile eucaryote *B. pubescens*	+/- 1,2 Ga	(Butterfield 2000)

2. La reproduction sexuée : des mécanismes spécifiques au service de l'originalité génétique.

La reproduction est une des activités fondamentales caractérisant le monde vivant, au même titre que la nutrition ou la croissance. Au sens large, elle peut être définie comme **l'ensemble des processus mis en place par une espèce pour lui permettre de se perpétuer.** Comme nous l'évoquions précédemment, et contrairement à ce que laisserait entendre le terme « reproduction » en son sens littéraire, ces processus aboutissent le plus souvent à la production **d'individus originaux, génétiquement différents de la génération qui les précède.** 95% des espèces eucaryotes, des unicellulaires aux plus grands métazoaires, se reproduisent selon un mode dit « sexué ». Les mécanismes impliqués dans cette reproduction sexuée sont très variés entre les espèces mais deux lui sont spécifiques et sont communs à la majorité des taxons: (1) la **méiose** et (2) la **fécondation**. La méiose est un mécanisme de réduction du matériel génétique conduisant à la production de cellules reproductrices haploïdes et originales que sont les **gamètes**. La fécondation correspond à la fusion ultérieure de ces gamètes pour générer une nouvelle cellule diploïde, qui se développera en un organisme au patrimoine génétique singulier. Le **brassage génétique** est ainsi assuré à plusieurs niveaux : il y a d'abord une distribution aléatoire du patrimoine génétique parental dans les gamètes, puis association stochastique de ces dernières lors de la fécondation.

a. La méiose.

Comme nous venons de rapidement la définir, la méiose est une division cellulaire spécifique à la reproduction sexuée, permettant la **réduction du matériel génétique parental**. Chez les métazoaires, elle concerne les cellules germinales et correspond à la première étape de la gamétogenèse. La méiose est caractérisée par la succession de deux divisions cellulaires : (1) la **méiose 1** pendant laquelle il y a **réduction du matériel génétique** et (2) la **méiose 2**, dite **équationnelle**, qui correspond à une division mitotique classique (Figure 1). Elle permet donc à un organisme diploïde de générer des cellules originales haploïdes. La diploïdie sera ensuite rétablie lors de la fécondation. Le caryotype est ainsi maintenu et la reproduction est autorisée « à l'infini ». Lors de la première division méiotique, les chromosomes homologues s'apparient et échangent des fragments de

chromatides par un mécanisme de **recombinaison intra-chromosomique**. C'est le phénomène d'**enjambement** (Janssens 1909) classiquement nommé « *crossing-over* », qui constitue la première étape du brassage génétique. Lors de l'anaphase qui s'en suit, les chromosomes se ségrégent de façon aléatoire : nous parlons alors d'assortiments indépendants (**brassage interchromosomique** : *2n* combinaisons possibles, « *n* » étant le nombre de chromosome de l'espèce en question). Chaque cellule fille issue de cette première division est donc haploïde et possède un **patrimoine génétique original** grâce à la superposition des brassages intra- et inter-chromosomiques. Les chromosomes ainsi répartis sont bi-chromatidiens et la seconde division méiotique pourra donc avoir lieu sans étape préalable de synthèse d'ADN. Enfin, les cellules obtenues à l'issue de ces deux divisions subiront une étape de maturation pour devenir gamètes (*i.e.* formation du flagelle des spermatozoïdes).

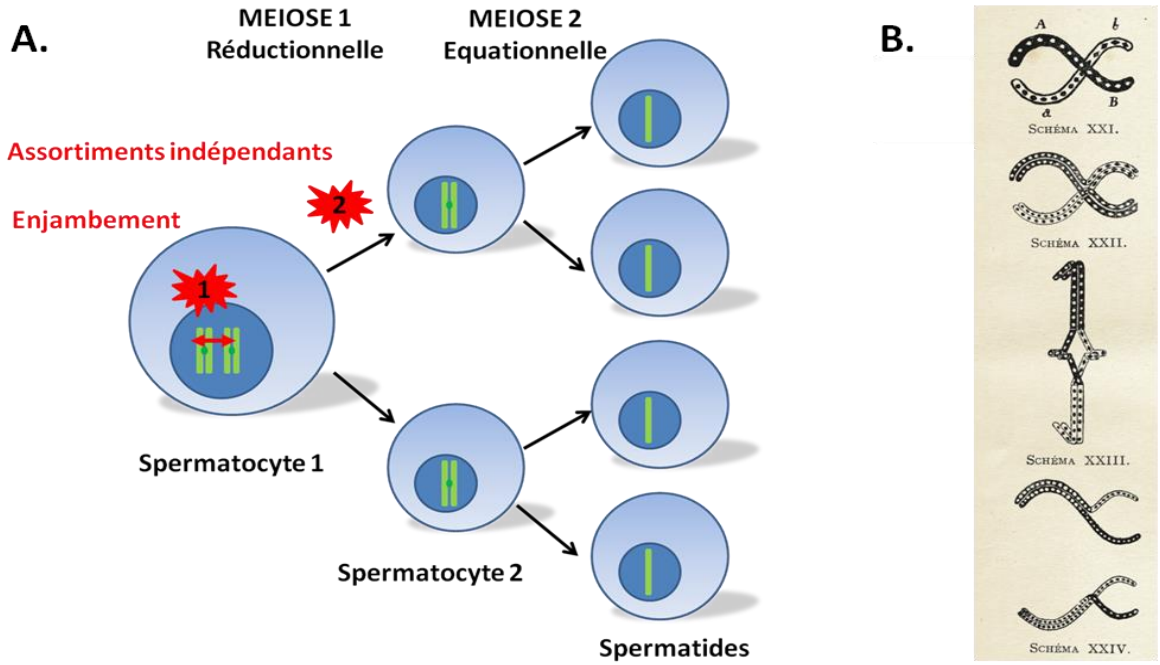


Figure 1. Méiose et innovation génétique.
A. Sources d'innovation génétique lors de la méiose1 :
(1) Enjambement lors de l'appariement des chromosomes homologues : brassage intrachromosomique.
(2) Assortiments indépendants lors de l'anaphase de la première méiose : brassage interchromosomique.
B. Illustration de l'échange de segments chromosomiques par Janssens (©La théorie de la Chiasmatypie, 1909)

La méiose chez les protozoaires (eucaryotes unicellulaires) constitue un cas particulier : chez les ciliés par exemple, la réduction du matériel génétique précède la reproduction sexuée et conduit à la formation d'individus haploïdes et non de gamète. La réduction du matériel génétique peut aussi avoir lieu après la rencontre des matériels génétiques parentaux : les espèces du genre *Plasmodium* par exemple, possèdent un cycle de vie monogénétique haplophasique et le zygote sera la seule cellule diploïde de ce cycle.

b. Les gamètes.

Les gamètes issus du mécanisme de méiose peuvent être morphologiquement différents (**anisogamie**) ou isomorphes (**isogamie**). Chez les espèces anisogames, on peut distinguer deux types de gamètes dîts « mâles » et « femelles » à la morphologie et au contenu différents. De façon générale, les gamètes femelles sont plus grands et moins nombreux que les gamètes mâles. Leur riche contenu cytoplasmique sera responsable du métabolisme de l'œuf et donc de la survie du zygote. Et c'est précisément là, la raison de **l'évolution d'un état ancestral isogame vers l'anisogamie** (Parker and Lehtonen 2014) : (1) la formation de gamètes volumineux est coûteuse en énergie mais leur fonction de réserve présente un avantage pour le développement du zygote, alors que (2) la production de petits gamètes mobiles est moins coûteuse en énergie et permet d'augmenter considérablement les chances de rencontre. Il s'agit d'un phénomène de sélection non stabilisante (Parker et al. 1972) : un morphe intermédiaire de gamètes ne représenterait pas d'avantage, l'apparition de deux morphes divergents est donc favorisée. Il y a ainsi mise en place d'un compromis évolutif entre la taille et le nombre de gamètes. Une fois émis, la rencontre de ces deux types de gamètes est facilitée par leur mobilité, active ou passive selon qu'ils sont munis d'un flagelle ou non. Chez les individus sessiles, ces gamètes constituent la seule forme mobile et sont ainsi responsables de la dissémination de l'espèce. Classiquement, la gamétogenèse, ou formation des gamètes, a lieu dans des **organes spécialisés appelés gonades.** Mais cette **gamétogenèse peut être diffuse,** comme chez certains annélides où elle a lieu au niveau mésodermique.

c. La fécondation.

« L'une des observations les plus fascinantes que puisse faire toute personne intéressée par les sciences de la vie est de voir s'accomplir la fécondation directement sous ses yeux, au microscope. »
(Gehring 1999)

La fécondation est définie par la rencontre des gamètes, ou plus largement la **rencontre de deux lots parentaux de matériel génétique**. Elle marque la première étape vers le développement d'un nouvel organisme. La fusion des *pronuclei* des gamètes au sein de l'ovocyte pour former la cellule œuf diploïde est appelée **amphimixie** ou **caryogamie**, et l'œuf ainsi formé s'appellera **zygote**. Comme évoqué précédemment, ce zygote est un **individu génétiquement original** et la rencontre aléatoire des gamètes constitue le dernier niveau de brassage génétique.

Selon la provenance des gamètes, on peut définir un mécanisme d'**auto-fécondation** et un mécanisme d'**allo-fécondation**. Dans le premier cas, les deux types de gamètes proviennent du même individu alors que dans le second cas les gamètes proviennent de deux individus différents. Un individu pouvant produire les deux types de gamètes est appelé **hermaphrodite** alors qu'une espèce présentant des individus porteurs d'un seul type de gamète est qualifiée de **gonochorique** *(Cet aspect physiologique sera développé plus tard dans l'introduction)*. Les hermaphrodites peuvent faire de l'auto- ou de l'allo-fécondation, alors que les individus gonochoriques sont contraints à l'allo-fécondation. Cependant, **l'allo-fécondation est souvent privilégiée** même chez des individus hermaphrodites (Barrett 2010) car elle permet une plus grande diversité génétique. Se pose alors le problème de la **rencontre de ses gamètes** provenant d'individus différents. Chez les espèces mobiles les individus mâles et femelles doivent trouver un partenaire du sexe opposé. Un processus de sélection peut éventuellement s'opérer lors de ces rencontres (*i.e.* compétition et choix sexuels

caractérisant la sélection sexuelle). Chez les espèces sessiles, les gamètes devront être libérés dans le milieu de vie comme chez les cnidaires, ou être transportés par un tiers comme les insectes pollinisateurs. Cette nécessité de rencontre va solliciter à la fois **l'allocation de ressources énergétiques et de temps** (1) chez les espèces mobiles : recherche du partenaire, structures anatomiques spécialisées pour la séduction et/ou la copulation ; (2) chez les espèces sessiles : synchronisation de l'émission des gamètes et production importante pour compenser les « pertes ».

3. Pourquoi choisir la reproduction sexuée ?

De la complexité des mécanismes de la reproduction sexuée émergent donc **plusieurs contraintes** : (1) La **mise en place de structures anatomiques** (*i.e.* gonades) et **de mécanismes cellulaires** (*i.e.* méiose) **spécialisés dans la fonction de reproduction**. (2) L'obligation chez les espèces gonochoriques de **trouver un partenaire**. (3) La question du choix de ce partenaire, impliquant les notions de compétition et de **sélection sexuelle**. Dans ce contexte de sélection sexuelle, certains caractères phénotypiques sont très visibles (*i.e.* la queue du paon) et ces individus « visibles » sont potentiellement plus exposés aux prédateurs. Cela soulève donc la question de la pertinence de tels mécanismes en termes de survie de l'espèce. Cependant, nous l'avons vu : la reproduction sexuée est majoritairement adoptée par le monde eucaryote (95% des espèces), et nous pouvons nous demander donc quels sont les avantages d'un tel mode de reproduction ? Nous aborderons ici les principales hypothèses évolutives justifiant le maintien de la reproduction sexuée, et au-delà, du gonochorisme. Notons que ces théories ne sont pas exclusives et nous observons certainement la **résultante de plusieurs de ces mécanismes évolutifs.**

a. Quelle(s) alternative(s) ? Les modes non-sexués de reproduction.

Le terme de « reproduction » est couramment réservé à la reproduction sexuée, ou procréation, malgré le paradoxe littéraire que nous évoquions précédemment (création d'individus originaux et non « reproduction » à l'identique). Ainsi, nous parlerons ici de **« multiplication » asexuée**. Elle peut être aussi qualifiée d'agame (ne mettant pas en jeu de gamète), ou somatique, ou végétative. C'est une **multiplication simple donnant une descendance génétiquement identique à l'organisme parental** (aux mutations près). Si elle concerne des individus unicellulaires, la multiplication végétative prend la forme d'une simple division mitotique : une première étape de réplication de l'ADN suivie d'une division en deux cellules filles identiques. On parle de **scissiparité**. La scissiparité peut également concerner des individus pluricellulaires : les annélides peuvent se diviser en deux individus qui génèreront deux organismes identiques. Certains helminthes se segmenteront transversalement de façon spontanée, ce phénomène est appelé strobilation. Le bourgeonnement ou gemmiparité correspond lui à la différenciation de cellules totipotentes d'un organisme par ailleurs différencié. Les nouveaux organismes ainsi générés portent le même patrimoine génétique que l'individu dont ils sont issus.

b. Quelle(s) alternative(s) ? La parthénogenèse, un mode de reproduction intermédiaire.

« Il n'y a pas de plus grand mystère au monde me semble-t-il que l'existence des sexes, particulièrement depuis la découverte de la parthénogenèse » Charles Darwin

La parthénogenèse occupe un statut que l'on pourrait qualifier d'**intermédiaire** car elle fait intervenir un mécanisme de **méiose** et la formation d'un ovocyte (gamète femelle). Mais cela ne sera pas suivi par une étape de fécondation et il n'y aura **pas d'intervention de matériel génétique mâle** (pas d'amphimixie). Quid de la diploïdie ? Deux cas de figure possibles : (1) **Retour à la diploïdie** pendant la méiose par fusion du second globule polaire (issu de l'étape de méiose 2) ou par absence de l'étape de méiose 1 réductionnelle. L'ovocyte issu de la méiose parthénogénétique est donc particulier dans la mesure où il est diploïde et non haploïde comme classiquement décrit. (2) On peut également observer un retour à la diploïdie post-méiotique par endo-mitoses lors de la segmentation, ou par la fusion des deux blastomères lors de la première division cellulaire de l'œuf.

Chez les espèces parthénogénétiques, il est curieux d'observer parfois la conservation d'un aspect « social » de la reproduction : cela peut être sous la forme d'une **stimulation mécanique pseudo-copulatoire**. Chez *Cnemidophorus uniparens* qui est une espèce parthénogénétique de lézards fouette-queue, les femelles adoptent des comportements copulatoires alternativement « male-caractéristiques » ou « femelle-caractéristiques » gouvernés par les hormones sexuelles (Dias and Crews 2008). Cet acte pseudo-copulatoire est le déclencheur du retour à la diploïdie et du développement de l'œuf. Chez ces espèces, la **reproduction sexuée classique est un état ancestral** et les **espèces parthénogénétiques seraient plus récentes** (Crews et al. 1986).

c. Maintien de la reproduction sexuée au cours de l'évolution.

« It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change. » (Charles Darwin)

Gonochorisme : un « double-coût » du sexe ?

Parmi les paradoxes évolutifs de l'existence de gamètes distincts mâles et femelles, il y a **la nécessité des individus à être deux** pour pouvoir se reproduire. En effet, chez les espèces gonochoriques cela **limite la descendance** comparativement à des populations parthénogénétiques ou asexuées dans lesquelles chaque individu peut potentiellement se reproduire, et les mâles consomment des ressources pour leur survie propre sans pouvoir engendrer eux-mêmes de descendance : c'est le « double-coût du sexe » (Maynard Smith 1978). Cette notion doit être cependant modérée car elle ne prend pas en compte **l'investissement paternel** pour la survie de la progéniture chez certaines espèces. Par exemple chez les espèces monogames (qui représentent 90% des oiseaux et 56% des mammifères), les mâles peuvent être investis dans la construction d'un nid (investissement pré-zygotique) ou dans l'alimentation de la progéniture (investissement post-zygotique). Cela conduit à une **augmentation de la valeur sélective de la progéniture** et compenserait, au moins partiellement le « double-coût du sexe ».

Cliquet de Müller (Muller 1964) vs méiose réparatrice.

De façon générale, la notion métaphorique de « cliquet » peut définir tous types de mécanismes maintenant un système en l'état en **empêchant son retour en arrière**, à la manière dont le cliquet d'une horloge oblige la roue à tourner dans un seul sens (Voir Image 4). Hermann Müller, dans son article de 1964, a cherché à modéliser l'évolution d'une **population haploïde** se reproduisant exclusivement de façon **asexuée** : si dans cette population les porteurs d'aucune mutation délétère (représentant la classe optimale) étaient peu nombreux et ne parvenaient plus à se reproduire, alors cette classe optimale disparaîtrait (le cliquet aurait avancé d'un cran), et **la nouvelle génération aurait au moins autant de mutations que les parents**. Les mutations délétères s'accumuleraient donc inévitablement. Or, selon les modalités classiques de la reproduction sexuée, la **recombinaison méiotique** permettraient l'élimination de ces mutations délétères à chaque génération (Kondrashov 1988). On parle de **méiose réparatrice**.

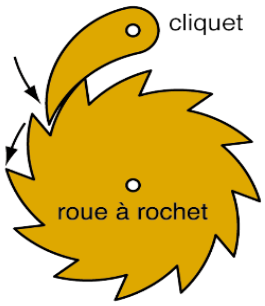


Image 3. Principe du « cliquet »
Définition mécanique : Le cliquet est un mécanisme qui, inséré dans la denture d'une crémaillère, empêche un retour en arrière à chaque déplacement de la crémaillère.
© Roby

Complémentation et hétérozygotie.

Un autre mécanisme pourrait permettre non pas d'éliminer les mutations délétères, mais de les « masquer » par la **dominance des allèles non mutés** d'un autre génome. Cette complémentation joue également un rôle dans les phénomènes d'hybridation et d'hétérosis (ou vigueur hybride) où on observe une dominance des « meilleurs allèles ». Ce concept est indissociable de la notion d'**hétérozygotie**, qui est définie par la présence de deux allèles différents d'un même gène chez un même individu. En cas d'altération de l'ADN, sa réparation conduit souvent à la copie d'un court segment d'ADN d'un chromosome homologue à un autre, ce qui entraîne une perte de la diversité génétique et, à long terme, la création de lignées homozygotes. Le mécanisme **de recombinaison méiotique permettrait de rétablir l'hétérozygotie** et au-delà autoriserait donc le mécanisme de complémentation. Par ailleurs, le maintien de cette hétérozygotie et les mécanismes de reproduction sexuée permettent le **renouvellement incessant de la diversité génétique d'une espèce**, ce qui permet d'envisager deux autres hypothèses : l'hypothèse de la « loterie », et celle de la variabilité génétique indispensable à l'adaptation.

« Tangled bank theory », ou hypothèse de la « loterie » (Ghiselin 1974).

Ghiselin propose que la variabilité des individus au sein d'une même espèce puisse présenter l'avantage d'une capacité d'exploitation de différentes ressources. Cela **diminuerait la compétition entre les individus** et rendrait possible **l'occupation d'un plus grand nombre de niches** dans un environnement hétérogène.

Adaptation et « variabilité génétique indispensable ».

La variabilité pourrait favoriser, par **sélection naturelle**, l'adaptation des espèces sexuées aux changements de leur environnement (Burt 2000). En effet, le brassage génétique permet **l'addition de plusieurs mutations positives** (apparues ponctuellement chez les parents) dans le génome de la descendance. Dans des populations asexuées, la probabilité pour qu'un même clone additionne toutes ces mutations positives est très faible et de trop nombreuses générations seraient nécessaires (Weismann 1889; Muller 1932). L'avantage inféré par cette capacité d'adaptation peut se concrétiser à une courte échelle temporelle chez certaines espèces, comme la daphnie, qui se reproduit

parthénogénétiquement dans un environnement normal, ou sexué dans un environnement stressant (Roulin et al. 2013). *Kryptoperidinium foliaceum* (le dinoflagellé à double noyau eucaryote, Image 1) peut quant à lui adopter alternativement un mode sexué ou asexué de reproduction. Bien que les mécanismes ne soient que partiellement connus, il semblerait qu'un environnement stressant favorise une stratégie de reproduction sexuée (Figueroa et al. 2009). A l'échelle évolutive, on peut constater que **toutes les espèces eucaryotes pratiquant un mode de reproduction asexué sont récentes** (A l'exception des rotifères bdelloïdes, Encart 1). Cela s'expliquerait par le fait que les espèces pouvant devenir clonale le deviendraient (par envahissement des génotypes se multipliant de façon asexuée : leur « productivité » est meilleure), mais cette stratégie ne serait pas viable au long terme et conduirait à l'extinction de ces espèces par manque de capacité d'adaptation (Gouyon 1999). Elles sont parfois qualifiées de « culs-de-sac évolutifs ». **Il semblerait donc qu'au-delà de la perpétuation de l'espèce, la reproduction sexuée permette son évolution, ce qui serait une composante essentielle à son maintien** (Figure 2).

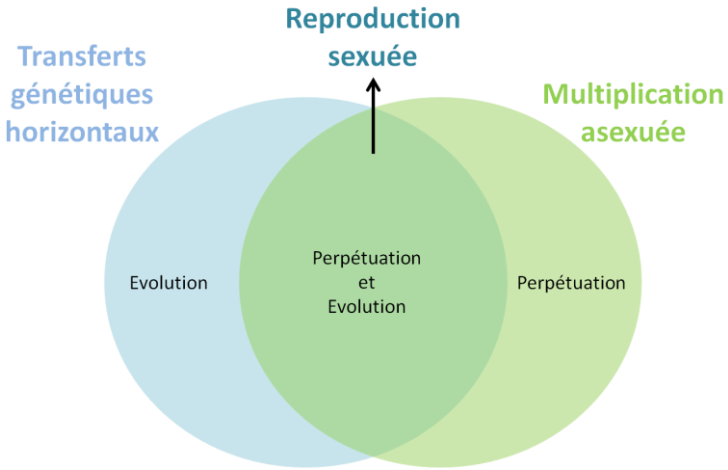


Figure 2. Chevauchement des différentes stratégies de reproduction et de création de diversité génétique.

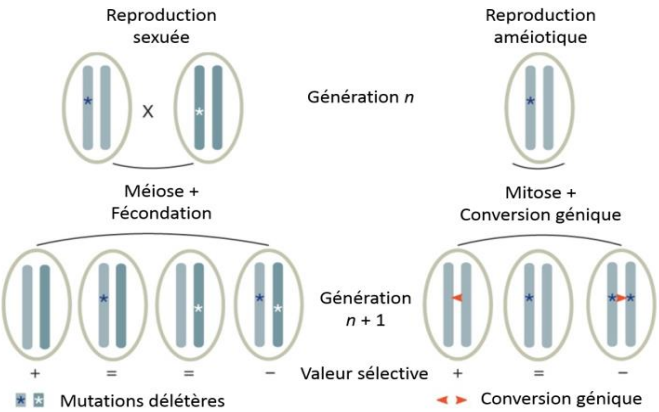
ENCART 1. LE SCANDALE DES ROTIFERES BDELLOÏDES

Image 4. **Adineta vaga**
©J-F Flot et al. 2013

L'embranchement des rotifères compte environ 450 espèces et un ancêtre commun ayant abandonné la sexualité… il y a plus de **80 millions d'années** ! Ce constat contredit toutes les théories, à tel point que le biologiste John Maynard Smith les a qualifiés de « **scandale évolutif** ». Ce sont de petits platyzoaires d'eau douce pouvant traverser de grandes périodes de sécheresse en se déshydratant complètement. A l'issue de cette dessiccation, qui peut durer des années, leur ADN peut être très endommagé, voire fragmenté. Ils ont ainsi développé différents mécanismes permettant la réparation de cet ADN: ils peuvent notamment **intégrer horizontalement des gènes d'autres espèces, et les garder fonctionnels**. Ainsi, leur génome contient des fragments d'ADN de végétaux, champignons, bactéries et autres animaux (cela représente 8% de la taille totale du génome !). Ils possèdent une capacité de **conversion génique** élevée, ce qui leur permet d'éviter l'accumulation des mutations délétères (Figure 3). Ces caractéristiques entraînent une structure particulière du génome qui interdit le mécanisme de méiose et donc, la reproduction sexuée (Figure 4) (Flot et al. 2013). Ainsi, les rotifères sont les premiers « vieils» eucaryotes à reproduction non-sexuée (reproduction parthénogénétique). Nous pouvons peut-être les considérer comme « l'exception qui confirme la règle » ? En effet, ces espèces doivent finalement leur survie à des mécanismes particulièrement performants de renouvellement de leur ADN, ce qui est le propre de la reproduction sexuée classique.

Figure 3. La conversion génique et ses conséquences évolutives chez les organismes améiotiques.

La conversion génique peut permettre le remplacement d'un allèle délétère par un allèle neutre ou bénéfique auquel cas la valeur sélective de la descendance augmente (+) ou elle peut entraîner la duplication de cet allèle délétère, auquel cas la valeur sélective de la descendance diminue (-). Ces deux scenari seraient finalement les mêmes que ceux obtenus dans le cas de la reproduction sexuée.
©J-F Flot et al. 2013



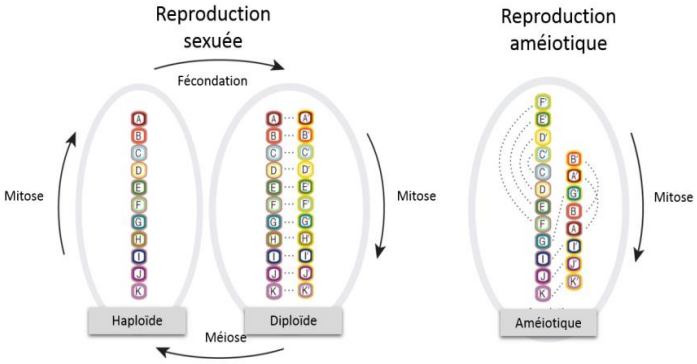


Figure 4. Confrontation de la structure génomique d'une espèce à reproduction sexuée et d'une espèce améiotique.

La première possède 2 allèles pour chacun de ses gènes (A-A' à K-K'), arrangés co-linéairement sur des chromosomes homologues. La seconde possède des allèles répartis aléatoirement, parfois répétés sur un même chromosome. Cette combinaison empêche l'appariement des chromosomes et donc le phénomène de méiose.
©J-F Flot et al. 2013

4. Reproduction sexuée et parasitisme.

Les interactions hôte(s)-parasite(s) présentent un intérêt particulier dans ce contexte d'adaptation. En effet, dans un sens l'hôte constitue un environnement variable pour les parasites, et dans l'autre sens les parasites pathogènes constituent la principale pression de sélection pour un hôte (Hamilton 1980). La reproduction sexuée et la création d'originalité génétique permettraient une évolution incessante de cette interaction : La **théorie de la reine rouge** (ou « course aux armements ») peut être résumée par la création permanente de nouvelles adaptations, permettant la coévolution hôte-parasite sans que la valeur relative de chacune de ces adaptations ne change (Image 5) (Van Valen 1973). Ainsi, la reproduction sexuée permettrait un **pouvoir de résistance héréditaire au parasitisme** (Hamilton 1980). Cela est soutenu par différents faits, par exemple : (1) Plus la pression du parasitisme augmente et plus la proportion d'individus sexués augmente au sein de certaines populations d'escargots (Lively 1987). (2) Au sein d'une même espèce de lézards, les individus sexués semblent présenter des charges parasitaires moindres que les individus parthénogénétiques (Moritz et al. 1991).

Image 5. Illustration de John Tenniel des « Aventures d'Alice au pays des merveilles » *de Lewis Carroll (1866) :*
« The red queen has to run faster and faster in order to keep still where she is. That is exactly what you all are doing.»

Au-delà de cette co-évolution, ces interactions hôte(s)-parasite(s) auraient une conséquence directe sur le phénotype de l'individu, et ainsi un rôle dans la sélection sexuelle. Les parures des mâles en bonne santé seraient plus « séduisantes », et donc les femelles iraient vers les mâles potentiellement plus porteurs de gènes de résistance aux pathogènes (Hamilton and Zuk 1982). Cela conduirait à la prédiction que **l'intensité de la charge parasitaire serait inversement corrélée au succès reproducteur du mâle**. Zahavi exagère encore cette relation entre les phénotypes visibles de la sélection sexuelle et la résistance aux pathogènes. Selon lui, la **mise en place de traits sexuels exagérés serait un renforcement du signal de séduction** : si l'individu survit malgré ce handicap (visibilité par les prédateurs), c'est que par compensation les gènes dont il est porteur seraient vraiment avantageux.

Partie IA - SEXUALITE ET REPRODUCTION SEXUEE : CONCLUSIONS.

De façon générale, la sexualité peut être définie par l'échange de matériel génétique entre deux individus ou entités, et en cela elle peut être considérée comme aussi ancienne que la vie sur terre. La reproduction sexuée est une modalité de la sexualité et correspond à la transmission verticale de matériel génétique : des mécanismes cellulaires spécifiques permettent la création d'originalité génétique à chaque génération. Cette innovation incessante est précisément la raison pour laquelle ce mode de reproduction est adopté par la grande majorité des espèces du monde vivant : malgré les coûts qui lui sont associés, ce mécanisme leur permet de s'adapter aux changements de leur environnement.

Lors de cette reproduction sexuée, l'échange de matériel génétique a lieu par l'intermédiaire de cellules spécialisées appelées gamètes. Nous allons voir à présent comment la nature de ces gamètes peut définir l'identité des individus.

B. Questions d'identité(s) sexuelle(s).

1. Etre « un » ou « deux » (ou « plus »)? Hermaphroditisme, gonochorisme (et types de compatibilité).

Comme nous le savons, la reproduction sexuée repose classiquement sur la présence de gamètes. Au sein d'une même espèce, tous les gamètes ne sont pas compatibles entre eux. Ainsi, même dans le cas des espèces isogames (gamètes morphologiquement identiques), un individu d'un *mating type* ou d'un « **type de compatibilité** » donné ne peut se reproduire qu'avec des individus de types différents (Billiard et al. 2011). Les champignons par exemple peuvent présenter des centaines de types de compatibilité (Beukeboom and Perrin 2014), définis au niveau de régions spécifiques du génome appelées *« mating-type regions ».* Le développement d'un zygote n'est possible que s'il est issu de deux types de compatibilité distincts (Haag 2007; Perrin 2012). Du point de vue moléculaire, il est supposé que l'apparition de gènes contrôlant la taille des gamètes au niveau d'une *mating type region* pourrait être responsable du passage de l'isogamie vers l'anisogamie (Ferris et al. 2010). Dans le cas de ces espèces anisogames, c'est précisément cette **anisogamie qui va définir l'identité sexuelle mâle ou femelle des individus**: un individu **hermaphrodite** peut produire les deux types de gamètes alors qu'un individu **gonochorique** n'en produit qu'un seul type. Bien que cette question de l'identité sexuelle soit commune à tout le monde vivant, nous restreindrons ici notre étude au règne animal.

a. L'hermaphrodisme.

Chez les espèces hermaphrodites, les individus peuvent donc produire deux types de gamètes. Ils peuvent présenter des gonades mixtes (ovotestis) ou des gonades mâles (testicules) et femelles (ovaires). Les gonades mâles et femelles peuvent être portées soit **simultanément** (*i.e.* chez le mollusque *Biomphalaria glabrata*), soit **successivement**. Dans ce dernier cas, on distingue les espèces **protandres** (exemple de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*) et les espèces **protogynes**, (exemple du mérou brun *Epinephelus marginatus*). L'hermaphrodisme séquentiel peut être expliqué si la fécondité des individus est, par exemple, influencée par leur taille. C'est le « *size advantage model* » (Warner 1988) : si un petit mâle peut être très fertile alors qu'une grande taille est plus optimale à la fécondité femelle, alors cela peut expliquer un hermaphroditisme protandre. Inversement, chez certaines espèces sociales à harem il peut être plus stratégique pour un mâle d'être gros afin d'augmenter son succès reproducteur, ces espèces seront donc plus certainement protogynes. De façon générale, les espèces hermaphrodites seraient des espèces pour lesquelles les opportunités de rencontre seraient diminuées, ayant par exemple une faible densité de population (Ghiselin 1969; Eppley and Jesson 2008). Cela est cependant encore discuté car il existe certains crustacés hermaphrodites qui deviennent gonochoriques lorsque la densité de population diminue (Yusa et al. 2012).

b. Gonochorisme, sélection sexuelle et dimorphisme.

Apparition du gonochorisme.

A la façon dont l'isogamie évolue vers l'anisogamie, on peut imaginer que l'hermaphrodisme évolue vers le gonochorisme par **compromis évolutif : un caractère augmentant la valeur sélective des mâles diminuerait la valeur sélective des femelles**. Cette hypothèse est confortée par une étude

montrant que l'abolition artificielle de la production de sperme chez une limnée hermaphrodite va augmenter sa gamétogenèse femelle (De Visser et al. 1994). Ainsi les sexes séparés apparaîtraient avec des allèles augmentant ou diminuant la fertilité de l'un des sexes (Bachtrog et al. 2014), et par la constitution de populations intermédiaires gynodioïques ou androdioïques. Dans le premier cas (gynodioécie), la transition du système hermaphrodite vers le système gonochorique est illustrée par une population d'individus hermaphrodites et femelles, alors que dans le second cas (androdioécie) on peut simultanément observer des hermaphrodites et des mâles. Une autre hypothèse, non-contradictoire, serait que le gonochorisme serait un moyen de **prévenir l'autofécondation et donc une dépression endogamique** (goulot d'étranglement génétique ou diminution de la diversité allélique).

Sélection sexuelle.

Une des conséquences fondamentales de l'anisogamie et du gonochorisme est l'apparition de rôles distincts pour chacun des sexes. La compétition entre les sexes découle en premier lieu de la nature même des gamètes. Comme nous l'avons dit précédemment, les gamètes mâles sont produits en beaucoup plus grande quantité que les gamètes femelles, ce qui conduit à un **succès reproducteur mâle potentiellement plus élevé.** Les femelles ne pouvant pas multiplier les opportunités de reproduction vont généralement compenser par le **choix de leur partenaire** afin d'optimiser la valeur sélective de leur descendance. L'une des conséquences de cette force de **sélection sexuelle** est la nécessité pour les mâles de « séduire ». On parle alors de **compétition pré-copulatoire** (nous n'aborderons pas ici la compétition spermatique post-copulatoire). Ce concept de sélection sexuelle, dérivant de la théorie de la sélection naturelle de Darwin, désigne ainsi la pression exercée par la compétition entre les individus (d'une même espèce et d'un même sexe) sur l'évolution de certains traits héréditaires (comme certains phénotypes exagérés du **dimorphisme sexuel**). Le ***sex-ratio***, qui est la proportion de mâles par rapport au nombre de femelles au sein d'une espèce, peut influencer **la direction et l'intensité de cette compétition** pour l'appariement. Le mode d'appariement lui-même (*i.e.* monogamie, polygamie, polyandrie) peut moduler cette notion de *sex-ratio* : on parle alors **de *sex-ratio* opérationnel** (prend en compte également la fertilité des individus et la disponibilité de ceux-ci pour la reproduction). Par exemple, la polyandrie (*i.e.* plusieurs partenaires mâles pour une même femelle) peut entraîner un *sex-ratio* opérationnel biaisé femelle et une compétition pré-copulatoire au sein de ce sexe (Gwynne 1991). Chez certaines espèces comme le chevalier grivelé (oiseau), cela n'interdit pas une compétition ponctuelle entre mâles (Gwynne 1991).

Dimorphisme sexuel.

« Si l'empire appartenait à la beauté et non à la force,
le paon serait, sans contredit, le roi des oiseaux.» (Buffon and De Montbeillard 1770)

Image 6. Roue du paon mâle.
© Jean-Marc Ancelin

L'ensemble des différences morphologiques entre mâles et femelles d'une même espèce est regroupé sous la notion de « **dimorphisme sexuel** ». L'illustration spectaculaire, et la plus souvent évoquée, de ces différences phénotypiques est celle de la queue du paon (Image 6). Nous ne développerons pas plus ici les mécanismes évolutifs conduisant à l'apparition de ce dimorphisme, mais allons plutôt nous intéresser à ses bases moléculaires.

2. Quels sont les mécanismes conduisant à l'apparition du dimorphisme sexuel ?

a. Déterminisme *versus* différenciation.

Deux types de mécanismes permettent la mise en place des phénotypes mâles et femelles: le **déterminisme sexuel** d'abord, et la **différenciation sexuelle** ensuite. Chez les mammifères, le déterminisme du sexe repose sur l'existence des chromosomes sexuels XX (chez les femelles) et XY (chez les mâles) et du déterminant génétique Y-spécifique *SRY* (chez les mâles). *SRY* est **l'élément « interrupteur »** s'exprimant de façon locale (gonadique) et ponctuelle (dans les premières phases du développement embryonnaire). Son expression déclenche la mise en place des caractères sexuels primaires, c'est-à-dire les gonades (Eggers and Sinclair 2012) puis la différenciation secondaire (à l'échelle du corps entier) est induite par les **hormones sexuelles** produites par ces gonades (Ono and Harley 2013). Ce développement en deux temps a longtemps influencé notre vision dichotomique des concepts de déterminisme et différenciation : **la cascade déterminante entraînerait la sexualisation des gonades et la cascade différenciante entraînerait la sexualisation des cellules somatiques** (Figure 5). En fait, chez les autres espèces **le déterminisme du sexe concerne individuellement chaque cellule de l'organisme**, ce qui n'exclue cependant pas le rôle de molécules sécrétées de type hormones. C'est le cas chez les oiseaux (Zhao et al. 2010) (Figure 5), la drosophile (Robinett et al. 2010) ou les nématodes (Wolff and Zarkower 2008). Nous parlerons ici de **déterminisme somatique du sexe.** Ainsi chez *Drosophila melanogaster*, les effecteurs de la cascade du déterminisme (*dsx* et *fru*) ne sont pas exprimés dans toutes les cellules : certaines cellules sont sexualisées et d'autres pas (Robinett et al. 2010)**.** Cela conduit parfois à l'apparition d'animaux mosaïques (Hannah-Alava and Stern 1957), ou d'individus gynandromorphes comme chez le poulet (Zhao et al. 2010). Chez certaines espèces, comme la truite arc-en-ciel, le sexe des gamètes (ovocytes ou spermatozoïdes) va même dépendre des cellules somatiques environnantes et non du sexe gonadique (Yoshizaki et al. 2010). Chez la drosophile et le poulet le sexe gonadique et le sexe somatique doivent être identiques pour produire des gamètes (Zhao et al. 2010). Ainsi, pour résumer, chez les animaux autres que mammifères **le déterminisme sexuel correspond à la superposition des déterminismes gonadiques et somatiques** (Figure 5). **La différenciation induite par les hormones sexuelles s'additionnera à la différenciation individuelle** des cellules. Ici les concepts de déterminisme et de différenciation sont donc plus chevauchants.

Image 7. **Gallus gallus *gynandromorphe.***
© Zhao et al. 2010

Dans un premier temps nous allons nous intéresser aux facteurs initiaux du déterminisme sexuel (sans distinguer le déterminisme gonadique du déterminisme somatique), puis nous nous focaliserons sur les différents modes de déterminisme chromosomique du sexe. Enfin, nous verrons que les acteurs des cascades moléculaires sont plutôt très conservés malgré la diversité de ces facteurs déterminants et les différentes combinaisons de déterminismes gonado/somatiques que nous venons brièvement de décrire.

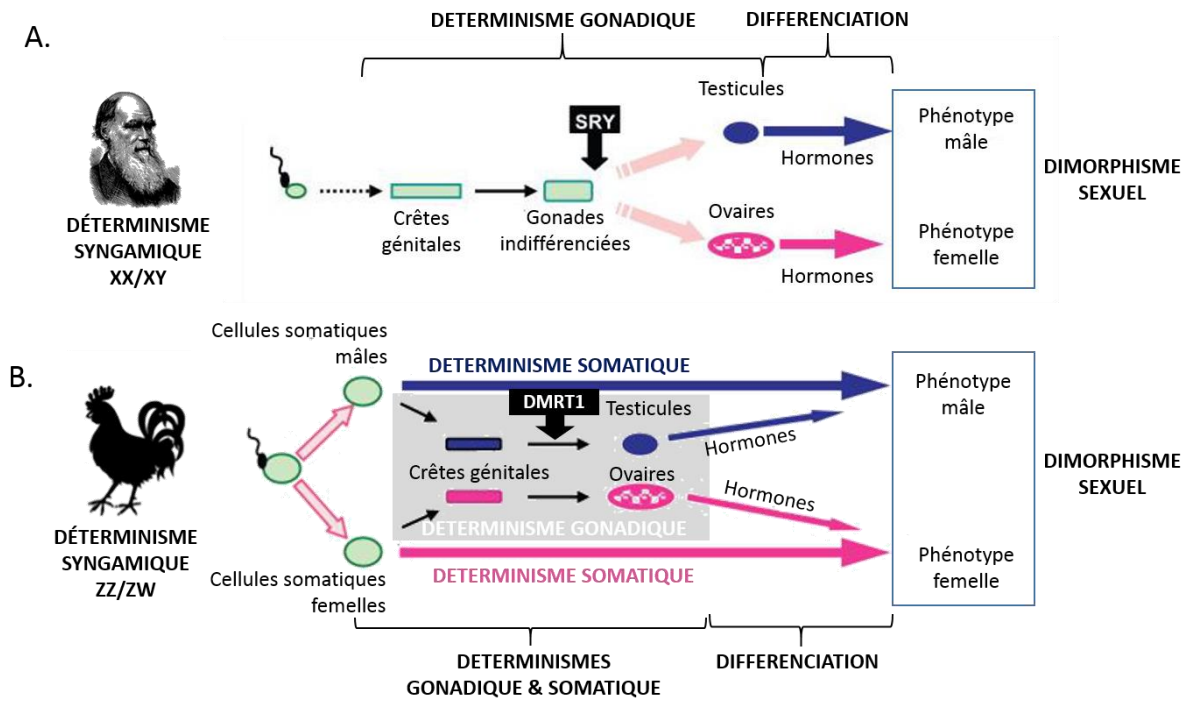


Figure 5. Comparaison des concepts de « déterminisme » et de « différenciation » chez les mammifères (A) et le poulet (B). *Dans les deux cas, le facteur initial du déterminisme sexuel repose sur l'existence de chromosomes sexuels (aspect développé plus tard dans cette introduction), et la résultante de tous les mécanismes est le dimorphisme sexuel. Chez les mammifères, la sexualisation gonadique intervient avant la sexualisation des cellules somatiques, alors que les deux phénomènes sont concomitants et interdépendants chez le poulet.*
© Adapté de Zhao et al. 2010.

b. Le déterminisme sexuel : une énigme.

Les débats sur l'origine du sexe (ici non pas dans la dimension de sexualité mais de genres) ont animé bon nombre de générations de scientifiques. Depuis la Grèce antique, la théorie prédominante était celle d'un **déterminisme lié à l'environnement** (Mittwoch 2005): le sexe de la descendance pouvait donc être déterminé par le testicule de provenance de la « semence » ou encore l'énergie et la chaleur dégagée par le mâle lors de l'accouplement. On ignorait alors également la nature de cette semence. Le XVIIème siècle a été marqué par la découverte des spermatozoïdes, qualifiés d' « animalicules » car ils semblaient être de petits animaux peuplant le sperme (Leeuwenhoek 1677). Cinquante ans plus tard, Von Baer évoquera lui la formation d'un œuf mammifère (Von Baer 1827). Ces découvertes marqueront le début de la vision moderne de la biologie reproductive et développementale (Alexandre 2001). Cependant, ce n'est qu'à la fin du XIXème siècle qu'Henking observera la présence d'un élément uniquement dans la moitié des gamètes mâles chez l'insecte *Pyrrhocoris apterus* (ou gendarme). Une dizaine d'année plus tard, McCLung postula que cet élément devait être **un chromosome** (McClung 1902). Et en effet, cette espèce s'avèrera être une espèce dont les femelles sont porteuses de deux chromosomes XX et les mâles d'un seul X. Dans la foulée, il a été décrit chez différentes espèces d'insectes des variations des spermatocytes par la présence ou l'absence de chromosomes ou encore une différence de taille (Wilson 1905). Chez *Tenebrio molitor*, il a été décrit que les mâles (et non les femelles) possédaient un chromosome plus petit que les autres et que ce chromosome pouvait donc être responsable du déterminisme du sexe mâle (Stevens 1905). L'ensemble de ces études fait appel à la notion de **déterminisme génétique du sexe**. Nous allons voir ici qu'il y a bien deux modes principaux de déterminisme du sexe : l'un environnemental et l'autre

génétique, mais que plusieurs facteurs peuvent s'additionner. Ainsi chez les amphibiens, on peut observer des **discordances entre le sexe génétique et le sexe phénotypique** : cela résulte en fait de la combinaison des déterminismes génétiques et environnementaux (Manolakou et al. 2006).

Le déterminisme environnemental et/ou social.

Le déterminisme environnemental du sexe peut dépendre de **facteurs physico-chimiques** du milieu ou de la **structure d'une population** (*i.e.* facteurs dits « sociaux »). La température par exemple va influencer le développement d'un des sexes d'une espèce pendant une courte période du développement embryonnaire appelée « **période sensible** ». Pendant cette période-là, la température va réguler la transcription d'une enzyme : l'aromatase, qui convertit les androgènes en œstrogènes (Navarro-Martín et al. 2011). C'est le ratio entre ces deux hormones sexuelles qui influence ensuite le développement gonadique. Ce mode de déterminisme concerne certains animaux ectothermes comme les lézards (Charnier 1966), les tortues (Pieau 1971; Pieau 1972) ou les poissons (Ospina-Alvarez and Piferrer 2008). Dans le cas de facteurs sociaux, il peut s'agir d'une densité de population ou du sexe des individus déjà présents (Haag and Doty 2005). Par exemple chez *Bonellia viridis* (un ver marin), les larves se développent spontanément en femelles si elles sont dans une niche non encore occupée, où en mâles si une femelle est déjà présente (Leutert 1975). Le déterminisme environnemental du sexe aura des conséquences particulières sur la structuration des populations et notamment leur *sex-ratio* (Stelkens and Wedekind 2010), mais nous ne développerons pas cette problématique ici.

Le déterminisme génétique.

Le déterminisme de type génétique peut reposer sur un allèle déterminant, l'existence de chromosomes sexuels, ou encore être régulé à l'échelle du génome entier. Le patrimoine génétique (et donc chromosomique) des individus étant déterminé dès l'amphimixie (fécondation), on parle de **déterminisme syngamique**. Il existe plusieurs modes de déterminisme du sexe reposant sur des **facteurs génétiques nucléaires** (Bachtrog et al. 2014) (Figure 6): (1) L'haplo-diploïdie chez les hyménoptères (les mâles sont haploïdes et les femelles diploïdes) : il s'agit d'une régulation à l'échelle du génome entier. (2) L'élimination ou l'inactivation du génome paternel chez certains insectes comme les cochenilles. (3) La régulation polygénique faisant intervenir plusieurs gènes qui peuvent être localisés sur des chromosomes différents comme chez le zebrafish (Liew et al. 2012). (4) La monogénie, système dans lequel l'ensemble des descendants d'une même femelle sont soit mâles soit femelles comme chez certains crustacés. Il a par ailleurs été décrit un mode de **déterminisme génétique dit « cytoplasmique »**. C'est le cas de la féminisation induite par l'élément *f* des bactéries du genre *Wolbachia* chez certains cloportes (pourtant chromosomiquement mâles). Si ces séquences parasites d'ADN s'insèrent dans le génome de l'hôte, alors elles pourraient être responsables de transition entre les systèmes chromosomiques de déterminisme sexuel (Cordaux et al. 2011).

Enfin, on observe le plus souvent **un déterminisme chromosomique du sexe.** Ces chromosomes sexuels peuvent être appelés « **gonosomes »** et le chromosome qui n'est porté que par l'un des sexes est appelé « **hétérochromosome »**. En 1917, Morgan reconnaissait différents déterminismes chez les insectes : XX/XY ou son variant XX/XO ; et chez les oiseaux et les lépidoptères: ZZ/ZW. Le **système XX/XY peut être défini comme un système hétérogamétique mâle :** ce sont les mâles qui portent deux chromosomes différents X et Y ; alors que le **système ZZ/ZW est hétérogamétique femelle** : ce sont les femelles qui portent deux chromosomes différents Z et W. Il a cependant été décrit un cas très particulier de déterminisme chromosomique chez l'espèce de souris africaines *Mus*

minutoides, qui présente des **phénotypes femelles reposant sur un génotype XY habituellement mâle**. Elles possèderaient en fait une mutation sur le chromosome X responsable de la féminisation des individus porteurs (Veyrunes et al. 2010). De plus cette mutation (notées **X***) confèrerait une **meilleure valeur sélective aux femelles** qui en sont porteuses (Saunders et al. 2014). On peut distinguer un troisième type de système de déterminisme chromosomique, chez des **espèces haploïdes** comme l'algue *Ectocarpus* (Image 8): le **système UV**. Dans ce système, les femelles portent un chromosome sexuel « U » et les mâles le chromosome « V » (Ahmed et al. 2014). Chez ces espèces l'alternance diploïdie/haploïdie est un peu particulière : la diploïdie est transitoire chez le sporophyte UV issu de la fécondation (définie par la rencontre des matériels génétiques parentaux sous forme de gamètes), et le sexe des individus sera en fait déterminé lors de la méiose par formation d'individus haploïdes U ou V.

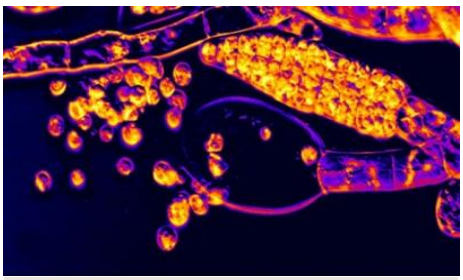


Image 8. Libération de spores haploïdes à partir d'un sporophyte mûr (diploïde) de l'algue brune Ectocarpus.
La moitié des spores porte le chromosome U (et se développe en gamétophyte femelle) et l'autre moitié porte le chromosome V (et se développe en gamétophyte mâle). Fausses couleurs.
© Delphine Scornet

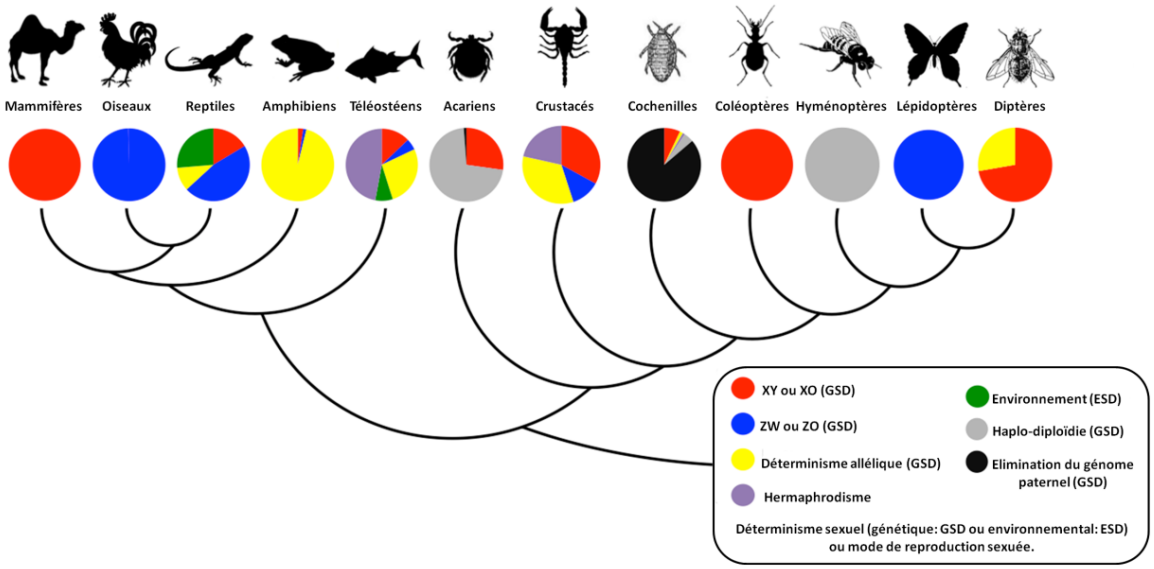


Figure 6. Diversité des modes de déterminismes sexuels au sein de différents taxa animaux.
Certains groupes ont adopté un mode de déterminisme de façon homogène (comme les mammifères ou les oiseaux) alors que d'autres présentent une grande diversité (comme les amphibiens).
© Adapté de Doris Bachtrog 2014

c. Le déterminisme chromosomique du sexe: aspects évolutifs.

Apparition et différenciation des chromosomes sexuels.

Si l'on peut parler de dimorphisme phénotypique entre les sexes mâles et femelles, on peut également parler de **dimorphisme au niveau chromosomique** : les gonosomes présentent souvent des différences structurales et nous l'avons vu, ces différences ont notamment permis les premières observations du déterminisme génétique du sexe (Stevens 1905). Aujourd'hui, un mécanisme général d'évolution de ces hétérochromosomes a été globalement adopté (Charlesworth et al. 2005) (Figure 7):

1. Les proto-chromosomes sexuels (proto-X et proto-Y) **dériveraient d'une paire d'autosomes** sur lesquels seraient apparus des **gènes déterminants du sexe** codants pour une stérilité mâle sur le proto-X (m) ou pour une stérilité femelle sur le proto-Y (exemple chez l'oiseau (Fridolfsson et al. 1998)).

2. Afin de conserver cette spécialisation, cette région subirait une **perte de la recombinaison** par deux types de mécanismes : une hétérochromatisation et des inversions**.** L'existence de plusieurs évènements de cessation de recombinaison conduit à l'apparition de strates évolutifs d'âges différents (Lahn and Page 1999; Handley et al. 2004).

2bis. Une augmentation de la spécialisation pourrait avoir lieu par l'apparition d'autres gènes bénéfiques au sexe mâle sur le chromosome Y ou au sexe femelle sur le chromosome W.

3. Puis les mutations délétères qui ne pourraient être réparées et l'accumulation de séquences répétées conduiraient à une dégénération et une perte des régions non recombinantes.

Tout ce scénario évolutif résulterait en un **hétérochromosome Y ou W dégénéré**, morphologiquement et génétiquement différent du X ou du Z. Il existe une partie commune aux chromosomes de la paire hétérogamétique: la paire XY ou ZW partage une région, dite **pseudo-autosomale**, présentant des séquences d'ADN communes. Par ailleurs, une partie spécifique à l'hétérochromosome, dite **Y-spécifique ou W-spécifique, est souvent pauvre en gènes, riche en éléments répétés et présente une structure chromatinienne plutôt condensée** (Bachtrog 2013).

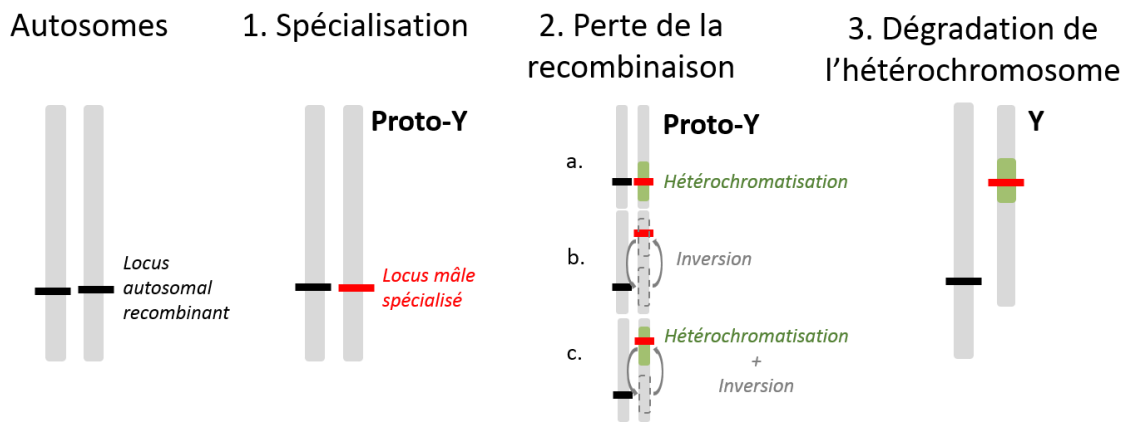


Figure 7. Mécanisme théorique de l'évolution des chromosomes sexuels. *Exemple d'un hetérogamétisme mâle XY.*

Selon les espèces observées aujourd'hui, il existe différents degrés de différenciation des chromosomes sexuels, depuis l'homomorphie où les deux chromosomes sont de même taille (comme chez le poisson globe, Figure 7) jusqu'à la dégradation complète de l'hétérochromosome (comme chez certaines espèces de drosophiles). Jusqu'à très récemment il était communément accepté que l'hétérochromosome devait subir une dégénération inévitable, et les chromosomes

homomorphes étaient conséquemment considérés comme « jeunes » d'un point de vue évolutif (Steinemann and Steinemann 2005). Cependant **l'extension des études vers les espèces non modèles** comme les serpents (Vicoso et al. 2013) ou les émeus (Vicoso et al. 2013) a montré que certains de ces **gonosomes homomorphes avaient en fait plus de 120 millions d'années** et que certains chromosomes Y pauvres en gènes, comme chez les drosophiles, avaient quelques dizaines de millions d'années (Vicoso and Bachtrog 2013). Plus intéressant encore, cette dernière étude montre la possibilité de **réversion d'un chromosome sexuel en autosome**. C'est le cas du chromosome « dot » de la plupart des espèces de drosophiles, ainsi nommé pour sa petite taille (Vicoso and Bachtrog 2013). Actuellement ce chromosome montre un taux de gain de gènes 10,9 fois supérieur à son taux de perte de gènes (Koerich et al. 2008). Ainsi il semblerait que le paradigme « *Y chromosomes born to be destroyed* » (Steinemann and Steinemann 2005) ne soit plus d'actualité aujourd'hui.

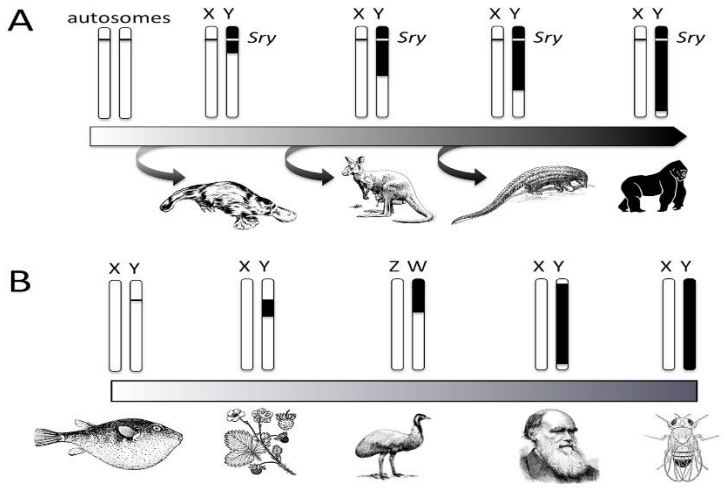


Figure 8. Certaines espèces sont des « arrêts sur image » du schéma évolutif des gonosomes.

A. Différenciation des chromosomes sexuels. L'acquisition de SRY correspond à l'acquisition de la fonction sexuelle de l'hétérochromosome. En noir: suppression de la recombinaison associée à la dégradation de l'hétérochromosome non recombinant.
B. Gonosomes homomorphes chez le poisson globe, différenciation intermédiaire chez les fraises ou l'émeu, Y très dégénéré chez l'homme et un seul X chez les drosophiles (cas extrême de différenciation).

© Bachtrog et al. 2014

Transitions entre les modes de déterminismes chromosomiques du sexe.

Selon l'hypothèse d'Ohno (XXème siècle) les chromosomes sexuels, qu'ils appartiennent au système XY ou ZW, dériveraient en fait d'une même paire de chromosomes ancestraux. Cependant, plusieurs études de cartographie des gènes ont montré que les chromosomes sexuels des mammifères (XY) et ceux des oiseaux et des serpents (ZW) sont en fait entièrement non-homologues, ce qui signifie qu'ils dérivent de différentes paires d'autosomes ancestraux (Graves and Shetty 2001; Matsubara et al. 2006; Veyrunes et al. 2008). Par ailleurs, de récentes études permettent de penser que les homologies entre les chromosomes ZW et XY de certaines espèces seraient en fait dûes à des évènements de transitions entre les deux systèmes de déterminisme. Cela a été mis en évidence dans certains taxa, comme les poissons qui présentent une grande diversité de modalités de reproduction sexuée et de déterminismes du sexe (Ezaz et al. 2006), ou chez les diptères également très diversifiés (Vicoso and Bachtrog 2015) (Figure 7). Chez *Rana rugosa*, une espèce de grenouilles qui présente des populations XX/XY et des ZZ/ZW, il a été montré différentes transitions entre les systèmes, dans les deux sens (Ogata et al. 2008). Cette transition seraient facilitée par la présence de **chromosomes sexuels homomorphes** et **un mode transitoire de déterminisme environnemental** ainsi que **l'apparition de nouveaux gènes masculinisants ou féminisants**, respectivement pour passer d'un système ZW vers XY, ou XY vers ZW (Bachtrog et al. 2014; Ezaz et al. 2006).

Les monotrèmes, représentés par les curieux ornithorynques, constituent une curiosité évolutive sous bien des aspects et notamment leur reproduction. En effet, ce sont des mammifères ovipares et ils ne possèdent pas une seule paire de chromosomes sexuels mais cinq, observées sous forme de « chaîne méiotique ». Ces chromosomes présentent de nombreuses homologies (fragmentées) avec les chromosomes sexuels ZW des oiseaux mais pas avec les XY des mammifères (Veyrunes et al. 2008) (Figure 7). Les monotrèmes et les mammifères thériens auraient en fait divergé il y a environ 165 millions d'années et auraient effectué indépendamment leur transition du système ZW vers le système hétérogamétique mâle XY.

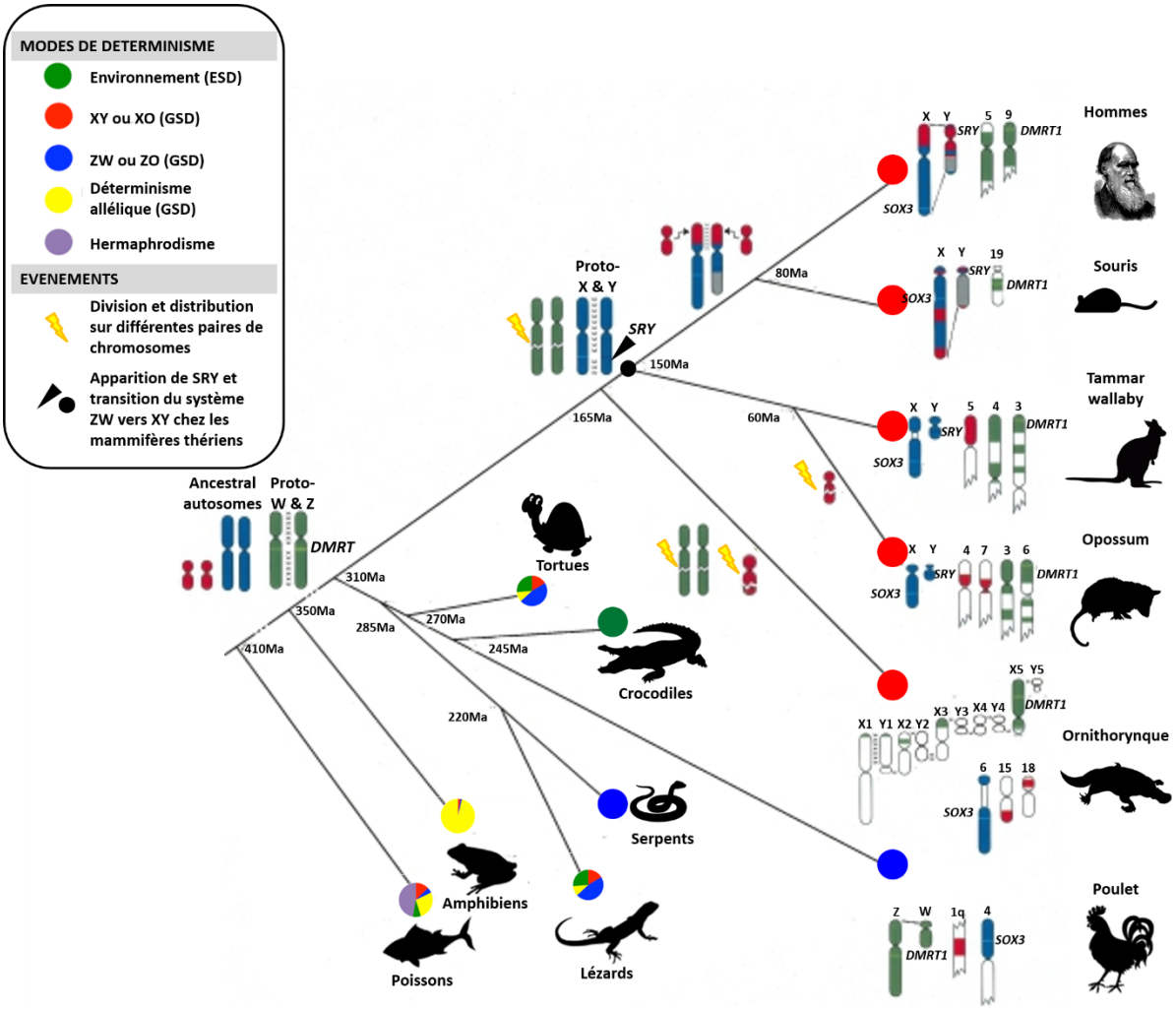


Figure 9. Phylogénie des chromosomes sexuels de différents groupes de vertébrés.
Les homologies chromosomiques sont représentées par différentes couleurs : Rouge = séquences issues d'autosomes ancestraux ayant fusionnés avec les proto X et Y chez les mammifères placentaires / Bleu = séquences homologues aux X et Y / Vert = séquences homologues aux Z et W.
La paire ancestrale proto- Z et W a été conservée chez les oiseaux, divisée sur la chaîne méiotique des monotrèmes et divisée sur les autosomes mammifères. Il est intéressant de noter que le gène Dmrt1 *est conservé dans tous les taxa (Voir partie "Les acteurs moléculaires du sexe") mais pas systématiquement sur les chromosomes sexuels.*
© Adapté de Veyrunes et al. 2008

Différenciation des chromosomes sexuels : conséquences pour la méiose.

Lors de la méiose, les gonosomes adopteront un « comportement » particulier : chez le sexe hétérogamétique, ils n'ont pas la même composition en gènes et peuvent être très hétéromorphiques. Par conséquent, ils ne peuvent appareiller et recombiner que certains de leurs allèles, situés dans les régions pseudoautosomales (PAR). Afin notamment de faciliter leur reconnaissance, ils vont changer de structure chromatinienne (condensation des chromosomes X et Y) et leur transcription sera inactivée : on parle d'**inactivation méiotique des chromosomes sexuels (MSCI)**. A l'inverse chez les femelles homogamétiques XX, le chromosome X jusqu'à lors inactivé va se réactiver afin toujours de faciliter l'appariement, et donc la recombinaison, avec son homologue déjà actif (Guichaoua et al. 2009; Jablonka and Lamb 1988).

Suivant le scénario méiotique décrit précédemment, la répartition des chromosomes chez l'individu hétérogamétique devrait systématiquement conduire à la formation d'un gamète porteur du déterminant mâle (Z ou Y) pour un gamète porteur du déterminant femelle (W ou X) (cohérent avec le principe général de Fisher selon lequel le *sex-ratio* fluctue inévitablement autour de 1:1). Cependant, il a été montré l'existence de gènes « déformants » qui entraînent un biais dans la proportion de gamètes mâles et femelles. Ainsi un gène favorable à la méiose situé sur le Y ou le Z entraînera un *sex-ratio* primaire biaisé mâle (Tao et al. 2007) ; et inversement un gène méiotique situé sur le X ou le W entraînera un sex-ratio primaire biaisé femelle (Presgraves et al. 1997). Ce type de gène « déformant » peut avoir un rôle dans les transitions entre les modes de déterminismes du sexe et plus particulièrement dans les basculements entre les systèmes hétérogamétiques mâles et femelles.

Différenciation des chromosomes sexuels : conséquences pour la dose génique.

La différenciation des chromosomes sexuels a une autre conséquence, évolutive, qui est le déséquilibre de la dose génique des gènes portés par les chromosomes sexuels, non seulement entre les sexes, mais surtout entre les chromosomes sexuels et les autosomes (Charlesworth 1996; Mank 2009). Si ce déséquilibre peut avoir une fonction compréhensible en ce qui concerne les gènes de l'hétérochromosome (Y ou W) qui sont spécialisés dans la fonction sexuelle, cela ne vaut pas pour les gènes X- ou Z- spécifiques, dont la plupart ont des fonctions plus générales telles que le métabolisme cellulaire. Ainsi, un déséquilibre dans la dose de ces gènes présentant une seule copie (monosomie) peut entraîner une diminution de la valeur sélective des individus, comparable aux anomalies chromosomiques d'ordre aneuploïdique (Veitia 2005). Afin de compenser ce déséquilibre, les mammifères thériens (Payer and Lee 2008; Graves and Shetty 2001), la drosophile (Fagegaltier and Baker 2004) et *Caenorhabditis elegans* (Ercan et al. 2007) ont mis en place différentes stratégies aboutissant toutes à une compensation globale/complète de la dose génique. Par contraste, ce mécanisme est localisé/incomplet chez les oiseaux (Graves and Shetty 2001; Ellegren et al. 2007; Itoh et al. 2007), les lépidoptères (Zha et al. 2009), les serpents (Vicoso et al. 2013) ou l'ornithorynque (Deakin et al. 2008). Un mécanisme complet de compensation de dose est caractérisé par un ratio moyen d'expression des gènes situé sur les chromosomes sexuels / autosomaux égal à 1, alors qu'un mécanisme incomplet de compensation est caractérisé par un ratio d'environ 0,8 (Figure 10). A l'exception de l'ornithorynque, **il semblerait que de façon générale les systèmes hétérogamétiques mâles XX/XY possèdent des mécanismes complets de compensation de dose, alors que les espèces hétérogamétiques femelles ZZ/ZW ont un mécanisme local de compensation de dose**. Les espèces possédant un mode de compensation complet, y aboutissent selon différentes modalités/stratégies (Figure 11).

Figure 10. Les différentes modalités de compensation de dose génique.

Chez les grands modèles biologiques (hétérogamétiques mâles), les mécanismes complets de compensation de dose mettent en jeu une régulation de la transcription du X chez l'un ou chez les deux sexes, selon différentes stratégies non détaillées ici. Chez les espèces hétérogamétiques femelles, le mécanisme est incomplet et les stratégies n'ont pas été identifiées pour le moment.

Adapté de © Mank 2009

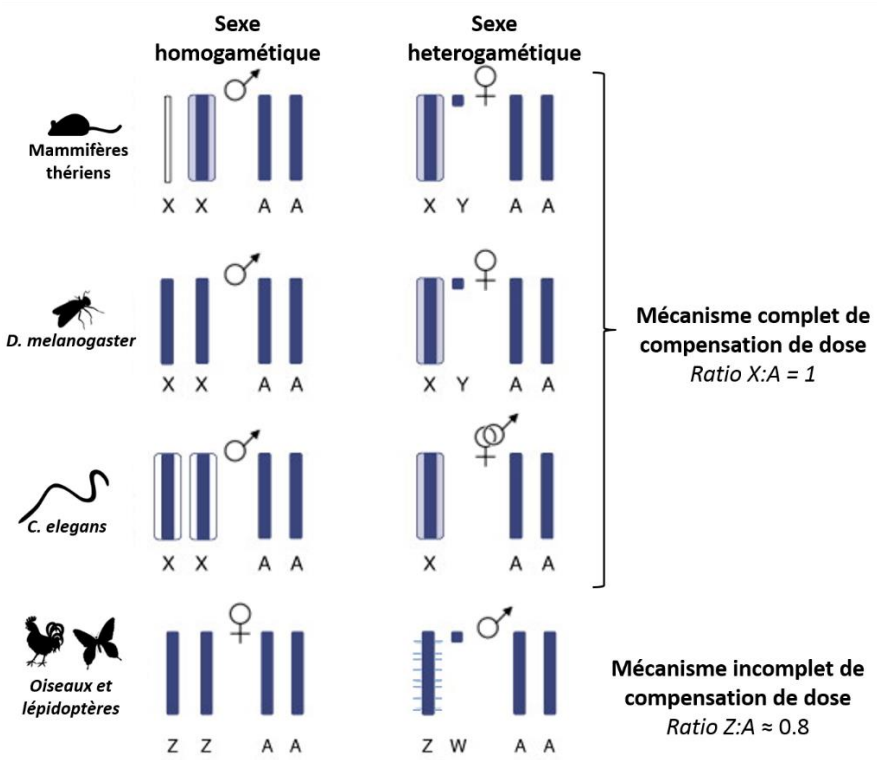
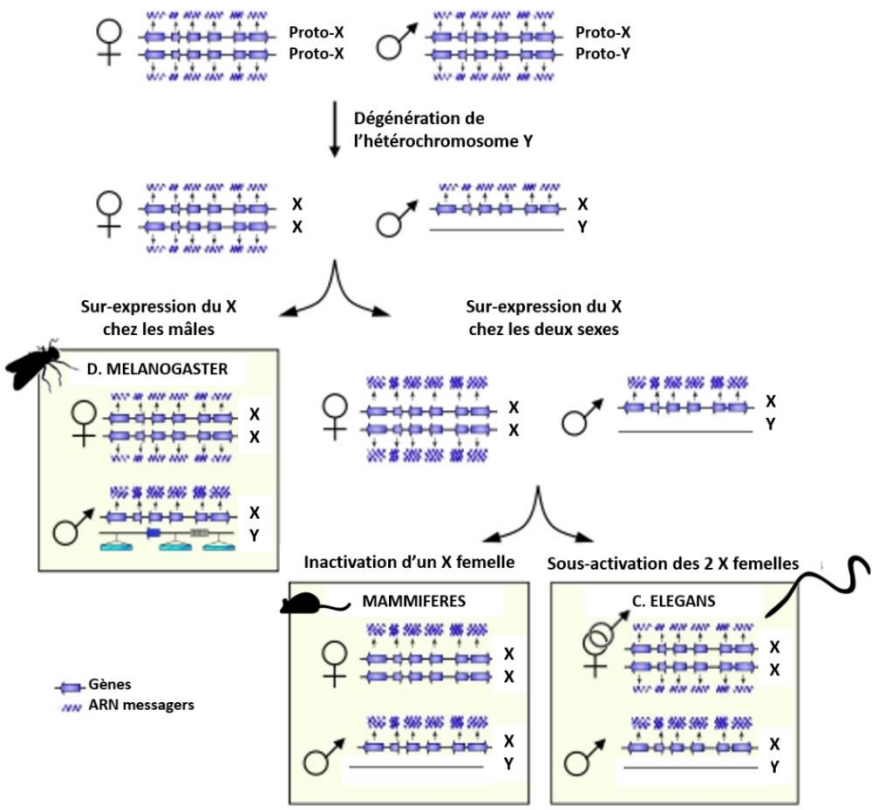


Figure 11. Les différentes stratégies de compensation de dose génique chez les espèces hétérogamétiques mâles.

Ce mécanisme se fait en une étape chez D. melanogaster *(surexpression du X mâle) et en deux étapes chez les mammifères et* C. elegans. *Les deux sexes sur-expriment les gènes portés par le X avant de diminuer leur expression respectivement chez les femelles ou les hermaphrodites en inactivant un X, ou en diminuant la transcription des deux X.*

Adapté de © Vicoso et al. 2013



Au-delà de la notion de mécanisme « compensatoire », **une modalité de compensation de dose incomplète peut directement jouer un rôle dans le déterminisme sexuel.** C'est le cas chez le poulet ou deux copies du gène *dmrt1* (Z-spécifique, *voir partie suivante*) vont conduire à un phénotype mâle (génotype ZZ) alors qu'une seule copie implique un phénotype femelle (génotype ZW) (Smith et al. 2009).

d. Les acteurs moléculaires du sexe.

Le déterminisme génétique du sexe repose souvent sur un gène déterminant « clé » ou « interrupteur », en anglais « *master sex-determining gene* ». Ce gène peut agir selon deux modalités **: présence / absence** (*e.g. Sry* chez les mammifères) ou **dose-dépendance** (*e.g. dmrt1* chez *Gallus gallus*). Le système se complexifie encore si on considère la possibilité de combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Au-delà du déterminisme, le sexe d'un individu implique également l'action d'une **cascade de différenciation** (gènes « différenciants »), mais aussi le **maintien de l'identité sexuelle** (gènes « contrôleurs »). Pour définir les rôles précis de ces différentes catégories de gènes, les expériences de validations fonctionnelles (pertes ou gains de fonction) sont particulièrement importantes. On peut considérer que si l'absence d'un gène conduit à une non-différenciation sexuelle mâle ou femelle (selon son implication dans le déclanchement la voie mâle ou femelle), alors c'est un « déterminant ». De façon plus nuancée, s'il conduit juste à une malformation alors il pourra être considéré comme un « différenciant ». Il est intéressant de constater que malgré la grande diversité des facteurs déterminants du sexe (génétiques et environnementaux), les acteurs moléculaires sous-jacents sont souvent conservés. De plus, suivant les espèces, certains acteurs peuvent alternativement jouer le rôle de déterminant, de différenciant ou de contrôleur du sexe (Tableau 3).

Tableau 3. Partage des différents déterminants géniques du sexe à travers le règne animal.
ABBREVIATIONS: Voie SD = Voie déterminante du sexe / Gsdf*: gonadal somatic cell derived factor /* dmrt1*: double-sex and male abdormal-3 related transcription factor /* Amh*: anti-Mullerian Hormone /* sdY*: Sexually dimorphic on the Y-chromosome /* Sxl*: Sex-lethal /* Csd*: Complementary sex determiner/* Nvtra*: Nasonia, zygotic transformer.*
© Adapté de Bachtrog et al. 2014

Espèces	Système génétique de déterminisme sexuel	Position du gène déterminant	Gène déterminant	Paralogue	Produit paralogue	Référence
POISSONS						
Poisson medaka (*Oryzias latipes*)	XY	Hétérochromosome Y	*dmrt1Y*	*dmrt1*	Facteur de transcription de la voie SD	Matsuda 2002, Nanda 2002
Poisson medaka (*Oryzias luzonensis*)	XY	Hétérochromosome Y	*gsdfY*	*gsdf*	Protéine sécrétée de la voie SD	Myosho 2012
Poisson (*Odontesthes*	XY	Hétérochromosome Y	*amhY*	*amh*	Hormone anti-Mullerienne	Hatorri 2012
Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus*	XY	Hétérochromosome Y	*sdY*	*Irf9*	Facteur de régulation d'interféron	Yano 2012
Poisson globes	XY	X (Dose dépendant)	*amhr2*	*amhr*	Récepteur de l'hormone anti-Mullerienne	Kamiya 2012
Sole	ZW	Z (Dose dépendant)	*dmrt1*	-	Facteur de transcription de la voie SD	Chen 2014
AUTRES VERTEBRES						
Mammifères	XY	Hétérochromosome Y	*Sry*	*Sox3*	HMG-box transcription factor	Foster 1994
Poulet	ZW	Z (Dose dépendant)	*dmrt1*	-	Facteur de transcription de la voie SD	Smith 2009
Xénope	ZW	Hétérochromosome W	*dmW*	*dmrt1*	Facteur de transcription de la voie SD	Yoshimoto 2008
INVERTEBRES						
Drosophiles	XY	X (Dose dépendant)	*Sxl*	*CG3056*	Facteur d'épissage	Maine 1985, Cline 2010
Mouches	ZW	Hétérochromosome W	*F*	*tra*	Facteur d'épissage de la voie SD	Hediger 2010
Ver à soie	ZW	Hétérochromosome W	*Fem*	-	Piwi-interacting RNA	Kiuchi 2014
Abeilles	Haplo-diploïde	-	*csd*	*tra*	Facteur d'épissage de la voie SD	Beye 2003
Guêpes	Haplo-diploïde	-	*Nvtra*	*tra*	Facteur d'épissage de la voie SD	Verhulst 2010

Les gènes DMRT *(doublesex and male-abnormal-3 related transcription factors).*

La famille de gènes *DMRT* (*doublesex and male-abnormal-3 related transcription factors*) a été identifiée comme étant un acteur important du déterminisme, de la différenciation et du maintien du sexe mâle à travers tout le règne animal (Kopp 2012; Matson and Zarkower 2012a; Wexler, Plachetzki, and Kopp 2014a). Cette famille de facteurs de transcription est caractérisée par la présence d'au moins un domaine de liaison à l'ADN appelé domaine DM. Il possède une structure en doigts-de-zinc entrecroisés qui consiste en l'alternance de six résidus cystéines et deux histidines (Erdman and Burtis 1993; Zhu et al. 2000). Les *DMRT*s semblent être présents chez tous les animaux (y compris non-bilatériens) et ne sont pas trouvés dans d'autres règnes. Ils auraient ainsi une **origine pré-eumétazoaire** et se seraient diversifiés indépendamment chez les bilatériens et les non-bilatériens (Wexler et al. 2014). Cette famille de gènes comprend neuf *DMRTs*, en addition du *dsx* des insectes et de *mab-3* (*male-abnormal-3*) de *C.elegans* qui furent les premiers membres identifiés (Volff et al. 2003; Wexler et al. 2014; Raymond et al. 1998). Parmi eux, le *dmrt1* est présent **chez tous les vertébrés, en position autosomale chez les espèces hétérogamétiques mâles XY et sur les chromosomes sexuels des espèces hétérogamétiques femelles ZW** (ainsi que sur le X5 de l'ornithorynque) (Veyrunes et al. 2008) (Figure 9). Ce gène est gonado-spécifique à la fois chez des individus XX/XY et ZZ/ZW, comme chez la souris et le poulet (Raymond et al. 1999), où il est impliqué respectivement dans le **maintien de l'identité mâle** (Raymond et al. 1998) et **le déterminisme** (Smith et al. 2009). Le gène *dmrt1* a aussi une fonction déterminante chez le xénope (Yoshimoto et al. 2008) et chez certains poissons (Volff et al. 2007; Chen et al. 2014). Chez *Rana rugosa* il a un rôle à la fois dans **la différenciation testiculaire** et dans le maintien de l'identité mâle (Shibata et al. 2002). Le rôle de cette famille de gènes dans la sexualité semblerait même s'étendre au-delà des espèces gonochoriques. En l'occurrence, le gène *Smed-dmd-1* semble être indispensable au maintien de l'identité mâle du planaire hermaphrodite *Schmidtea mediterranea* (Chong et al. 2013). Un homologue est par ailleurs exprimé lors de la mise en place des organes reproducteurs chez le corail *Acropora millepora* (Miller et al. 2003) et a été décrit chez l'huître *Crassostrea gigas* (Naimi et al. 2009). **Ainsi, cette famille de gènes *DMRTs* est un exemple de conservation d'un acteur moléculaire, à la position hiérarchique variable, chez des espèces animales aux stratégies reproductives et aux mécanismes variés de déterminismes sexuels. Cela fait l'objet de la première partie de notre étude** (Picard et al. 2015).

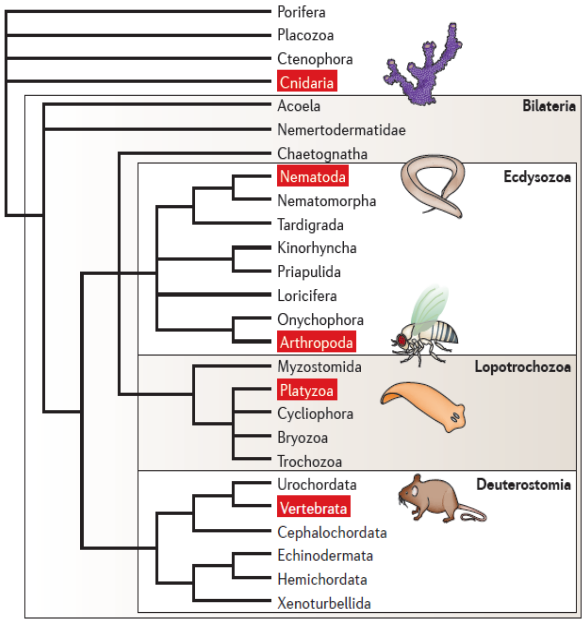


Figure 12. Phylogénie représentant tous les métazoaires chez lesquels les gènes de la famille des* DMRT*s ont un rôle dans le développement du sexe.
© Matson et Zarkower, 2012

SRY et protéines à domaine HMG

Entre la découverte des chromosomes sexuels au début du XXème siècle et la fin de ce siècle est née l'hypothèse de l'existence d'un facteur déterminant« TDF » (*Testis Determining Factor*) des testicules sur le chromosome Y (Mittwoch 2005). Ce n'est finalement que près d'un siècle plus tard que le

candidat *Sry* (*Sex determining region on Y*) a été identifié (Koopman et al. 1990) et sa fonction déterminée, par « gain de fonction », induisant un sexe phénotypique mâle chez des souris XX génétiquement femelles (Koopman et al. 1991). Ce gène possède un rôle conservé chez tous les **mammifères thériens chez qui il semble présent systématiquement sur l'hétérochromosome Y** (Veyrunes et al. 2008) (Figure 9). Son absence chez l'ornithorynque laisse penser que *Sry* serait apparu il y a **150 millions d'années, par mutation du gène *Sox3*,** son homologue présent aujourd'hui sur le X de ces mêmes mammifères thériens. Chez les autres vertébrés, ce gène *Sox3* a une localisation autosomale (Veyrunes et al. 2008) (Figure 9). Les protéines de la famille SOX (*Sex determining region on Y-bOX*), possèdent un domaine de liaison à l'ADN HMG (*High Mobility Group*). Ce sont des facteurs de transcription qui auraient une implication potentielle dans le déterminisme du sexe à travers tout le monde vivant, jusqu'aux algues (à déterminisme chromosomique UV) : un gène HMG a récemment été décrit dans la région V-spécifique (ou male-spécifique) d'*Ectocarpus* (Ahmed et al. 2014). Ainsi, SRY semble posséder une fonction stricte de déterminant sexuel mâle chez les mammifères thériens mais les protéines à domaine HMG seraient plus étendues. Comme tout mécanisme très conservé et apparemment stable, il existe des exceptions à la règle : ainsi, le très conservé SRY a **perdu sa fonction déterminante** chez le petit rongeur *Tokudaia osimensis* dont le nouveau gène déterminant n'a pas encore été identifié (Kimura et al. 2014), c'est également le cas chez les femelles X*Y de *Mus minutoides* que nous évoquions précédemment (Veyrunes et al. 2010).

Transformer : l'exemple d'un différenciant devenu déterminant.

Comme nous venons de le voir, certains gènes à fonction sexuelle sont très conservés à l'échelle animale, mais cela ne signifierait pas pour autant que leur fonction est figée. C'est notamment le cas du gène *transformer* (*tra*) : Chez *D. melanogaster*, *tra* est un facteur d'épissage de la cascade de différenciation. Chez une autre espèce de diptère en revanche, *Ceratitis capitata*, *tra* a un rôle de déterminant (Pane et al. 2002), comme chez la mouche domestique (Hediger et al. 2010) ou chez l'abeille (Beye et al. 2003) (Tableau 3). Notons que la cascade moléculaire en aval de ce gène est conservée chez toutes ces espèces (Hediger et al. 2004). Cette observation a fait naître l'hypothèse de Wilkins (Wilkins 1995), selon laquelle **l'évolution des cascades de déterminisme du sexe aurait lieu de façon "inversée", depuis le bas de la cascade (gènes conservés) au haut de la cascade (facteurs déterminants très variés)** (Shukla and Nagaraju 2010).

Acteurs épigénétiques du sexe.

En 2001, Wu et Morris définissaient l'épigénétique comme un « *ensemble de modifications réversibles et héritables, capable d'influencer le phénotype, mais non codées dans la séquence d'ADN* » (Wu and Morris 2001). Ici nous nous focaliserons plus sur la **dimension mécanistique** du concept d'épigénétique, c'est-à-dire les **mécanismes moléculaires qui modulent l'expression des gènes**. Il en existe quatre types : la localisation nucléaire de la chromatine, la méthylation de l'ADN, la modification des histones (protéines structurales de la chromatine) et les ARNs non codants. Plusieurs études montrent que ce type de mécanismes est impliqué (1) dans la compensation de dose génique (2) dans la régulation de l'expression des déterminants géniques.

Les mécanismes de compensation de doses géniques sont étroitement liés à une régulation fine de la structure chromatinienne des chromosomes sexuels. Chez les femelles mammifères, des marques d'histones et des profils de méthylation de l'ADN différents entraînent deux structures chromatiniennes distinctes : l'une permettant la transcription du chromosome X actif (Xa) et l'autre l'inactivation du chromosome X inactif (Xi) (Lucchesi et al. 2005). De plus, c'est un autre facteur

épigénétique, l'ARN non codant XIST (*X-Inactive Specific Transcript*) qui va déclencher ces changements structuraux. Chez la drosophile, les protéines et ARN non-codants du complexe MSL *(Male Specific Lethal*) vont induire une structure ouverte de la chromatine du chromosome X chez les mâles, entraînant une sur-expression globale de celui-ci (Georgiev et al. 2011). A l'inverse, chez *C. elegans*, les chromosomes X des hermaphrodites sont enrichis en marques d'histones dîtes « non-permissives », qui impliquent une hétérochromatisation à l'origine de la diminution de l'expression des gènes de ces chromosomes (Wells et al. 2012).

L'expression des déterminants moléculaires du sexe est finement régulée par des mécanismes épigénétiques. Cela est principalement illustré par la régulation des déterminants « clés » (1) *Sry* et (2) *dmrt1*, par exemple : (1) La méthylation de l'ADN et la modification d'histones par les protéines des groupes « *Polycomb* » et « *Trithorax* » participent à la régulation de l'expression de *Sry* chez les mammifères (Piferrer 2013; Tachibana 2015). (2) Des ARNs non-codants issus du locus MHM (*Male HyperMethylated*) régulent l'expression de *dmrt1* chez le poulet (Caetano et al. 2014; Roeszler et al. 2012; Teranishi et al. 2001; Bisoni et al. 2005).

Ces régulations épigénétiques ont un rôle d'interface tout particulier dans le déterminisme environnemental du sexe. Il a notamment été montré, de façon conservée chez différentes espèces, que la température régule la production d'aromatase *via* la méthylation du promoteur du gène cyp19a : c'est le cas chez le poisson *Dicentrarchus labrax* (Navarro-Martín et al. 2011), la tortue *Pseudemys scripta elegans* (Matsumoto et al. 2013) et l'anguille *Monopterus albus* (Zhang et al. 2013). Chez le poisson plat *Cynoglossus semilaevis,* la température peut moduler la méthylation de l'ADN à l'échelle chromosomique en entraînant: (1) une surexpression des gènes Z-spécifiques (dont le *dmrt1*) et (2) une suppression de l'expression des gènes W-spécifiques. Les chromosomes sexuels de ces individus ZW ont ainsi un profil transcriptomique proche de celui des individus ZZ et en conséquence, un phénotype mâle (Shao et al. 2014). L'apparition de ces pseudo-mâles ZW est qualifiée de **« réversion du sexe ».** Le profil de méthylation d'ADN des pseudo-mâles est transmis aux individus ZW de la génération suivante qui à leur tour seront des pseudo-mâles, on parle d'effet **trans-générationnel**. L'effet trans-générationnel de l'influence de l'environnement sur la détermination du sexe a par ailleurs été montré chez le lézard *Amphibolurus muricatus* (Warner et al. 2013) et nous pouvons supposer que de tels mécanismes épigénétiques en soient à l'origine. Ici la notion d'épigénétique va revêtir une toute autre dimension, celle de l'héritabilité, pour se rapprocher de sa définition complète telle qu'énoncée par Wu et Morris en 2001. Ainsi, que le facteur déterminant du sexe soit d'ordre génétique ou environnemental, il apparaît qu'une composante importante de la cascade moléculaire soit d'ordre épigénétique.

Partie IB - SEXUALITE ET REPRODUCTION SEXUEE : CONCLUSIONS.

Il existe deux grandes catégories d'espèces pratiquant la reproduction sexuée : les hermaphrodites et les gonochoriques. Les espèces gonochoriques, ou à « sexes séparés » produisent des gamètes mâles ou femelles, qui définissent leur sexe. La production de ces deux types de gamètes nécessite la mise en place de structures anatomiques spécifiques (gonades), tout comme le nécessitent la copulation (appareil reproducteur) et la sélection sexuelle (phénotypes parfois exagérés). L'ensemble de ces différences phénotypiques entre mâles et femelles est appelé dimorphisme sexuel.

Une combinaison de facteurs permet l'apparition et le maintien de ces structures sexualisées. Les facteurs déterminants sont très variés et peuvent être d'ordre génétique ou environnemental mais les cascades moléculaires sont le plus souvent très conservées (*i.e.* gènes *DMRT*s ou *Sox*). Dans les deux cas, les systèmes ne sont pas figés et il est possible d'observer des transitions entre les modes de déterminisme, comme des changements de hiérarchie dans les gènes déclencheurs des cascades moléculaires. L'intervention de facteurs épigénétiques permettra d'un côté une régulation fine de tous ces acteurs du sexe, et par ailleurs autorise une plasticité de ces mécanismes.

Il apparaît que la connaissance des mécanismes de la reproduction sexuée dans leur aspect évolutif comme fonctionnel est très enrichie par l'étude d'espèces non modèles. C'est ce que nous proposons de faire ici par l'étude d'un plathelminthe gonochorique, évolutivement éloigné de toutes les espèces étudiées jusqu'à présent : *Schistosoma mansoni.*

EncArt 2 : ET S'IL EXISTAIT UN « ART DU VIVANT » ?

« Lorsque l'on est naturaliste, on devrait sortir de son recoin humain, car dans la nature règne, non la détresse, mais l'abondance, et même le gaspillage jusqu'à la folie. La lutte pour la vie n'est qu'une exception, une restriction momentanée de la volonté de vivre… » (Friedrich Nietzsche, 1882)

Image 9. Rhinocéros Cosmique, ou Chair de Poule Rhinocérontique. Salvador DALI, 1956. *Cet animal est considéré comme le coffre-fort de l'humanité reprenant la légende vivante de l'unicorne s'élevant pour rejoindre le ciel. L'empilement de tests d'oursins symbolise les goûtes d'eau perdant leur virginité en tombant : Ce fût le premier frisson de l'humanité.*

Nous l'avons vu, la sexualité est un sujet qui soulève encore de nombreuses questions et parmi elles, la justification de ses aspects les plus « visibles » que sont les parades de séduction, ou les dimorphismes sexuels extrêmes. Ceci éveille non seulement la curiosité des biologistes mais aussi celle de nombreux écrivains, philosophes et artistes, interpelés par **la beauté des formes et des parures animales** (Consulter, par exemple, les œuvres de Colette, de Maurice Genevoix et de Jacques Delamain, ou encore les travaux de Bertrand Prévost et de Jacques Dewitte).

Parmi eux, le zoologue suisse Adolf Portmann (XXème siècle) s'est longuement interrogé sur ce qu'il appelle « **l'expressivité animale** ». Il entend par là toutes les tâches, zébrures, ocelles, couleurs, irisations qui habillent le monde animal qui, comme nous l'avons vu, sont **exacerbées dans le contexte du dimorphisme sexuel.** Par-delà l'utilité des formes à la conservation de l'individu (camouflage : **formes cryptiques**) où de son espèce (contexte de la sélection sexuelle et de la « séduction » animale : **formes signalétiques**), A. Portmann soulève la question de la multiplicité de ses formes qui selon lui ne peut être expliquée par la simple fonction de survie. Il souligne la dimension gratuite et non utilitariste de ce « **spectacle des formes vivantes** ». Selon lui, toutes ces configurations n'ont pas forcément de destinataire et apparaissent sans d'autre but que l'expressivité propre de l'individu : *«Nous regardons en spectateurs étrangers le spectacle des formes et des couleurs des êtres vivants, le spectacle de configurations qui dépassent ce qui serait nécessaire à la pure et simple conservation de la vie. Il y a là d'innombrables envois optiques qui sont envoyés dans le vide, sans être destinés à arriver. C'est une* ***autoprésentation*** *qui n'est rapportée à aucun sens récepteur et qui, tout simplement, apparaît»* (Portmann and others 1967). L'un des exemples les plus marquants est peut-être celui des opisthobranches, ou limaces de mer : pourquoi de telles couleurs, alors que les individus de leur propre espèce n'ont aucune perception visuelle ? Portman parle dans ce cas « d'**apparence sans destinataire** ». Il va même plus loin en proposant que les parures animales ne seraient pas des phénomènes accessoires (ou ornements) venant après les fonctions vitales, mais qu'en fait **le métabolisme n'aurait pour fonction globale que de servir cette apparence, faire vivre l'autoreprésentation.** Cela serait l'illustration que la « vie » serait supérieure à la simple « survie » et ainsi plus complexe qu'une addition de grandes fonctions : **paraître serait une fonction vitale.**

Image 10. Un opistobranche hermaphrodite.
Chromodoris quadricolor © T. Rolland

Partie 2: *Schistosoma mansoni*, de la maladie tropicale négligée aux questions de reproduction sexuée.

A. Les schistosomiases, des maladies tropicales négligées.

1. Données épidémiologiques.

Par définition, les maladies tropicales dîtes négligées sont des maladies infectieuses qui se distribuent au niveau des tropiques et/ou des régions subtropicales qui sont des zones chaudes et humides. De par cette répartition, elles touchent des populations ayant peu de poids politique. Par conséquent, les financements alloués à la prévention, le traitement ou la recherche sont peu nombreux et ce, malgré l'impact important de ses maladies sur la morbidité et la mortalité dans les pays concernés, et parfois même malgré l'existence de solutions efficaces pour les combattre. Elles sont en cela un signe de pauvreté et d'exclusion. C'est le cas des schistosomiases, ou bilharzioses, qui constituent la **seconde endémie parasitaire mondiale** après la malaria.

Il existe **six espèces de schistosomes pathogènes pour l'homme** qui, selon la nature des organes touchés, peuvent être responsables de **trois types de bilharziose**: *Schistosoma mansoni, S. japonicum* et *S. mekongi* sont responsables de la bilharziose intestinale, *S. haematobium* de la forme urogénitale de la maladie, *S. intercalatum* et *S. guineensis* de la schistosomiase rectale et génitale. En 2009, un rapport de l'OMS estimait que deux ans auparavant **235 millions de personnes** étaient atteintes par ces maladies parasitaires (*S. mansoni* et *S. haematobium* étant les espèces les plus répandues) et que 732 millions de personnes y étaient exposées dans 78 pays à travers le monde (Tableau 4 et Figure 13). En 2012, 52 de ces pays présentaient un risque de transmission modéré à élevé, qui aurait justifié le traitement préventif de 249 millions de personnes. Seuls 42,1 millions en ont réellement bénéficié (Aide-mémoire n°115 de l'OMS, mis à jour en février 2014). De plus, de par son mode de transmission par l'eau, cette maladie est en relation directe avec les conditions de pauvreté des pays tropicaux et sub-tropicaux : l'absence d'eau potable, de sanitaires, la chaleur expose inévitablement les populations à l'eau contaminée des rivières et des lacs. Dans ce contexte, des mesures de prophylaxie seraient un bon moyen de lutter contre les schistosomiases : disponibilité d'eau potable, moyens d'assainissement, éducation en matière d'hygiène, réduiraient le contact avec des eaux infestées et la contamination des sources (cet aspect sera développé plus loin dans la partie *Prise en charge d'une maladie antique*).

Tableau 4. Répartition géographique des schistosomiases humaines en fonction des organes atteints et de l'espèce du parasite. *En gris, l'espèce qui fait l'objet de notre étude, et qui est la plus répandue :* S. mansoni.
Adapté de WHO Fact sheet N°115, February 2014.

Type de schistosomiase (en fonction du principal organe atteint)	Espèce de Schistosomes	Répartition géographique
Schistosomiase intestinale	*Schistosoma mansoni*	Afrique, Péninsule Arabique, Caraïbes, Brésil, Venezuela, Suriname
	Schistosoma japonicum	Chine, Indonésie, Philippines
	Schistosoma mekongi	Plusieurs districts du Cambodge et de la République démocratique populaire Lao.
Schistosomiases rectale et génitale	*Schistosoma intercalatum* *Schistosoma guineansis*	Zones des forêts tropicales humides en Afrique centrale
Schistosomiase urogénitale	*Schistosoma haematobium*	Afrique, Moyen-Orient

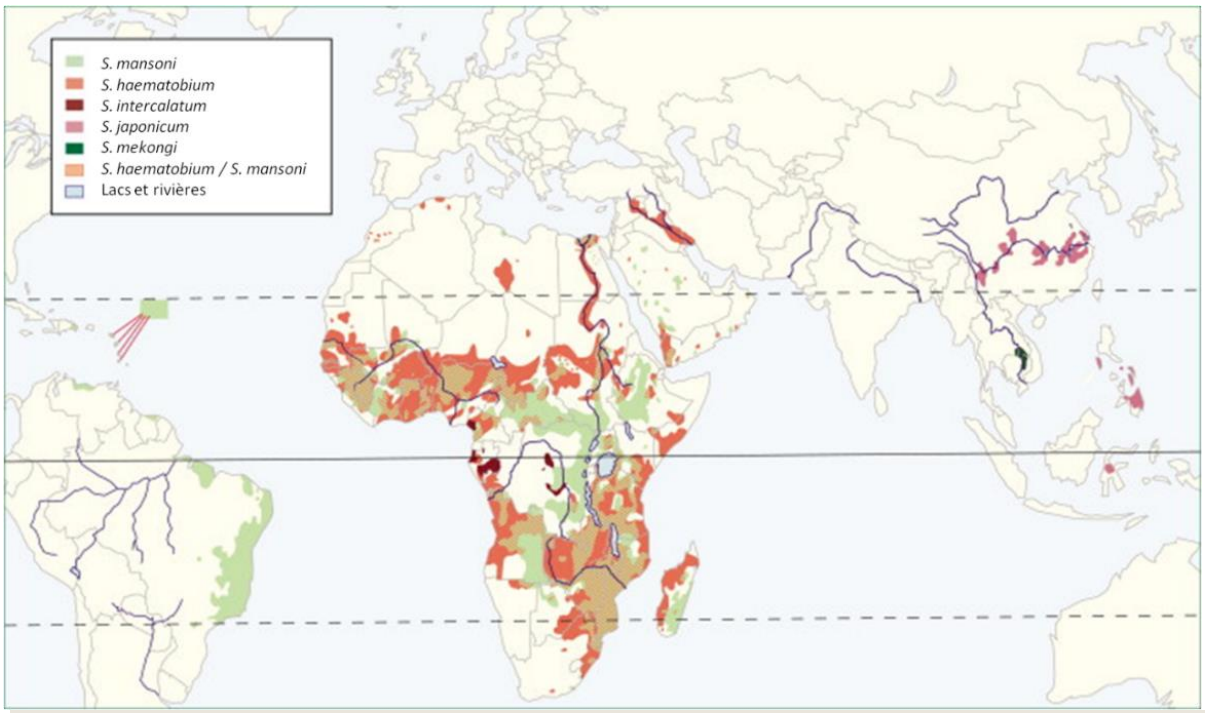


Figure 13. Distribution globale des différentes espèces de schistosomes pathogènes pour l'Homme.
© Gryseels et al. 2006

Il a récemment été rapporté plusieurs cas de schistosomiases uro-génitales contractées dans la rivière du Cavu, en Corse du Sud (Jérôme Boissier et al. 2015) (Figure 14). Il s'agit de la **première émergence de schistosomiase humaine autochtone en France.** Le dernier foyer Européen, au Portugal, ayant perduré de 1920 à 1970.

Figure 14. La bilharziose en Corse.

A. Localisation du site d'infestation : Sainte-Lucie-de-Porto-Veccio.
B. Le Cavu, rivière où les patients se sont infestés.
C. Deux hôtes intermédiaires Bulinus *de* S. haematobium *(flèches noires), ainsi qu'une ponte (flèche blanche).*

2. Le cycle de vie hétéroxène de *S. mansoni.*

Les schistosomes possèdent un **cycle de vie complexe, ou hétéroxène**, caractérisé par l'alternance de quatre stades : deux phases larvaires libres en eau douce et deux stades parasitaires : dans l'hôte intermédiaire mollusque et dans l'hôte définitif vertébré (Figure 15).

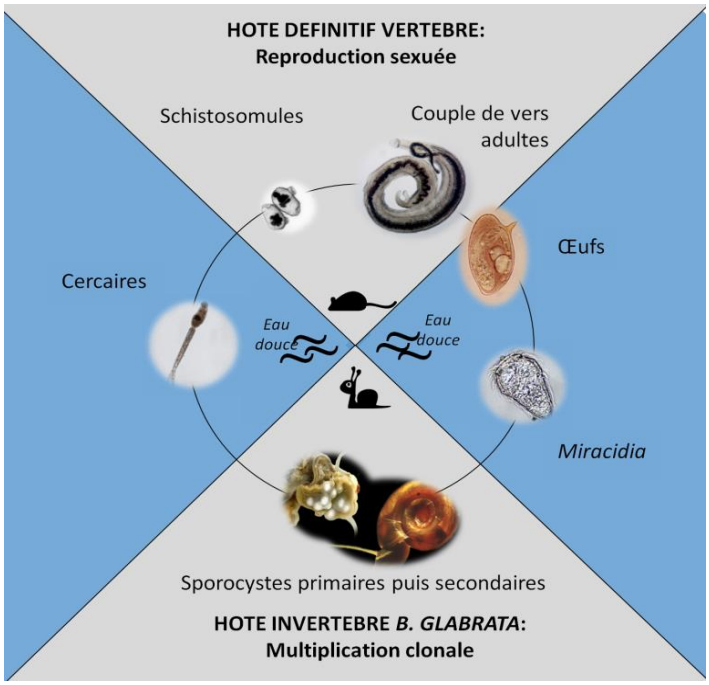


***Figure 15. Cycle de vie hétéroxène de* Schistosoma mansoni.**

Chez *Schistosoma mansoni*, comme chez les autres schistosomes, la reproduction sexuée générant les œufs a lieu dans l'hôte définitif vertébré. Ces œufs sont libérés hors de l'hôte *via* les fèces. En eau douce, la diminution de température et la luminosité entraînent l'éclosion de ces œufs d'où émergent les larves nageantes ciliées appelées **miracidia** (de 150 à 200 µm). Les miracidia pénètrent l'hôte intermédiaire qui est une planorbe du genre *Biomphalaria* (Leiper 1915). Ils se transforment en sporocystes, subissant deux vagues de multiplication asexuée (succession de mitoses) sous forme de **sporocystes primaires puis secondaires** (Pan 1965). Dans les sporocystes secondaires les nouvelles larves se différencieront en **cercaires** (de 400 à 600 µm) qui seront à nouveau émises en eau douce. **Un miracidium peut ainsi générer des milliers de cercaires clonales** (Figure 15). Ces larves nageantes munies d'une queue fourchue (*i.e.* furcocercaires) cherchent et pénètrent activement l'hôte vertébré au niveau de la peau. La traversée de l'épiderme est facilitée par le relargage du contenu enzymatique des glandes de pénétration, et sera marquée par le détachement de la queue (Figure 16, étape 1). Le nouvel individu ainsi transformé se nomme **schistosomule**. Il lui faut en moyenne trois jours pour rejoindre un vaisseau, veineux ou lymphatique, et y pénétrer afin de migrer jusqu'au cœur droit. Il atteint ensuite les **poumons** entre le cinquième et le huitième jour (Wilson et al. 1986) où il se développe (Faust and Hoffman 1934). Deux semaines après l'infestation et un nouveau passage dans le cœur, gauche cette fois, il continue sa migration vers la **veine porte-hépatique** (Figure 16, étape 2). C'est là que mâles et femelles (mesurant de 8 à 25mm) vont s'accoupler : le mâle possède une structure spécifique appelée **canal gynécophore,** destinée à recueillir la femelle (Figure 16, étape 3). Dans le cas des bilharzioses intestinales, le couple va migrer à contre sens du

flux sanguin vers les **veines mésentériques** aux alentours de la 5ème semaine (Figure 16, étape 4). La femelle quittera alors régulièrement le canal gynécophore du mâle afin d'aller libérer un œuf unique à l'extrémité des veinules, au plus près de l'épithélium mésentérique : 200 à 300 fois par jour (Figure 16, étape 5)! Les œufs sont ovales et munis d'un éperon latéral qui leur permet de traverser la barrière intestinale et d'atteindre la lumière du tube digestif afin d'être libérés dans les fèces (Figure 16, étape 6 et 7). L'oeuf de *S. mansoni* mesure entre 130 et 160 µm de long, et 40 à 60 µm de large. Il possède une coque transparente et un éperon latéral. Malgré cette structure spécialisée il arrive que les œufs ne parviennent pas à traverser l'épithélium intestinal et soient alors emportés par le flux sanguin vers le foie. Ils s'enkysteront alors dans le tissu hépatique générant une inflammation.

3. La bilharziose intestinale, du parasitisme silencieux à la pathologie sévère.

La **bilharziose intestinale à *Schistosoma mansoni*** est une maladie chronique caractérisée par un tableau clinique relativement aspécifique : douleurs abdominales, diarrhées et sang dans les selles. A un stade avancé, il est fréquent d'observer au niveau systémique une anémie, et au niveau organique une hépato-splénomégalie (augmentation anormale du volume du foie et de la rate), de l'ascite (épanchement de liquide dans l'abdomen) et une hypertension portale (pression anormalement élevée de la veine porte en amont du foie). Dans les cas les plus sévères, cette maladie parasitaire peut même entraîner des dysfonctions cognitives et un retard de croissance. (description basée sur un travail du *Scientific Working Group (SWG) on Schistosomiasis*, 2005). Si l'anémie peut être expliquée par le mode de nutrition hématophage des schistosomes, **les autres symptômes sont dûs au passage de certains œufs à travers l'épithélium intestinal ou à leur accumulation dans les tissus, ainsi qu'à la pathogénicité des vers adultes.** Si l'individu est porteur d'un seul couple de parasite, la maladie peut éternellement rester silencieuse ; alors que dans les cas de charge infectieuse importante, les symptômes lourds peuvent rapidement apparaître.

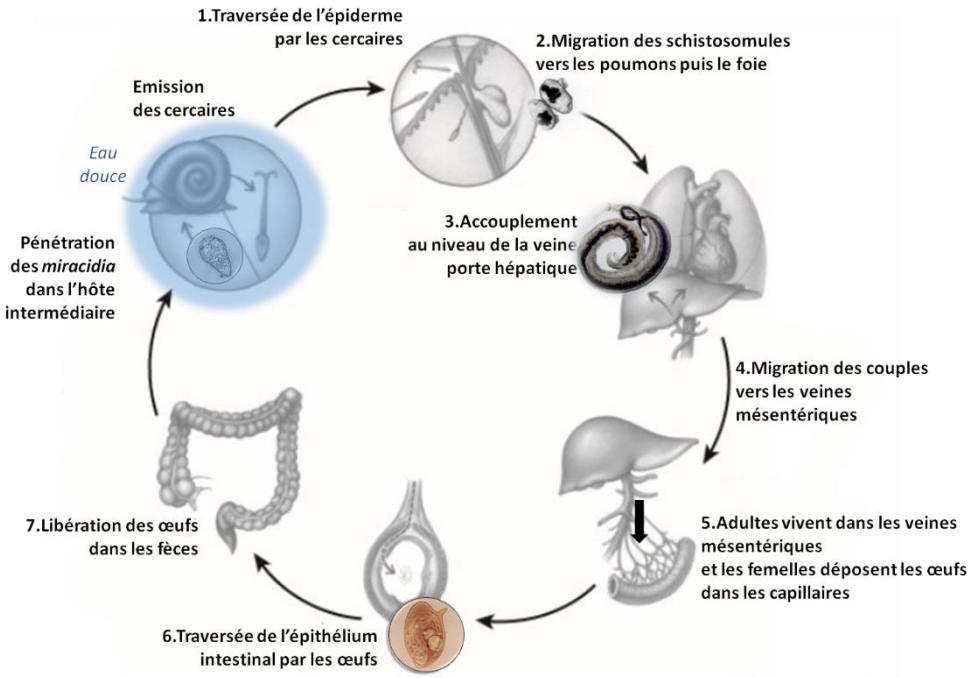


Figure 16. Migration du parasite* Schistosoma mansoni *dans son hôte vertébré *(étapes 1 à 7).*
Adapté de © Hagen et al. 2015

4. Prise en charge récente d'une maladie (au moins) antique.

Image 10. Utilisation d'un puits à balancier permettant de puiser de l'eau dans les canaux d'irrigation dans l'Egypte antique. *Musée du Louvre, fresque de la tombe d'Ipouy à Deir el-Médineh, Nouvel Empire (vers 1250 av JC).*

Des études de paléopathologie sur des momies d'Egypte antique ont révélé la présence d'œufs de schistosomes dans des tissus humains, ce qui permet de dire que ces parasites sévissaient déjà il y a plusieurs milliers d'années (Nunn and Tapp 2000). L'agriculture très développée à cette époque et la grande richesse en canaux d'irrigation était déjà un terrain propice au développement des bilharzioses. Il n'est pas possible de déterminer sa présence antérieure de par l'absence de fossiles chez les espèces parasites. Malgré son ancienneté (au moins) antique, la découverte de cette maladie est relativement récente et peut être attribuée à Theodor Bilharz, qui lui donnera son nom, en 1852 (Bilharz 1852). C'est un demi-siècle plus tard que sera découvert l'hôte intermédiaire mollusque du parasite (Leiper 1915). La connaissance du cycle de vie des schistosomes étant un préalable indispensable à la mise en place de mesures pour lutter contre la maladie, **plusieurs niveaux de lutte étaient désormais envisageables : de la prévention de la transmission au traitement** (Sturrock et al. 2001 pour revue).

Dans un premier temps, en l'absence de toute thérapie efficace, **l'hôte intermédiaire mollusque est apparu comme une cible privilégiée de prévention** : la première tentative a consisté en l'assèchement ponctuel de son habitat. Cette méthode s'est néanmoins avérée peu adaptée, car d'une part la survie d'un très petit nombre de mollusques suffit au maintien du cycle et, par ailleurs, on peut aisément admettre que de telles mesures d'assèchement soient difficiles à accepter par les populations locales. L'impact des schistosomiases était alors grandissant et il devenait urgent d'agir: le développement de l'agriculture et la migration des populations entraînaient une exposition croissante aux sources contaminées et la multiplication des foyers infectieux. Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale et la formation de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1948 que de véritables mesures, à plus grande échelle, ont été mises en place. Ainsi, dès 1950 l'hôte intermédiaire est ciblé par des molluscicides. Si cela n'a pas endigué définitivement la maladie, cela a au moins permis, en association avec des mesures de prophylaxie et l'utilisation de certains **antihelminthiques** comme la Niclosamide®, de minimiser sa transmission jusque dans les années 80. C'est alors que la lutte contre les schistosomiases a connu un tournant important : c'est l'arrivée du Praziquantel® (Cioli et al. 2014), premier antihelminthique très efficace contre la schistosomiase. Le coût de ce traitement est devenu rapidement très faible (il est actuellement estimé entre 0,20 et 0,30 $US) ce qui est un atout majeur pour sa distribution à grande échelle. Son mode d'administration oral non invasif est un second avantage de cette chimiothérapie. Son mode d'action est aujourd'hui encore relativement méconnu mais il agirait vraisemblablement sur les canaux calciques qu'il rendrait plus perméables (Doenhoff et al. 2008). Cela provoquerait des contractions musculaires anarchiques et une altération tégumentaire des vers adultes. Il n'a cependant aucune action sur les stades précoces et cela constitue une de ses limites. Par ailleurs il ne prévient pas la ré-infestation, ce qui est un inconvénient majeur car les populations sont sans cesse réexposées. Toutefois des traitements réguliers aident à prévenir les risques de développer une forme sévère de la maladie ce qui justifie sa distribution à grande échelle. Il reste encore à ce jour le **seul traitement efficace**.

Tableau 5. Avantages et inconvénients du seul traitement actuellement utilisé contre les schistosomiases : le Praziquantel®.

AVANTAGES	INCONVENIENTS
- Efficace sur les stades adultes en une seule prise - Diminution des risques de développer une forme grave - Peu d'effets secondaires - Administration non invasive - Peu couteux (0,20 à 0,30 $ US)	- Non-efficace sur les stades précoces - Accès et suivi régulier difficile - Ne prévient pas d'une ré-infestation - Cas sporadiques de résistance

L'existence d'un seul traitement n'est pas suffisante car, de façon générale, l'apparition de **résistance** aux anti-infectieux est connue pour être favorisée dans ces conditions. C'est déjà sporadiquement observé dans le cas du praziquantel (Doenhoff, Cioli, and Utzinger 2008). Ainsi, il apparaît important aujourd'hui d'anticiper la possibilité d'une amplification de ces cas de résistance. C'est pourquoi d'importants travaux de recherche continuent d'être menés. L'un des fers de lance actuel est le développement de **cibles vaccinales**, ce qui répondrait à la problématique de l'exposition continue au parasite. Dès la fin des années 70, l'étude de Minard et ses collègues (Minard et al. 1978) a ouvert des portes en ce sens. Ils ont en effet montré qu'il était possible d'immuniser des souris en les exposant à des cercaires préalablement irradiées : il s'agissait d'une exposition antigénique sans déclanchement de la pathologie, ce qui correspond par définition à la méthode de vaccination. Les récentes avancées en biologie moléculaire et notamment l'avènement des technologies de séquençage massif ont permis de générer une **grande quantité d'informations génomiques, transcriptomiques et protéomiques** qui aideront sûrement à la découverte de ces nouvelles cibles thérapeutiques espérées.

PARTIE IIA - LES SCHISTOSOMIASES, DES MALADIES TROPICALES NEGLIGEES : CONCLUSIONS

Les schistosomes, parasites humains, sont la cause de la seconde endémie parasitaire mondiale. Ils possèdent un cycle de vie hétéroxène et la reproduction sexuée dans leur hôte définitif implique une production intense d'œufs. Ce sont ces œufs qui causent la maladie chronique de type inflammatoire. Il n'existe qu'un seul traitement efficace à l'heure actuelle mais la nécessité d'un suivi régulier et l'émergence potentielle de résistances incitent la communauté scientifique, soutenue par l'Organisation Mondiale de la Santé, à développer de nouvelles cibles ou stratégies thérapeutique. Ainsi, l'approfondissement des connaissances sur ce parasite, et notamment son stade précoce de développement intra-vertébré et sa reproduction constituent un enjeu important en santé humaine.

B. Les schistosomes, des plathelminthes gonochoriques atypiques !

1. Leur position dans la classification du monde vivant.

Les schistosomes sont des **animaux**, métazoaires supérieurs (ou **eumétazoaires**), et donc par définition, des organismes pluricellulaires hétérotrophes. Ce sont aussi des **bilatériens,** caractérisés comme leur nom l'indique, par une symétrie bilatérale définissant les axes dorso-ventral, antéro-postérieur et médio-latéral. Ils présentent trois feuillets cellulaires fondamentaux : ectoderme, mésoderme, endoderme (on dit qu'ils sont triploblastiques), un tube digestif à deux orifices, un tégument syncytial et des organes différenciés, dont un système nerveux structuré avec des nerfs et des ganglions. D'un point de vue moléculaire, les bilatériens partagent les gènes homéotiques de développement de la famille HOX (pour HomeobOX), qui régulent le développement différencié des organes d'avant en arrière, et leur coordination avec le système nerveux. En diminuant l'entonnoir phylogénique, les schistosomes appartiennent à la division des **protostomiens**, qui développent l'orifice buccal avant l'anus, et à la sous-division des **platyzoaires** qui n'ont ni système circulatoire ni respiratoire. Ce sont des vers plats acoelomates (embranchement des **plathelminthes**) et parasites (sous-embranchement des ***neodermatada***). Ils possèdent deux ventouses : l'une orale et l'autre ventrale (classe des **trématodes**). Ce sont des **digènes** présentant un cycle de vie hétéroxène à deux hôtes et deux stades larvaires libres : les miracidia avec une paire de protonéphridies (ébauches du système excrétoire et osmorégulateur) et les cercaires à queue bifides, caractéristiques de l'ordre des ***strigeatida***. Enfin, la famille des ***Schistosomatidae***, décrite en 1898 sous le nom de *Schistosomidae* par Stiles et Hassallet (Khalil 2002) puis renommée par Poche en 1907, regroupe une centaine d'espèces de vers parasites à hôtes définitifs homéothermes et à sexes séparés (Tableau 6).

Tableau 6. Classification phylogénique des schistosomes.

Règne	**Sous-règne**	**Infra-règne**	**Rameau ou division**	**Sous-division**	**Embranchement**
Animaux	Eumétazoaires	Bilateriens	Protostomiens	Platyzoaires *Cavalier-Smith, 1998*	Plathelminthes
Sous-embranchement	**Classe**	**Sous-classe**	**Ordre**	**Famille**	**Genre**
Neodermatada	Trematodes *Rudolphi, 1808*	Digènes *Carus, 1863*	*Strigeatida* *Sudarikov, 1959*	*Schistosomatidae* *Poche, 1907*	*Schistosoma* *Weinlan, 1858*

2. Un scandale évolutif*.

**(Combes 1991)*

Les *Schistosomatidae* sont atypiques au sein des plathelminthes car ces espèces sont gonochoriques. En effet, à l'exception de certains didymozoïdes, les 24000 autres espèces de cet embranchement sont toutes hermaphrodites, qu'elles soient des espèces libres ou parasitaires (Figure 17) (Tchuenté et al. 1996). L'apparition ponctuelle du gonochorisme chez cette famille lui a valu l'appellation de « **scandale évolutif** » (Combes 1991) et un vif intérêt de la communauté scientifique pour sa biologie reproductive depuis plus de 30 ans (Short 1983; Basch 1990; Read and Nee 1990; Combes 1991; Despres and Maurice 1995; Morand and Müller-Graf 2000; Loker and Brant 2006; Beltran and Boissier 2008a, entre autres….). Au centre du questionnement : pourquoi des « sexes séparés » ont-ils émergé chez ces espèces ?

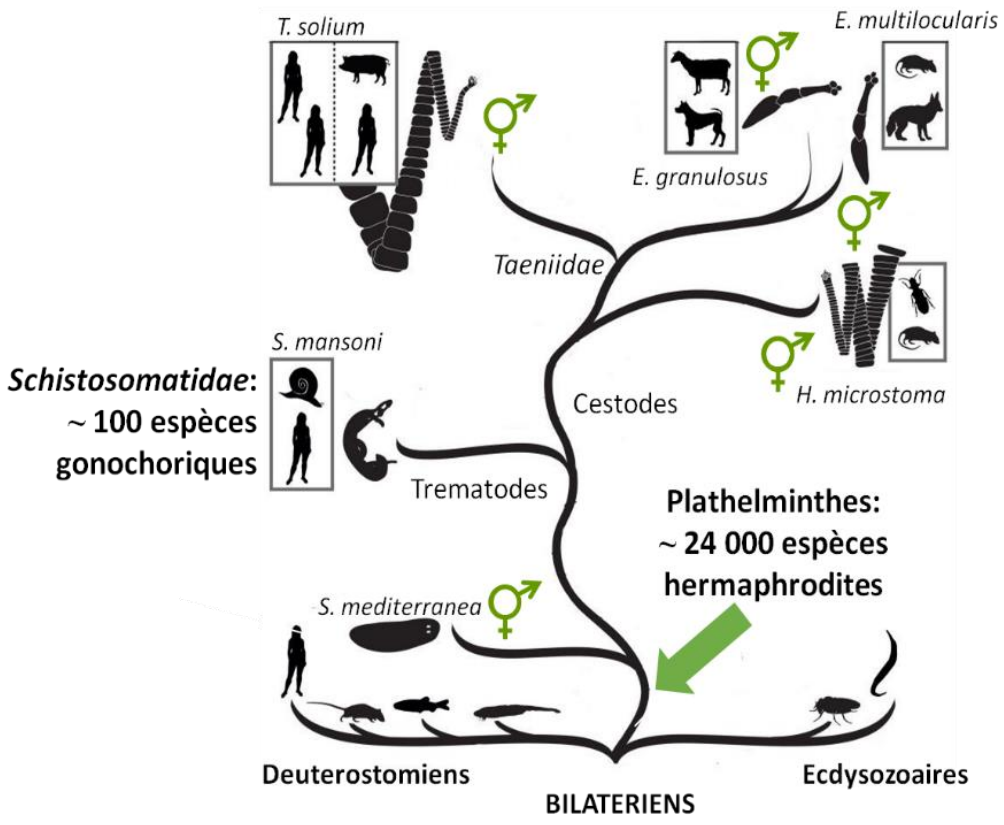


Figure 17. Les* Schistosomatidae*, gonochoriques, sont atypiques parmi 24OOO espèces de plathelminthes hermaphrodites, dont la plupart sont des parasites *(i.e. trématodes).*
© Adapté de Tsai et al. 2013

Parmi les espèces parasitaires, ou trématodes, les schistosomes se distinguent également par leur cycle de vie à un seul hôte intermédiaire. En effet, les trématodes possèdent typiquement deux hôtes intermédiaires (Poulin and Cribb 2002) et le cycle des schistosomes, comme celui de quelques autres taxa, peut être qualifié de « **tronqué** ». Il existe différentes « façons » de simplifier ce cycle de vie, et là encore les schistosomes sont originaux puisqu'ils sont **les seuls à infester leur hôte définitif au stade cercaire.** Ce mode d'infestation est supposément lié leur **habitat définitif lui aussi original: le système vasculaire**, qu'il rejoint juste après la traversée épidermique (Figure 16) (Combes 1991). Dans le contexte des interactions hôtes/parasites, il apparaît évident que de telles évolutions du cycle de vie entraîne des changements de pression sélective sur les espèces.

L'hermaphrodisme semble particulièrement adapté à un mode de vie parasitaire, où les individus ont une faible mobilité et un **habitat restreint à leur hôte, limitant les possibilités de rencontre** (Tomlinson 1966). On pourrait penser que le compartiment sanguin, plus restrictif encore, favoriserait obligatoirement l'hermaphrodisme. C'est le cas chez d'autres parasites sanguins de vertébrés à sang froid (*i.e.* poïkilothermes), comme les *Sanguinicolidae* chez les poissons ou les *Spirorchidae* chez les tortues. Phylogénétiquement, ces parasites hermaphrodites sont les espèces dîtes « sœurs » des *Schistosomatidae* (Brooks et al. 1985). Nous pouvons dès lors nous demander **quelles sont les pressions sélectives ayant conduit à l'apparition du gonochorisme chez les *Schistosomatidae*** et pas chez les *Spirorchidae*. L'hypothèse actuellement retenue est celle de **la colonisation d'hôtes homéothermes** (*i.e.* à sang chaud), présentant un **système immunitaire plus complexe** (Basch 1990). La seule exception à cette théorie est un parasite décrit chez un crocodile d'eau douce: *Griphobilharzia amoena* (Platt et al. 1991a; Platt and Brooks 1997). Ce membre de la famille des *Schistosomatidae* est lui aussi gonochorique, malgré le fait que son hôte définitif soit un vertébré à sang-froid. Il a premièrement été envisagé que cette espèce ait acquis le gonochorisme avec les schistosomes, puis qu'un nouveau changement d'hôte ait eu lieu depuis un hôte homéotherme vers son hôte actuel poïkilotherme (Platt and Brooks 1997). Il a ensuite été considéré comme le chaînon manquant dans l'évolution des schistosomes, qui auraient été des parasites des archosaures (crocodiliens, oiseaux, ptérosaures et dinosaures) s'étant diversifiés avec la colonisation des hôtes homéothermes (Morand and Müller-Graf 2000; Combes et al. 1991). Enfin, une récente étude montre en fait qu'il serait plus proche des *Spirorchidae* (Figure 18), et que le gonochorisme chez cette espèce serait apparu indépendamment (Brant and Loker 2005). Cette étude propose que les **schistosomes les plus ancestraux soient des parasites d'oiseaux marins**, et que la **transition de l'hermaphrodisme vers le gonochorisme chez les « *Spirorchiid protoschistosomes* » aurait pu être favorisée par un état d'endothermie partielle chez des tortues marines** (Spotila and Standora 1985; Paladino, O'Connor, and Spotila 1990) (Figure 18).

Ainsi, cette étude va bien dans le sens d'une apparition du gonochorisme chez les schistosomes résultant de l'adaptation au **système sanguin des vertébrés à sang chaud** (Basch 1990; Combes 1991). Cette adaptation aurait **un sens à la fois génétique et fonctionnel**, que nous allons à présent développer.

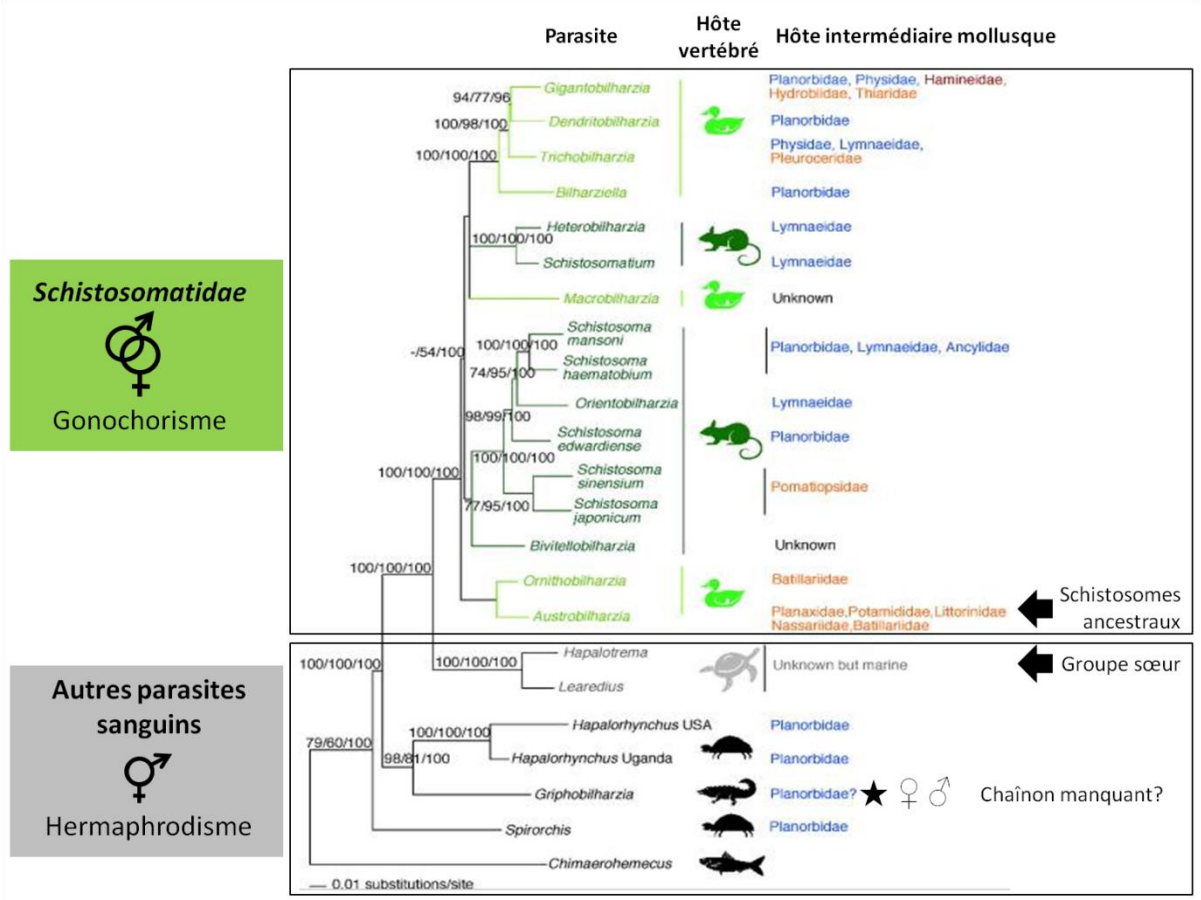


Figure 18. Arbre de similarités entre différentes espèces de parasites sanguins, dont les* Schistosomatidae*, basé sur l'analyse des séquences ribosomales 18s et 28s et mitochondriales de la cytochrome-oxydase. *Nous pouvons distinguer sur la partie haute de l'arbre, les espèces gonochoriques de* Schistosomatidae*, dont les hôtes vertébrés sont des* ***oiseaux*** *(en vert clair) ou des* ***mammifères*** *(en vert foncé) à sang chaud. Les autres parasites sanguins sont majoritairement hermaphrodites et ont des hôtes à* ***sang froid*** *(en noir) ou à* ***endothermie partielle*** *(en gris). Parmi eux,* Griphobilharzia amoena *(signalé par une étoile) occupe une position atypique car cette espèce est gonochorique. Brant & Loker proposent que les proto-schistosomes soient des* Spiirorchidae *des tortues marines, et que les schistosomes gonochoriques ancestraux soient des parasites d'oiseaux marins (flèches noires). Adapté de © Brant and Loker, 2005.*

3. Les schistosomes et la Reine Rouge.

a. Reproduction sexuée puis gonochorisme, le choix de la diversité.

Nous l'avons vu précédemment, la reproduction sexuée permet de créer de l'innovation génétique à chaque génération, et donc confère une **meilleure capacité adaptative** à l'espèce si elle évolue, par exemple, dans un environnement changeant. De par son **statut de parasite**, les schistosomes comme les autres trématodes sont exposés à un environnement exerçant une **forte pression de sélection** et le mode sexué de reproduction leur permet donc de s'adapter sans cesse et de faire évoluer les interactions hôtes/pathogènes dans le cadre de la **théorie de la reine rouge** (Van Valen 1973), ou « course aux armements ». Dans la première partie de l'introduction nous avons abordé cette théorie du point de vue de l'hôte, et ici donc plus du point de vue du parasite. Nous l'avons vu, les schistosomes ont des hôtes vertébrés à sang chaud avec un **système immunitaire élaboré**. Pour ces espèces, l'enjeu adaptatif est donc particulièrement élevé, et le gonochorisme autorise le renouvellement incessant de la diversité génétique, alors que l'hermaphrodisme pourrait conduire à une dépression endogamique notamment par l'autofécondation (*i.e.* réduction de la valeur sélective d'une population liée à la reproduction entre individus apparentés). Cette stratégie de diversification

guidera le **choix des partenaires sexuels** : chez *Schistosoma mansoni*, les femelles choisissent des **mâles génétiquement dissimilaires pour augmenter l'hétérozygotie de leur descendance** (Beltran et al. 2008). Par ailleurs, l'efficacité de cette **stratégie « d'hétérozygotie » est particulièrement illustrée par la vigueur hybride.** De récents travaux de notre laboratoire (Fneich et al. submitted) ont montré que le croisement de deux souches de *S. mansoni* (Guadeloupéenne GH2 et Brésilienne BRE) entraînait une vigueur hybride observable à la fois chez le vertébré (production plus intense d'œufs) et chez le mollusque (plus grande prévalence).

b. Un cycle de vie hétéroxène : un « double avantage » ?

Comme décrit dans la partie II.A.2, les schistosomes ont un cycle de vie hétéroxène. Par définition, cela signifie que le parasite alterne les phases de reproduction sexuée (dans l'hôte définitif) et de multiplication asexuée (dans l'hôte intermédiaire). Nous venons de voir que l'étape de reproduction sexuée est indispensable au maintien adaptatif de l'espèce dans le contexte de l'interaction hôte/parasite. Si l'on considère l'étape de **multiplication asexuée** dans l'hôte intermédiaire mollusque, elle **autorise quantitativement la perpétuation de l'espèce** : la succession de divisions mitotiques permet la production de milliers de larves infestantes (*i.e.* environ 100000 cercaires pour un *miracidium*). La grande quantité de ces larves infestantes **augmente la probabilité de rencontre de l'hôte définitif**. Par ailleurs, l'émission de ces larves dans le milieu aquatique a lieu de façon **synchronisée** (Hawking 1975; Théron 2015). Cette synchronisation augmente la probabilité d'**infestation d'un même hôte par les deux sexes partenaires** et favorise donc la reproduction sexuée. Si nous voulions résumer la stratégie reproductive des schistosomes, nous pourrions dire que la phase intra-molluscale est consacrée à « la quantité » (*i.e.* perpétuation de l'espèce) et que la phase intra-vertébrée est dédiée à « la qualité » (*i.e.* adaptation de l'espèce) (Figure 19). Cependant cette vision binaire est à pondérer, car la reproduction sexuée donne lieu à une production intense d'œufs (200 à 300 par jour), nécessaire à la fois pour pallier à la perte de la moitié d'entre eux qui s'enkystent dans les organes (cul-de-sac) et pour favoriser la rencontre de l'hôte intermédiaire. Par ailleurs, la clonalité des cercaires est parfois remise en cause car il a été observé des évènements de recombinaison mitotique lors de la multiplication asexuée des sporocystes (Bayne and Grevelding 2003). Ainsi, ces espèces hétéroxènes additionnent les avantages liés aux deux types de reproduction, tout en palliant (au moins partiellement) à leurs inconvénients (Figure 19).

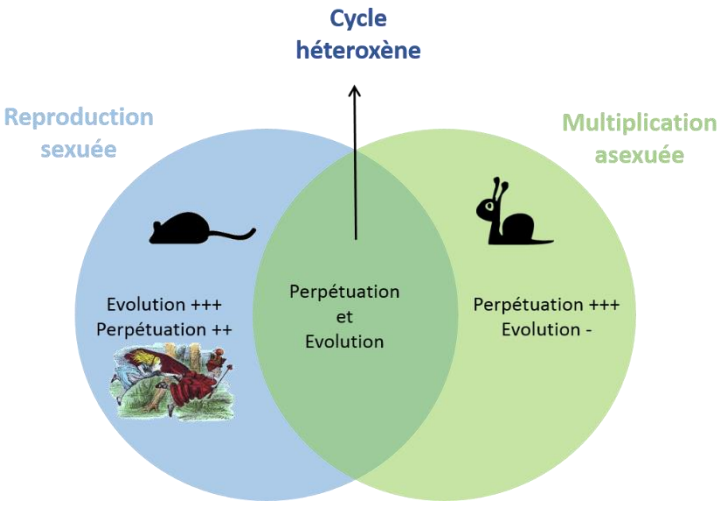


Figure 19. Le cycle hétéroxène des schistosomes, comme celui de tous les trématodes digènes, combine les bénéfices de la multiplication asexuée et de la reproduction sexuée.

c. Cas particuliers.

Il arrive que des exceptions au gonochorisme soient observées chez les *Schistosomatidae.* C'est notamment le cas de l'espèce ***Schistosomatium douthitti*, capable de parthénogenèse**. Chez cette espèce, il peut être distingué des mâles ZZ et des femelles ZW, mais également des mâles Z (Short 1952; Short and Menzel 1959). On pourrait supposer que cette stratégie permettrait juste de pallier à la problématique de la rencontre du partenaire, or même accouplées, les femelles *S. douthitti* pratiquent la parthénogenèse ! Par ailleurs, des femelles d'autres espèces de schistosomes comme *S. mansoni*, peuvent être capables de parthénogenèse quand elles s'apparient à des mâles *S. douthitti* (Short 1952). Ce phénomène n'est pas sans rappeler le comportement pseudo-copulatoire des lézards fouette-queue (Pour rappel, paragraphe I.A.3.b). Evolutivement, **les schistosomes pourraient bénéficier de la co-occurrence de deux espèces au sein d'un même hôte tout en assurant le maintien de leur propre espèce** en attendant un mâle de la même espèce (Basch and Basch 1984). Alternativement**, si la distance phylogénique entre les deux espèces est moindre, cette co-ocurrence donne lieu à une hybridation** (Jourdane et al. 1995)**.**

Il a par ailleurs été observé des cas d'hermaphrodismes chez les mâles *S. mansoni*, allant de quelques cellules vitellines dans le parenchyme à la possession de vrais ovaires, notamment dans le cas d'interaction avec des hôtes non-permissifs (Cioli et al. 1977; Neves et al. 2003; Hulstijn et al. 2006). Cela laisse présager de l'importance de l'interaction hôte/parasite dans la différenciation sexuelle de *S. mansoni,* ce que nous verrons plus tard.

***Image 11. Caractères hermaphrodites chez un « mâle »* S. mansoni**.
© Hulstijn et al. 2006

4. Les sexes séparés des schistosomes ou la « théorie du genre »… ?

a. Gonochorisme et dimorphisme sexuel, un coup d'œil évolutif.

La « répartition des tâches ».

Chez *Schistosoma mansoni*, le gonochorisme est accompagné d'un dimorphisme sexuel marqué: les **mâles mesurent 8 à 12mm, ils sont musculeux** et possèdent une **ventouse ventrale (ou acetabulum) très développée**. Ils possèdent également des structures spécialisées : un **canal gynécophore**, dont le tégument est couvert de **tubercules** (*i.e. « spikes* ») (Machado-Silva et al. 1997) leur permettant de **recueillir la femelle**. Celle-ci en contraste est **fine, longue de 15 à 25mm,** et possède un acetabulum moins développé, elle peut facilement **se loger dans le canal du mâle**. Il a été proposé que ce dimorphisme sexuel soit en fait une **adaptation fonctionnelle au système circulatoire de l'hôte,** par une « répartition des tâches domestiques» (Basch 1990). En effet, la musculature du mâle permet au couple de **se mouvoir** depuis la veine porte jusqu'aux veines mésentériques, à contre sens du flux

sanguin, puis de **se maintenir** dans ce système. La finesse de la femelle quant à elle, lui permettra d'aller **déposer ses œufs avec précision** dans les capillaires mésentériques, au plus près de l'épithélium intestinal, afin d'optimiser leur traversée et leur libération dans les fèces. Comme déjà mentionné, la femelle déposerait 200 à 300 œufs par jour, un par un. Elle le fera alternativement dans différentes veinules. La **contrainte de mobilité est donc cruciale et cette distribution des tâches assurerait un meilleur succès reproducteur du couple.** Les schistosomes ne seraient donc pas seulement des individus à sexes séparés, mais surtout **à sexes complémentaires**. Ici aussi, le **choix du partenaire** illustre le bien-fondé de cette théorie : la **taille du mâle influencerait son succès reproducteur** (Steinauer 2009).

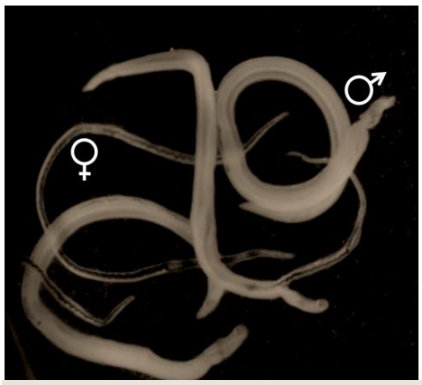


***Image 12. Dimorphisme sexuel prononcé chez des vers adultes de* S. mansoni.**

Par ailleurs, il a été décrit que des femelles isolées ont une survie inférieure à celle des femelles accouplées (Boissier and Mone 2000). Le **dimorphisme sexuel** (et notamment la présence du canal gynécophore mâle permettant de recueillir la femelle) n'est donc pas seulement nécessaire à la fonction de reproduction mais aussi à la **survie des individus** dans l'hôte.

La sélection du dimorphisme sexuel.

Cet avantage fonctionnel du dimorphisme sexuel est précisément ce qui aurait guidé la transition d'un système reproducteur hermaphrodite vers le système gonochorique (Platt and Brooks 1997). L'état transitoire aurait été un **état androdioïque caractérisé par la co-occurrence d'individus mâles et d'individus hermaphrodites.** Les individus hermaphrodites fins étaient spécialisés dans le dépôt des œufs pendant que les adultes plus gros devenaient des mâles fonctionnels, résistants aux contraintes immunitaires et mécaniques du système sanguin des homéothermes (Platt and Brooks 1997). Les **sexes séparés seraient ainsi apparus par compromis évolutif** : le caractère « musculeux » augmentant la valeur sélective des mâles, mais diminuant la valeur sélective des femelles. Les femelles, dont la survie est assurée par les mâles ont pu réallouer leurs ressources à la production des œufs, et accroître ainsi leur fécondité, ce qui aurait permis de fixer l'état de gonochorisme. Par comparaison, les espèces sœurs *Spirorchidae* et les *Sanguicolidae* n'auraient pas effectué cette transition pour deux raisons : ces espèces libèrent leurs œufs dans le sens du flux sanguin et n'auraient donc pas eu à surmonter de contrainte mécanique, et par ailleurs leur faible densité de population favoriserait l'hermaphrodisme (Despres and Maurice 1995).

b. Monogamie : un pseudo-hermaphrodisme ?

D'un point de vue éthologique, cette complémentarité des sexes s'illustre chez certaines espèces de schistosomes par un comportement monogame, qui peut être interprété comme un état intermédiaire entre l'hermaphrodisme et la polygynie, ou polygynandrie. C'est le cas de *Schistosoma mansoni* (Read and Nee 1990; Beltran and Boissier 2008a). Chez les schistosomes, la **monogamie est un état ancestral** et les clades de schistosomes les plus récents étant sont soit polygynandres soit polyandres (Beltran and Boissier 2008a). Une fois accouplés, un mâle et une femelle peuvent rester « associés » durant six à dix ans, leur durée de vie (Fulford et al. 1995). Cet état monogame est très rare dans le règne animal (*i.e.* 1% des espèces) (Tchuenté et al. 1996; Beltran and Boissier 2008a) et est souvent accompagné d'un **investissement paternel prononcé.** C'est le cas chez *S. mansoni*, au stade pré-zygotique, où les mâles protègent non seulement mécaniquement la femelle comme nous

l'avons vu mais également s'assurent de leur nutrition et de leur développement comme nous allons le voir (Read and Nee 1990). Par cet **investissement, le mâle assure son succès reproducteur, intimement lié à celui de la femelle, et donc diminue le double coût du sexe**. Il est intéressant de noter la tendance « urgente » pour les individus, tant mâles que femelles à s'accoupler : *In vitro* et en absence de femelle, des individus mâles recueilleront des fibres de coton dans leur canal gynécophore (Basch 1990). Dans le cas d'infestation unisexuées *in vivo*, ils auront tendance à s'accoupler avec d'autres mâles (Otubanjo 1981). Il a par ailleurs été observé l'accouplement de femelles avec des mâles incomplets (Skelly 2008).

***Image 13.** Couple monogame de* **Schistosoma mansoni.**
© Beltran et al. 2008

La **dispersion des femelles peut être l'une des raisons de cette monogamie** : si trop de femelles pondent au même endroit les œufs s'accumuleraient, créant des granulomes qui empêcheraient leur libération (cul-de-sac) et qui augmenterait la pathogénicité pour l'hôte. Or, de par leur statut de parasite, la survie des schistosomes dépend de la survie de leur hôte.

Par contre les femelles peuvent changer de mâle, elles ne sont **pas génétiquement monogames** et, nous l'avons vu, choisiront toujours un **mâle plus dissimilaire** (Beltran et al. 2008). Ceci est particulièrement possible grâce au ***sex-ratio* biaisé mâle dans l'hôte définitif** (Beltran et al. 2009).

Chez *Schistosomatium douthitti*, le dimorphisme sexuel est beaucoup moins prononcé et les femelles peuvent survivre seules. On peut imaginer que l'investissement pré-zygotique des mâles est diminué car il n'est pas certain qu'ils transmettent leur patrimoine génétique.

c. Apparition du dimorphisme sexuel au cours du cycle vie.

Des phases larvaires phénotypiquement indifférenciées.

Nous le verrons plus en détails dans la partie II.B.3, le sexe des schistosomes repose sur la présence de chromosomes sexuels ZZ/ZW. **Le sexe des individus mâles (ZZ, sexe homogamétique) ou femelles (ZW, sexe hétérogamétique) est ainsi déterminé dans le tractus de la femelle adulte, lors de la fécondation.** On parle de détermination syngamique du sexe (Figure 20). Cependant, durant les **trois stades larvaires** *(miracidia*, sporocystes dans le mollusque d'eau douce, et cercaires) les **individus restent phénotypiquement indifférenciés** (Figure 20). Bien que les individus mâles et femelles soient génétiquement différents (homogamétiques mâles ZZ, ou hétérogamétiques femelles ZW). La **différenciation sexuelle n'a lieu qu'après l'infestation de l'hôte vertébré** entre le stade cercaire et le stade adulte, et, plus précisément après la migration des schistosomules au niveau hépatique (Pour rappel, Figure 16 étape 2) (Lawson and Wilson 1980). Il est intéressant ici d'évoquer le fait que, dans le contexte d'un cycle « tronqué », la migration du schistosomule dans l'hôte définitif vertébré a été comparée à la phase du second hôte intermédiaire perdu (Combes 1991).

On peut supposer que le maintien de ces **phénotypes larvaires indifférenciés** permettrait aux schistosomes **d'allouer leurs ressources énergétiques à la production intense de nouveaux individus**. Ces ressources seront ensuite redistribuées vers des fonctions de différenciation une fois dans l'hôte, quand le parasite sera dans un milieu riche en nutriments (Lawson and Wilson 1980). La relation étroite des schistosomes et le microenvironnement sanguin fait déjà l'objet de nombreuses publications montrant l'exploitation notamment du système endocrine, des facteurs de croissance et

signaux immunitaires (Hernandez et al. 2004; De Mendonça et al. 2000; Escobedo et al. 2005; LoVerde et al. 2007; Oliveira et al. 2009). D'un point de vue énergétique, les schistosomes absorbent des nutriments sélectionnés (glucose, certains acides aminés et de l'eau) à la fois par son tégument et par l'ingestion de sang dans son tube digestif (Skelly et al. 2014). La quantité de sang ingérée est astronomique : environ 100nl pour les mâles et 900nl, pour les femelles (soit quatre fois le volume de ces dernières!!) (Skelly et al. 2014).

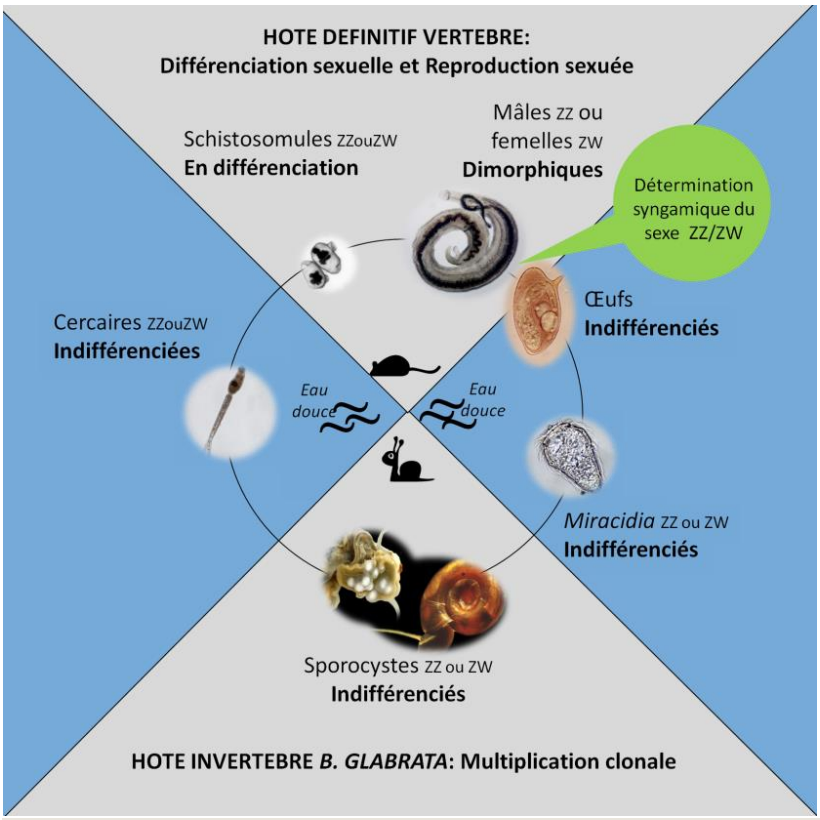


***Figure 20. Détermination syngamique et absence de différenciation phénotypique dans les stades larvaires de* Schistosoma mansoni.**

La maturation femelle.

Alors que les schistosomules mâles vont se développer de façon spontanée en mâles adultes, les **femelles schistosomes nécessitent l'intervention de leur partenaire mâle pour achever leur développement et, notamment leur maturation sexuelle.** Les femelles issues d'infestations unisexuées sont plus petites que les femelles issues d'infestations mixtes (Khalil and Mansour 1995). Lors de l'accouplement, elle subissent en fait une véritable **métamorphose** : leur taille est multipliée par trois et le matériel de leur tube digestif est noir et dense au lieu d'être marron et éparse (Image 14) (Basch and Basch 1984). Elles ont également un système reproducteur sous-développé, caractérisé notamment par des ovaires et

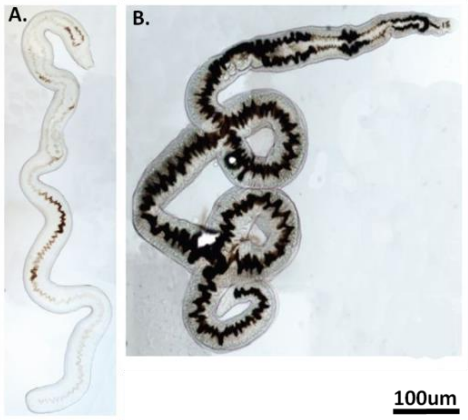


***Image 14. Femelles* Schistosoma mansoni.**
Individus immature (A) et mature accouplée (B).

glandes vitellines immatures (Figure 21) (Erasmus 1973; Neves et al. 2005). La nature du stimulus mâle fait l'objet d'intenses recherches, il a notamment été montré une régulation différentielle de gènes en lien avec l'accouplement, chez les femelles comme chez les mâles (cela fait l'objet d'une partie du paragraphe C.2.b). L'hypothèse d'une stimulation par le sperme a été très tôt écartée (Popiel 1986), et une implication de la **voie transtégumentaire** (*i.e.* par contact) est supposée: un accouplement partiel avec un mâle incomplet induit un développement femelle sur la portion en contact (Skelly 2008). La **maturation de la femelle est réversible** et on peut observer une régression des glandes vitellines et des ovaires en trois à six jours (Clough 1981).

Morphologie des adultes expérimentés vs *inexpérimentés.*

Un adulte, mâle ou femelle, qualifié d'« inexpérimenté » est **un adulte n'ayant jamais été accouplé**, issu généralement d'une infestation unisexuée. **Chez les femelles on parle d'individus immatures**, car elles n'ont pas achevé la formation de leurs organes reproducteurs (Figure 21). Par contraste, un adulte « expérimenté » est issu obligatoirement d'une infestation mixte et correspond à un individu ayant déjà été accouplé, chez les femelles on parle alors d'**individus matures**. Une analyse morphologique des organes reproducteurs mâles et femelles issus d'infestations unisexuées ou mixtes permettent de constater de dramatiques changements anatomiques (et, par conséquent, fonctionnels) entre ces individus expérimentés et inexpérimentés. Les femelles matures possèdent **un seul ovaire, multilobé (3 ou 4 lobes)** dont le **degré de différenciation** augmente de la position antérieure vers la position postérieure. L'oviducte relie cet ovaire à un réceptacle séminal recevant le sperme du mâle. Les glandes vitellines sont développées (Fig.21.1.A) et reliées à l'ootype par de courts canaux vitellins. C'est au niveau de cet ootype que se formeront les œufs et où débutera le développement embryonnaire. Ces œufs seront libérés au niveau du pore génital localisé juste derrière la ventouse ventrale (Fig.21.1.F). Par contraste, **les femelles immatures présentent un seul stade immature de cellules ovariennes** (Fig.21.2.A), **les glandes vitellines sont indifférenciées** et contiennent peu de vitellocytes (Fig.21.2.C). Les mâles expérimentés présentent **un seul testicule, multilobé,** et une forte densité de cellules germinales (Fig.22.B) alors que **les mâles inexpérimentés présentent des espaces libres entre les lobes testiculaires** (Fig.22.A). Nous évoquions précédemment la tendance des mâles à s'accoupler entre eux en l'absence de femelles. On peut constater qu'un mâle provenant du canal gynécophore d'un second mâle présente une « féminisation » de ces caractères morphologiques (Fig.22.D): ils sont plus petits et présentent des lobes testiculaires atrophiés, ainsi que la ventouse ventrale. Le mâle « porteur » lui, présente des caractéristiques normales (Fig.22.C). Par ailleurs, malgré la présence d'un cirrhe (Fig.22.E), les mâles ne déposent pas leur sperme directement dans le tractus génital de la femelle, mais le libèrent dans leur canal gynécophore.

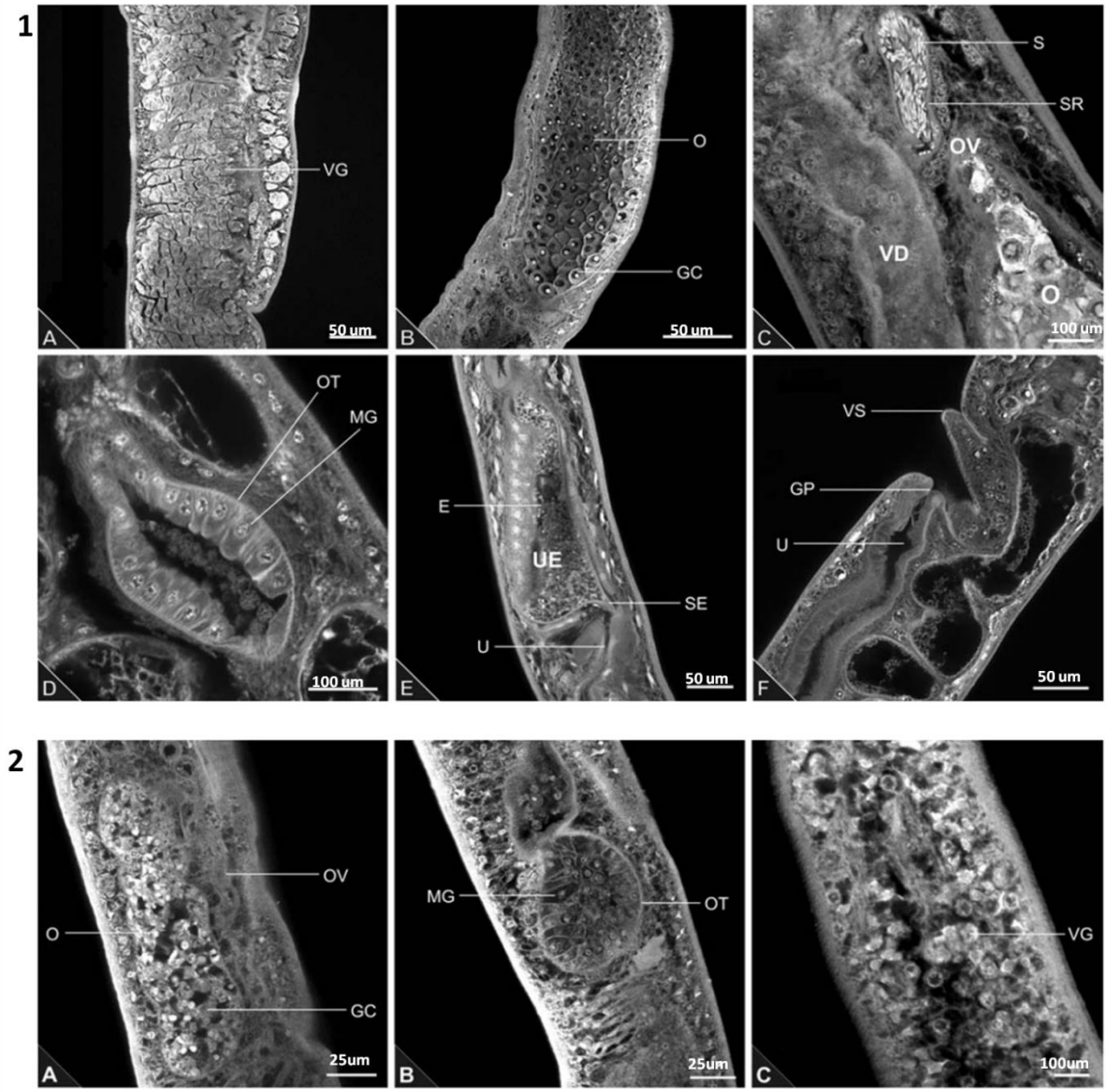


Figure 21. Observation des organes reproducteurs femelles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin.

1. Femelles matures : *glandes vitellines développées en grappes avec un noyau central de taille variable (1A), ovaires constitués de cellules germinales hexagonales et présentant différents stades de maturation (1B), oviducte quittant l'extrémité de l'ovaire pour se jeter dans le réceptacle séminal, ou spermathèque, stockant du sperme (1C), ootype composé de cellules cylindriques ou glandes de Mehlis (1D), développement de l'embryon et formation de la coquille (1E), l'utérus se termine par un pore génital (1F).* ***2. Femelles immatures*** *: un seul stade immature de cellules ovariennes (2A), ootype rempli de sécrétions glandulaires (2B), glandes vitellines indifférenciées contenant peu de vitellocytes (2C).*

<u>Abbréviations:</u> VG=Glandes vitellines, O=Ovaire, GC= Cellules germinales, OV=Oviducte, SR= Réceptacle séminal, S=Spermatozoïdes (provenant du mâle !) VD= Canal Vitellin, OT=Ootype, MG= Glandes de Mehlis, U=Utérus, UE= Œufs utérins, E=Embryon (zygote), SE= œuf à éperon bar GP=Pore génital, VS=Ventouse ventrale. © Neves et al. 2005

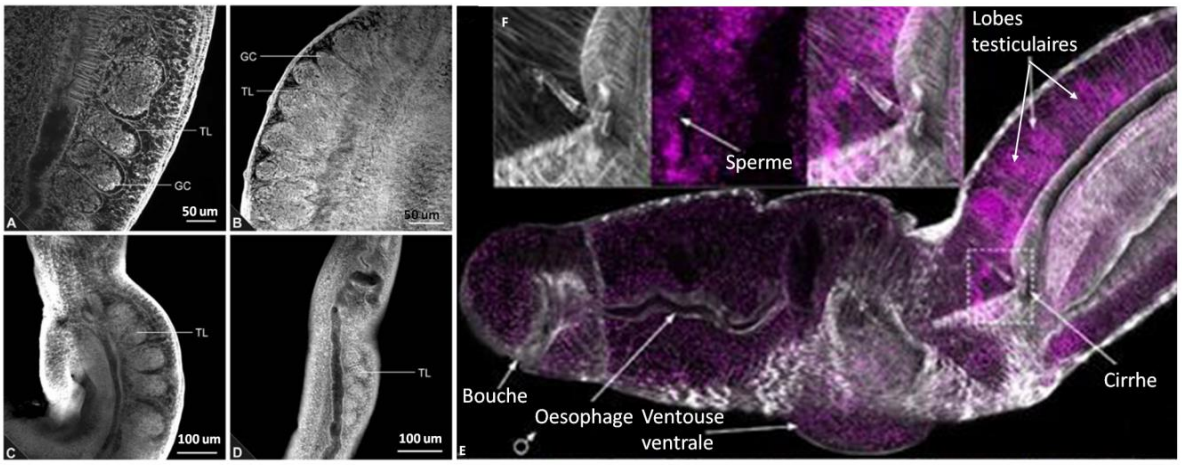


Figure 22. Observation des organes reproducteurs mâles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin (A, B, C et D), ou DAPI et Phalloïdine (E). A. Mâles inexpérimentés *: présentent des espaces libres entre les lobes,* ***B. Mâles expérimentés*** *: un seul testicule multilobé, les cellules germinales remplissent les espaces. L'individu D a été extrait du canal gynécophore de l'individu C : on peut remarquer une féminisation de l'individu D : plus petite taille et lobes testiculaires atrophiés. Abbréviations : TL= Lobes testiculaires, GC= Cellules germinales. © Neves et al. 2005*

E. Marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, noyaux cellulaires) en rose et à la phalloïdine (actine). Le ***cirrhe*** *est l'organe copulateur extensible, au repos invaginé dans une poche, il se situe juste derrière la ventouse ventrale. La libération de sperme se fait hors de la femelle partenaire (encadré). © Collins et al. 2011*

Développement des appareils reproducteurs lors d'infestations mixtes.

Lors d'infestations mixtes, **les premiers changements morphologiques significatifs apparaissent trois à quatre semaines après l'infestation** (Biolchini et al. 2006) ce qui correspond en fait au **début de la phase hépatique** de développement (Lawson and Wilson 1980). Trois semaines après l'infestation, ou « post-infection » (PI), il a été montré que 59% des vers mâles possèdent déjà un canal gynécophore alors que les lobes testiculaires et les tubercules sont absents (Fig.24.A). La différenciation somatique précède donc la différenciation gonadique (Pour rappel, I.B.2.a). A ce même stade, 33% des femelles présentent un ovaire indifférencié (Fig.23.A). Quatre semaines PI, 77,2 % des mâles possèdent des lobes testiculaires contenant peu de cellules germinales (Fig.24.C) et 26% ont développé des tubercules (Fig.24.B). Après cinq semaines, les individus mâles présentent des lobes testiculaires matures (Fig.24.D). Au même moment 69% des femelles présentent toujours un ovaire immature. Ce n'est qu'après six semaines PI que tous les individus possèdent des appareils reproducteurs matures (Biolchini et al. 2006), qui comme nous l'avons vu chez les femelles est caractérisé par des glandes vitellines développées (Fig.23.D). Soixante-treize pourcents d'entre elles présentent également un œuf unique au niveau utérin (Fig.23.B), preuve d'un accouplement. Cette cinétique développementale souligne donc un **asynchronisme de la différenciation sexuelle à la fois au sein d'un même sexe, et entre les sexes.** La mise en place des organes reproducteurs mâles et femelles lors d'infestations unisexuées n'a pour l'instant pas été décrite.

Dans la première partie de notre étude nous confirmerons cette asynchronie développementale lors d'infestations unisexuées et proposerons une classification morphologique des individus, afin de poursuivre des études moléculaires corrélées avec la mise en place du dimorphisme sexuel. *(Picard et al. en préparation)*

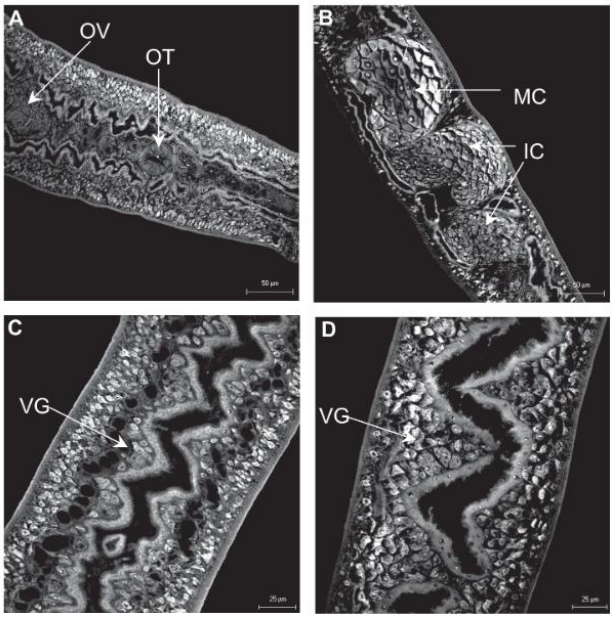


Figure 23. Développement des organes reproducteurs femelles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin*. A : trois semaines PI, présence d'un ovaire immature et de l'ootype ; B et D : cinq semaines PI, apparition du gradient de maturation ovarien et maturation des glandes vitellines ; C : quatre semaines PI, glandes vitellines immatures. Abbréviations : OV= ovaire immature OT= Ootype, MC= Cellules ovariennes matures, IC= Cellules ovariennes immatures, VG= Glandes vitellines. ©Biolchini et al. 2006*

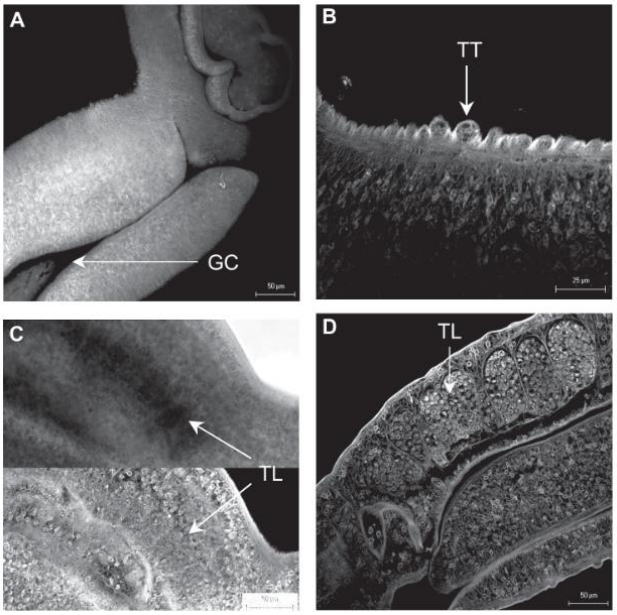


Figure 24. Développement des organes reproducteurs mâles en microscopie confocale et coloration au rouge carmin*. A : trois semaines PI (= post-infection), présence d'un canal gynécophore ; B et C : quatre semaines PI, apparition des tubercules tégumentaires et des lobes testiculaires primitifs ; D : cinq semaines PI, lobes testiculaires matures. Abbréviations : GC= Canal Gynécophore, TT= Tubercules tégumentaires, TL= Lobes testiculaires. ©Biolchini et al. 2006*

5. Traits d'histoire de vie mâles et femelles au cours du cycle.

a. Les stades « pré-vertébrés ».

Nous venons de le voir, le dimorphisme sexuel apparaît non seulement lors de la quatrième et dernière phase du cycle de vie des schistosomes, chez le vertébré ; mais également tardivement chez cet hôte lors de l'arrivée des schistosomules au niveau hépatique, soit trois à quatre semaines après l'infestation. L'absence de différenciation phénotypique entre mâles et femelles au cours du cycle ne veut cependant pas dire qu'il n'y a pas de différence de traits de vie. En effet, il a été mis en évidence des différences de « performances » et de pathogénicité entre les sexes accompagnant non seulement les phases différenciées mais aussi indifférenciées du cycle de vie (Boissier et al. 1999). Par définition, les traits de vie sont un ensemble de caractéristiques comportementales, physiologiques et anatomiques ayant co-évolués sous la pression de la sélection naturelle et en réponse à un problème écologique particulier (Stearns 1992). Dans le cas des schistosomes, et dans le contexte des interactions hôte-parasite, on peut considérer que ce sont précisément ces interactions qui constituent la principale pression de sélection sur l'évolution des parasites. Pendant les stades « aquatiques » différents traits de vie peuvent être considérés : (i) Le nombre de *miracidia*, leur durée de vie et leur infectivité ; (ii) La production cercarienne, la durée de vie des larves et leur capacité de pénétration. Les observations suivantes ont été faites : (i) aucun trait de vie ne diffère chez les *miracidia* mâles et femelles ; (ii) la production cercarienne de femelles est plus intense que la production mâle (Boissier et al. 1999), mais leur durée de vie et leur capacité de pénétration sont identiques (*i.e.* différence entre le nombre de cercaires proposées à l'infestation et le nombre de

cercaires entières qui restent). Ainsi, les différences de traits de vie (expérimentaux) au stade pré-vertébré se résument à une production cercarienne femelle plus intense.

b. Le stade vertébré : pathogénicité, immunogénicité et *sex-ratio* biaisé mâle.

Malgré une capacité de pénétration identique, les mâles et les femelles ne présentent pas le même « succès » ou « infectivité » (*i.e.* nombre d'adultes collectés/nombre de cercaires proposées à l'infestation expérimentale) : les mâles sont plus performants. Cette infectivité correspond en fait à l'addition des capacités de pénétration et de développement. Ainsi, le ***sex-ratio* tertiaire (*i.e.* à maturité) biaisé mâle** (observé à la fois sur le terrain et en conditions expérimentales) serait imputable à de **meilleures capacités de développement chez le mâle** (Boissier et al. 1999; Beltran and Boissier 2010b). Dans le contexte de l'interaction hôte-pathogène, cette meilleure capacité de développement mâle s'accompagne à la fois (i) d'une **plus grande pathogénicité**, la maladie résultant de l'inflammation vis-à-vis à la fois des antigènes des œufs et des vers adultes (Baki and Grimaud 1985) ; ainsi que (ii) **d'une plus grande immunogénicité** de ce sexe (Mota-Santos et al. 1977; Nash et al. 1978; Ambroise-Thomas and Andrews 1976). Cela s'illustre notamment par une meilleure efficacité des mâles lors d'études de primo-infestation (Pour revue: Boissier et al. 1999).

Ses traits de vie (et notamment le biais mâle de *sex-ratio*) et les autres aspects de la biologie reproductive de *S. mansoni* comme leur système d'appariement (monogamie avec infidélité femelle et investissement paternel) et leur stratégie gonochorique de reproduction accompagnée du dimorphisme sexuel peuvent être corrélés sous la forme d'un modèle proposé par Beltran *et al.* en 2009 (Figure 25).

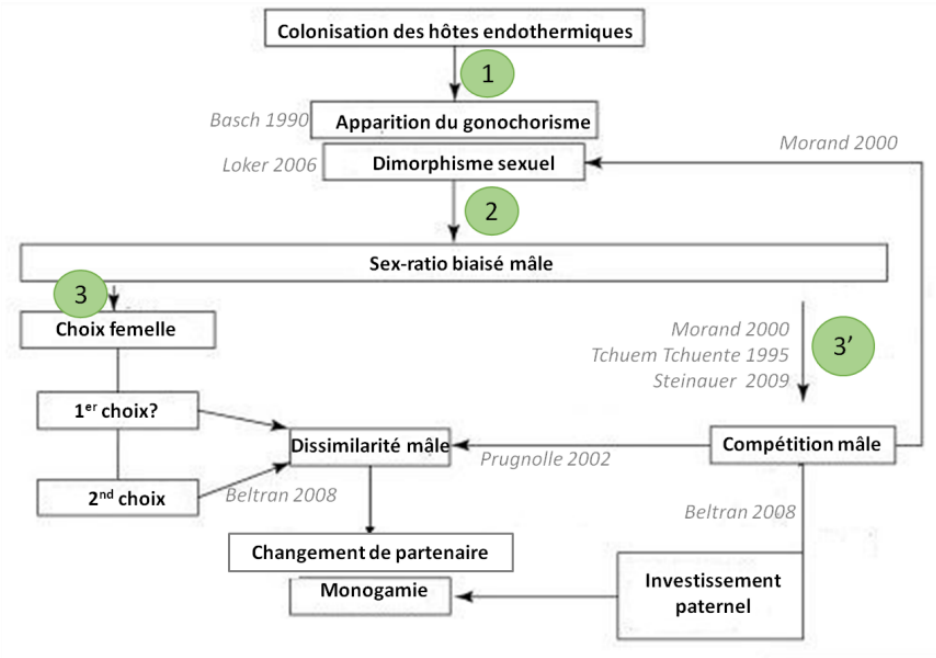


***Figure 23. Modèle corrélant différents aspects de la biologie reproductive chez* S. mansoni.**
1 : L'invasion des hôtes endodermiques a conduit simultanément à l'apparition des sexes séparés et du dimorphisme sexuel. 2 : Ce dimorphisme entraîne un biais mâle de sex-ratio *car les femelles ne résistent pas au flux sanguin et présenteraient donc une mortalité plus élevée. 3 : Ce biais de* sex-ratio *mâle a pour conséquence le choix du partenaire par la femelle : le second choix (divorce, ou infidélité) est guidé par la dissimilarité du nouveau mâle par rapport au premier mâle, et il est supposé que le premier soit en partie guidé par la dissimilarité mâle/femelle. 3' : La compétition entre les mâles entraîne de la dissimilarité entre ces derniers ainsi qu'une augmentation de l'investissement paternel conduisant à la monogamie. Cette compétition peut avoir un effet en retour sur le dimorphisme sexuel si les femelles préfèrent les gros mâles. © Beltran et al. 2009*

Partie IIB - LES SCHISTOSOMES, DES PLATHELMINTHES GONOCHORIQUES ATYPIQUES : CONCLUSIONS.

Parmi les trématodes, les *Schistosomatidae* présentent plusieurs curiosités : (1) ils sont gonochoriques, (2) ils présentent un cycle tronqué à un seul hôte intermédiaire et (3) ils vivent dans le système sanguin des vertébrés homéothermes. En fait, toutes ces curiosités sont liées : les schistosomes auraient acquis le gonochorisme en s'adaptant aux contraintes mécaniques et immunitaires de leur hôte définitif à sang chaud. Cette transition aurait eu lieu chez des hôtes à endothermie occasionnelle, *via* un état intermédiaire androdioïque. Les individus mâles et les femelles seraient apparus ensuite par un compromis évolutif permettant le « partage des tâches » : Les individus mâles musculeux permettent la survie des couples en résistant au flux sanguin et en participant au développement des femelles ; les femelles sont hyperfécondes et peuvent s'insinuer dans les capillaires mésentériques pour optimiser le dépôt des œufs. Chez *S. mansoni* où les sexes sont très dimorphiques, cette association est illustrée par leur système d'appariement monogame parfois comparé à un pseudo-hermaphrodisme. Par ailleurs, le gonochorisme permet un renouvellement incessant de la diversité génétique, véritable atout dans la course aux armements (*i.e.* théorie de la reine rouge).

Si l'hôte vertébré a joué un rôle déterminant dans l'évolution de la biologie reproductive de ces espèces, il occupe également une place centrale dans l'apparition du dimorphisme sexuel à l'échelle du cycle de vie du parasite : les stades pré-vertébrés sont indifférenciés et la différenciation sexuelle n'a lieu que dans l'hôte définitif, pendant la phase hépatique de la migration des schistosomules. La phase pulmonaire qui la précède est parfois comparée au stade pré-développemental ayant lieu dans le second hôte intermédiaire des cycles hétéroxènes classiques. La phase vertébrée de développement semble être plus favorable aux mâles qui se développent spontanément et survivent mieux (*sex-ratio* tertiaire biaisé mâle), alors que les femelles restent immatures avant l'accouplement et ne survivent pas durablement si elles ne rencontrent pas de partenaire. Celles-ci subiront une véritable métamorphose lors de l'accouplement les rendant reproductivement fonctionnelles. Les mécanismes moléculaires sous-jacents de ce développement restent en grande partie non-élucidés, et font l'objet d'intenses recherches, dont la nôtre.

C. Tour d'horizon du sexe moléculaire connu chez *Schistosoma mansoni.*

1. Déterminisme chromosomique du sexe.

a. Evolution des chromosomes sexuels chez les schistosomes.

A l'échelle caryotypique globale, la plupart des trématodes primitifs (Strigeoïdes) présentent 10 ou 11 paires de chromosomes. Les schistosomes présentent eux **huit paires de chromosomes (dont une paire de chromosomes sexuels ZZ/ZW)**, ayant vraisemblablement évolué par des évènements de fusions plus que de délétions (Grossman et al. 1980; Grossman et al. 1981). Nous l'avons vu, les trématodes sont généralement hermaphrodites et ne possèdent donc pas de chromosomes sexuels. Curieusement, il a été observé une paire de chromosomes hétéromorphiques (*i.e.* présentant des caractères structuraux différents) chez l'espèce hermaphrodite *Megalodiscus temperatus* (*i.e.* un trématode parasite de grenouille). Cela a également été relevé chez certains *Spirorchidae*, qui sont les espèces « sœurs » des schistosomes, et qui possèdent neuf paires chromosomiques au total (Grossman et al. 1981). Pour Basch 1990, la différenciation des chromosomes sexuels n'aurait pas précédé l'apparition du dimorphisme sexuel mais l'aurait accompagné, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un état transitoire androdioïque (Platt and Brooks 1997) et d'une divergence génétique forcée par la nécessité du dimorphisme sexuel. Néanmoins aujourd'hui il est admis que le déterminisme sexuel des schistosomes est basé sur l'existence de chromosomes sexuels ZZ/ZW (ou gonosomes), portés respectivement par les mâles et les femelles (*i.e.* **système hétérogamétique femelle**). Le sexe des individus est donc génétiquement déterminé dès la fécondation (*i.e.* **déterminisme syngamique du sexe**).

Les **gonosomes des *Schistosomatidae* résulteraient dans un premier temps de la fusion de deux autosomes d'un ancêtre commun trématode** (Figure 26). En effet, une étude récente souligne les homologies des chromosomes trois et cinq du cestode *Echinococcus multilocularis* et du chromosome Z de *S. mansoni* (Tsai et al. 2013). La différenciation des chromosomes sexuels chez les différentes espèces de schistosomes aurait ensuite eu lieu selon différents mécanismes, dont : une **hétérochromatisation constitutive** du W chez les schistosomes d'Afrique (dont *S. mansoni*), une **délétion** d'une partie W chez les schistosomes d'Asie et une **translocation** du W vers le Z, suivie d'une hétérochromatisation chez les schistosomes d'Amérique (Figure 27). Les différents évènements de **suppression de recombinaison**, autorisant la **spécialisation** de ces chromosomes, tels que les mécanismes d'inversion péricentrique (1), de translocation (2) et d'hétérochromatisation différentielle (3), sont recensés sur la Figure 27. Finalement, les espèces de schistosomes présentent différents degrés de différenciation et d'hétérochromatisation des chromosomes sexuels, qui ont longtemps été un moyen caryotypique de détermination des espèces.

Chez *Schistosoma mansoni*, le modèle de notre étude, il a été récemment déterminé l'existence **d'au moins quatre évènements d'inversion** (Hirai *et al.* 2012) (Non indiqués sur la figure) : trois avant l'hétérochromatisation du W, et un après. Structurellement, les gonosomes de *S. mansoni* sont homomorphiques (*i.e.* de même taille), caractérisés par une large portion d'hétérochromatine sur le W et un index centromérique du Z inférieur à celui du W (Grossman et al. 1981) (Figure 27). De par leur homomorphie, les gonosomes de *S. mansoni* peuvent être qualifiés d'« **ancestraux**» (Pour rappel, I.B.2.c).

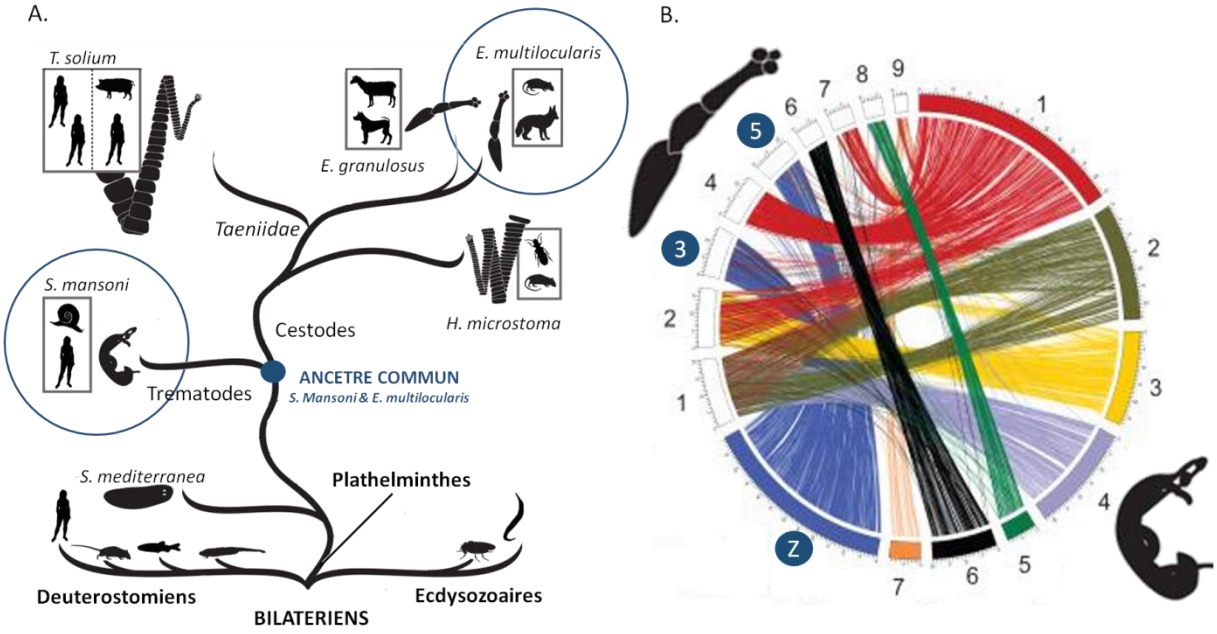


Figure 24. Position de l'ancêtre commun des* Schistosomatidae *et d'*Echinococcus *(A) et homologies chromosomiques entre les deux trématodes (B) *: Les chromosomes 3 et 5 d'*E. multilocularis *sont homologues du Z de* S. mansoni.
© Adapté de Tsai et al. 2013

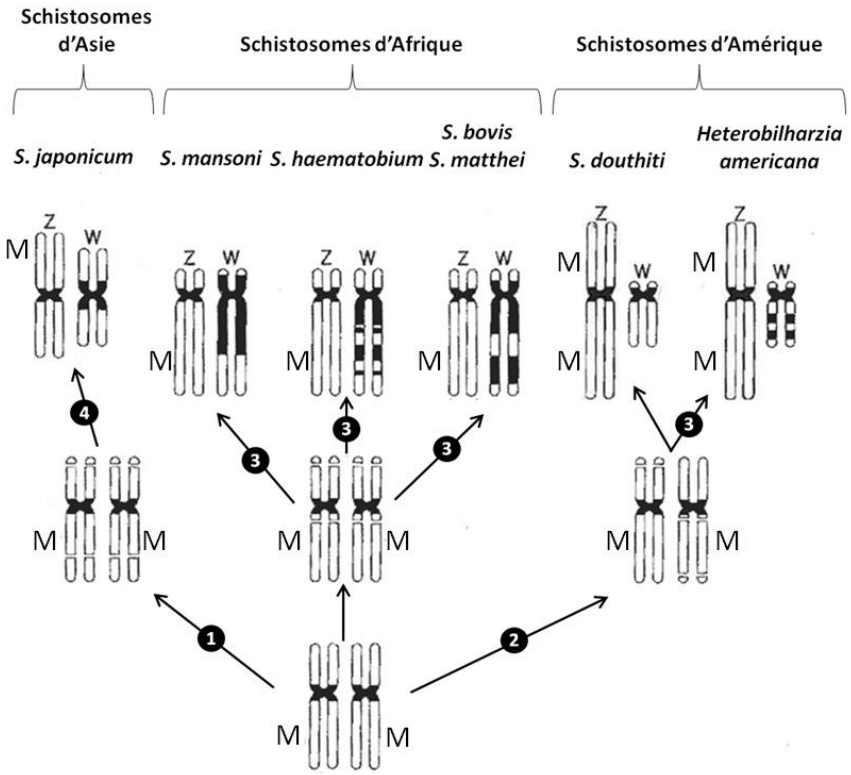


Figure 25. ***Scenario évolutif des chromosomes sexuels chez les schistosomes.*** *L'ancêtre commun proto-schistosome possédait une paire d'autosomes avec un déterminant mâle M. Plusieurs évènements auraient suivi : 1 : inversion péricentrique, 2 : translocation, 3 : hétérochromatisation différentielle, 4 : délétion*
© Grossman et al. 1981

b. Caractérisation des chromosomes sexuels chez *Schistosoma mansoni*.

Plusieurs travaux de séquençage et d'assemblage globaux du génome (Berriman et al. 2009; Criscione et al. 2009; Protasio et al. 2012) et des études ciblées du contenu des chromosomes sexuels (Portela et al. 2010; Julie MJ Lepesant et al. 2012) ont permis de décrire la version actuelle du génome de *Schistosoma mansoni* (v5.2) : **364,5 Mb assemblé à 81% et contenant 10852 gènes**. Huit groupes de liaison peuvent être distingués, correspondant aux sept paires d'autosomes et à la paire de chromosomes sexuels. Ces gonosomes sont de taille équivalente : **60.7 Mb pour le Z et 65 Mb pour le W.** Soixante-dix pourcents correspondent à la partie pseudoautosomale (*i.e.* présente à la fois sur le Z et sur le W) et 30% correspondent à une **région Z-spécifique discontinue contenant 782 gènes** (Figure 28). Seuls 1,1Mb correspondent à des **régions W-spécifiques, à 90% des séquences répétées. Aucun gène W-spécifique n'a pu être identifié pour le moment.** Ainsi, comme les chromosomes sexuels classiques (Pour rappel, I.B.2.c) : les gonosomes de *S. mansoni* ne recombinent pas en totalité, possèdent une faible densité de gènes et ont accumulé de nombreuses séquences non-codantes.

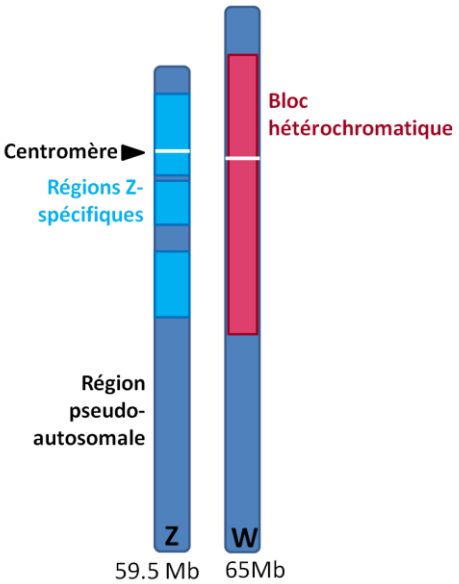


***Figure 26. Composition structurale des gonosomes de* S. mansoni.**

2. Les acteurs génétiques et épigénétiques connus du sexe chez *Schistosoma mansoni*.

a. Analyses transcriptomiques.

Dialogue au sein du couple.

Nous avons vu précédemment les conséquences morphologiques de l'accouplement sur les vers adultes, à la fois chez les mâles et les femelles. Plusieurs études ont confirmé que ces changements morphologiques étaient accompagnés de remaniements moléculaires (Siegel and Tracy 1988; Fitzpatrick and Hoffmann 2006; LoVerde et al. 2009; Leutner et al. 2013; Haseeb et al. 1989) ; ainsi que de transferts de molécules de natures diverses entre les partenaires comme les protéines (Atkinson and Atkinson 1980), les glycoprotéines (Gupta and Basch 1987), le cholestérol (Popiel 1986) ou le glucose (Cornford et al. 1988).

Dialogue avec l'hôte vertébré.

Chez tous les métazoaires, la réponse des cellules aux signaux moléculaires de leur environnement est un facteur important de leur croissance ou de leur différenciation. Dans le cadre d'une interaction hôte-parasite, ces signaux peuvent provenir directement de l'habitat de l'individu : le micro-environnement sanguin de l'hôte vertébré en ce qui concerne *S. mansoni.* Plusieurs approches expérimentales illustrent cette interaction : Par exemple, il a été montré que le sexe de l'hôte implique l'expression d'un répertoire de gènes différents chez le parasite (Waisberg et al. 2008), ou qu'une trop grande concentration de testostérone a un effet toxique (Nakazawa et al. 1997). *In vitro*, l'ajout d'érythrocytes au milieu de culture permet d'optimiser le développement des stades juvéniles schistosomules (Gobert et al. 2010).

Récepteurs aux facteurs de croissances ou aux hormones peptidiques.

De nombreuses analyses transcriptomiques soulignent la **réceptivité de *Schistosoma mansoni* aux facteurs endocrines et de croissance de son hôte vertébré** (Hernandez et al. 2004; De Mendonça et al. 2000; Escobedo et al. 2005; LoVerde et al. 2007; Oliveira et al. 2009; Eloi-Santos et al. 1992). Ces récepteurs appartiennent à un grand répertoire de voies de signalisation, comme celles des epidermal growth factors (Vicogne et al. 2004; Nawaratna et al. 2011), de l'insuline (Khayath et al. 2007; Ahier et al. 2009), des intégrines (Beckmann et al. 2012) ou des fibroblast growth factors (Hahnel et al. 2014). Une des voies les plus étudiées est celle des récepteurs au transforming growth factor beta **TGF-β** (Knobloch et al. 2007; LoVerde et al. 2007; Buro et al. 2013; Freitas et al. 2007). Par une expérience *ex vivo* (*i.e.* adultes perfusés puis mis en culture) il a même été validé que le TGF-β humain affectait directement l'expression des gènes des vers adultes (Oliveira et al. 2012). Par ailleurs, la follistatine, qui est un régulateur de cette voie de signalisation des TGF-β, a été décrite comme surexprimée chez les mâles après l'accouplement (Leutner et al. 2013). Ceci illustre **l'articulation de différents facteurs moléculaires régulés à la fois par les interactions hôte-parasites et par les échanges mâles-femelles.**

Le rôle central du « kinome ».

Parmi les voies de signalisation impliquées dans la fonction de reproduction, les **kinases** ont fait l'objet d'une attention particulière (Vanderstraete et al. 2014; Andrade et al. 2014; Long et al. 2010; Beckmann et al. 2010; Dissous et al. 2011; Long et al. 2012). Il a notamment été décrit le rôle des deux Polo-like kinases SmPlk1 et SmSak dans la gamétogenèse. SmPlk1 a été montrée comme surexprimée au niveau gonadique, et une expérience de validation fonctionnelle a souligné son rôle pivot dans la fonction reproductive, à la fois au niveau ovarien et testiculaire (Long et al. 2010; Long et al. 2012).

Par ailleurs, les **récepteurs tyrosine-kinase RTKs** semblent occuper un rôle central dans le développement des organes reproducteurs et leur fonction (Pour revue, Morel et al. 2014). Récemment, deux récepteurs Venus kinase ont été définis comme étant des acteurs de la reproduction du parasite (Vanderstraete et al. 2014; Dissous 2015). Ces récepteurs appartiennent à une **nouvelle famille de RTKs,** découverte pour la première fois chez les schistosomes (Vicogne et al. 2003; Vanderstraete et al. 2014a; Dissous et al. 2014). Ces RTKs peuvent avoir une action synergique avec d'autres récepteurs conservés comme les récepteurs aux fibroblast growth factor FGFRs et peuvent donc être à **l'interface des voies de signalisation de l'hôte et du parasite** (Hahnel et al. 2014; Morel et al. 2014) ce qui en fait des cibles thérapeutiques privilégiées (Dissous 2015). Cela

montre bien une fois de plus le lien étroit entre la fonction reproductive de *S. mansoni* et sa réceptivité au microenvironnement de l'hôte.

Les récepteurs nucléaires.

Outre les récepteurs membranaires que nous venons de décrire, plusieurs études décrivent la présence de récepteurs nucléaires chez *S. mansoni* (De Mendonça et al. 2000; De Mendonça et al. 2002; Wu et al. 2006). La **grande conservation de ces récepteurs dans le règne animal** (Escriva, Bertrand, and Laudet 2004) et leur implication connue dans différentes fonctions comme la régulation homéostatique, la différenciation, la **métamorphose ou la reproduction** (Laudet and Gronemeyer 2001) en font des candidats de choix pour les interactions hôtes-pathogènes et peuvent laisser présager de l'utilisation de facteurs hormonaux de l'hôte par *S. mansoni*.

Tour d'horizon des approches globales.

Les bases moléculaires de la biologie reproductive des schistosomes fait ainsi l'objet de nombreux travaux. De façon générale, ces études soulignent l'importance des interactions hôtes/parasites ou de l'accouplement, et font ressortir l'implication de voies majeures de la signalisation cellulaire. Cependant, aucun candidat au déterminisme sexuel (tel que le *Sry* des mammifères ou le *dmrt1* des oiseaux) n'a pour l'heure été décrit. De plus, parmi les approches de transcriptomiques globales, aucune ne combine à la fois l'aspect développemental et la comparaison mâle/femelle notamment en ce qui concerne les stades juvéniles *in vivo* (Tableau 7).

Tableau 7. Principales études de transcriptomique globale sur différents stades développementaux et/ou par comparaison entre les sexes. *Abbréviations : IM=Infestation Mixte, IU=Infestation Unisexuée.*

Références	Stades Larvaires			Schistosomules *in vitro*		Phases vertébrées		Sexe des échantillons	Méthodes	Particularités
Hoffmann *et al.* 2002							Adultes	Mâles/Femelles (IM)	Microarrays	
Fitzpatrick *et al.* 2005							Adultes	Mâles/Femelles (IM)	Microarrays	
Fitzpatrick *et al.* 2006							Adultes	Mâles/Femelles (IU & IM)	Microarrays	Accouplement
Waisberg *et al.* 2007							Adultes	Mâles/Femelles (IU & IM)	Microarrays	Accouplement
Williams *et al.* 2007	*Miracidia*	Sporocystes (*in vitro*)	Cercaires			Juveniles	Adultes	Mixte aux stades larvaires Mâles/Femelles adultes (IU & IM)	SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	
Waisberg *et al.* 2008							Adultes	Mâles/Femelles (IU)	Microarrays	Sexe de l'hôte
Fitzpatrick *et al.* 2008			Cercaires					Mâles/Femelles (IM)	Microarrays	
Gobert *et al.* 2010				3 jours	5 jours			Mixte	Microarrays	Avec ou sans érythrocytes
Parker-Manuel *et al.* 2011		Sporocystes (*in vitro*)	Cercaires	3 jours				Mixte	High-density oligonucleotide array	
Nawaratna *et al.* 2011								Mâles/Femelles (IM) Organes reproducteurs	Microarrays	Laser microdissection microscopy (LMM)
Protasio *et al.* 2012			Cercaires	3 heures	24 heures		Adultes	Mixte	RNA-seq	

b. Les facteurs « épigénétiques ».

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction, il existe plusieurs supports de l'information épigénétique : la localisation nucléaire de la chromatine, la méthylation de l'ADN, la modification des histones (protéines structurales de la chromatine) et les ARNs non-codants (Pour rappel, I.B.2.d). *S. mansoni* ne présenterait **pas de mécanisme de méthylation de leur ADN**, ainsi les études actuelles des mécanismes épigénétiques chez cette espèce se concentrent à la fois sur les ARNs non-codants, et la modification des histones. Notre laboratoire est pionnier dans l'approche d' immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Cosseau et al. 2009) chez *S. mansoni* et a mis en place les outils bioinformatiques permettant la construction du premier épigénome (basé sur la modification des histones) du parasite (Lepesant et al. 2011). Dans un très récent travail réalisé dans le cadre d'une autre thèse de notre laboratoire nous avons montré une **régulation dynamique de cet épigénome au cours du développement**, et notamment de **dramatiques changements**

chromatiniens, corrélés à une régulation transcriptomique à l'entrée dans l'hôte vertébré (Roquis et al. 2015).

Par ailleurs, de précédentes études de notre équipe ont évalué que 47% du génome de *Schistosoma mansoni* serait constitué de séquences répétées (Lepesant et al. 2012) et que **36 familles de séquences satellites constitueraient la quasi-totalité de la région W-spécifique** (Lepesant et al. 2012). Il a été réalisé un suivi transcriptomique de ces séquences répétées spécifiques de l'hétérochromosome W (et donc femelle-spécifiques) : cette étude a montré que certaines d'entre elles sont **transcrites au stade larvaire et que leur transcription s'éteint progressivement entre le stade miracidia et le stade adulte**. Cette diminution de transcription est **associée à un changement de structure de la chromatine, qui devient de plus en plus hétérochromatique** (Lepesant et al. 2012)**.** Ainsi, il est supposé que ces séquences répétées (transcrites sous forme de longs ARNs non-codants) pourraient réguler leur propre changement de structure, et/ou induire des changements chromatiniens sur d'autres régions chromosomiques diminuant par exemple **l'expression de gènes portés par les chromosomes sexuels**. En ce sens, elles pourraient participer au mécanisme de déterminisme et/ou de différenciation sexuel(le).

Concernant la régulation par les ARNs non-codants, deux études montrent une **expression différentielle de micro-ARNs (miRNAs) à la fois dépendante du sexe et du stade de développement chez *S. mansoni***. Ceci suggère une implication des miRNAs dans les processus de différenciation sexuelle des schistosomes (Simões et al. 2011; Marco et al. 2013a). Chez une autre espèce de schistosome, *S. japonicum*, une étude suggère même un rôle de ces **miRNAs dans la maturation sexuelle** des femelles après l'accouplement (Sun et al. 2014).

Enfin, comme chez tous les organismes hétérogamétiques femelles étudiés jusqu'à présent, *S. mansoni* présente un **mécanisme incomplet de compensation de dose génique** (Vicoso and Bachtrog 2011).

PARTIE IIC - TOUR D'HORIZON DU SEXE MOLECULAIRE CONNU CHEZ *S. MANSONI*.

Schistosoma mansoni, comme les autres espèces de *Schistosomatidae*, possède huit paires de chromosomes dont les gonosomes sexuels ZZ/ZW (*i.e.* hétérogamétie femelle). Ces chromosomes sexuels sont homomorphes et partagent 70% de leur séquence (*i.e.* régions pseudoautosomales). Il existe 782 gènes Z-spécifiques et aucun gène W-spécifique. Cet hétérochromosome W présente un large bloc hétérochromatique constitué presque en totalité de séquences répétées dont la structure, et la transcription sous forme de longs ARNs non-codants, changent entre les stades larvaires et adultes. Par ailleurs, il n'existe pas de dosage compensation complet chez cette espèce. Les facteurs de régulation de type épigénétique (modifications d'histones et ARNs non-codants) semblent déjà être d'importants acteurs du développement chez *S. mansoni*. Ils pourraient notamment être à l'interface des mécanismes de développement intrinsèque du parasite et des facteurs de l'hôte. En effet, de nombreuses études soulignent l'importance des interactions hôte-pathogène dans le développement et la fonction reproductrice de *S. mansoni*, et plusieurs voies majeures de signalisation telle que celle du TGF-β ou des RTKs semblent occuper un rôle pivot dans la reproduction. Néanmoins à ce jour, aucun facteur déterminant du sexe n'a encore été proposé, et aucune étude ne s'est encore intéressée aux développements comparés des mâles et des femelles. Il semble notamment important d'étudier ce développement *in vivo* dans le contexte très particulier des interactions hôtes-pathogènes.

Partie3: Le projet

A. Intérêts et objectifs.

La grande quantité des travaux menés sur la biologie reproductive des schistosomes et particulièrement *S. mansoni* montre l'indiscutable intérêt de ce sujet, non seulement pour son **impact en santé humaine**, mais aussi d'un point de vue **évolutif** et **mécanistique**. D'un point de vue évolutif, sa position phylogénique et son **gonochorisme atypique**, ainsi que les pressions de sélection exercées dans le contexte de **l'interaction hôte-parasite** en font un organisme original pour l'étude des mécanismes de déterminisme sexuel. D'un point de vue mécanistique *S. mansoni* semble tout aussi original, notamment par le **caractère ancestral de ses gonosomes** et **l'absence de gène W-spécifique**.

L'existence du génome assemblé de *S. mansoni* (v5.2) et le développement de techniques moléculaires performantes (*e.g.* ChIP-seq) facilitent l'étude de l'expression des gènes et des mécanismes de régulation sous-jacents chez cette espèce. Cependant, de nombreuses questions restent encore à ce jour sans réponse et parmi elles, le programme moléculaire conduisant à l'apparition du dimorphisme sexuel. Afin de **corréler l'apparition de ce dimorphisme sexuel à des mécanismes moléculaires**, nous proposons ici une étude en trois étapes. Dans un premier temps nous vous présenterons une **approche ciblée** sur des gènes connus pour leur implication dans les mécanismes de détermination/différenciation à l'échelle du règne animal : les *DMRTs* (*double-sex and mab-3 related transcription factors*). Ensuite nous vous exposerons une **approche globale inédite, menée en parallèle chez les mâles et les femelles, sur plusieurs stades de développement *in vivo.*** Cette approche combine un aspect transcriptomique et un aspect épigénomique. Enfin dans un troisième temps, nous proposons une analyse plus approfondie du **mécanisme de compensation de dose génique**, notamment par une étude des mécanismes chromatiniens sous-jacents. Une quatrième et dernière partie sera consacrée à un autre aspect développé pendant ce travail de thèse : un développement méthodologique de la culture *in vitro* des schistosomules, qui présente un enjeu important dans la perspective de validations fonctionnelles.

B. Repositionnement des stades développementaux étudiés.

Nos études moléculaires se concentrent sur le dernier **stade larvaire indifférencié cercaire** et sur les phases vertébrées du cycle de vie de *S. mansoni*: **les schistosomules en différenciation, et les vers adultes dimorphiques** (Figure 29). Afin de rendre possible l'étude « sexe-spécifique » (1) nous avons produit des populations clonales de cercaires par des infestations monomiracidiales de l'hôte intermédiaire mollusque, puis (2) nous avons déterminé le sexe de ces clones grâce à des marqueurs moléculaires spécifiques des femelles et enfin (3) nous avons procédé à des infestations unisexuées de l'hôte vertébré (expérimentalement substitué par la souris). L'asynchronie des schistosomules a été contournée par un tri basé sur des critères morphométriques (décrits plus loin) et les adultes correspondent à des mâles inexpérimentés et des femelles immatures. Nous nous situons donc **en amont de la fonction reproductrice** et ne considérons que **les premières étapes des différenciations somatiques et gonadiques** (Figure 30), qui précèdent la maturation fonctionnelle induite par l'accouplement.

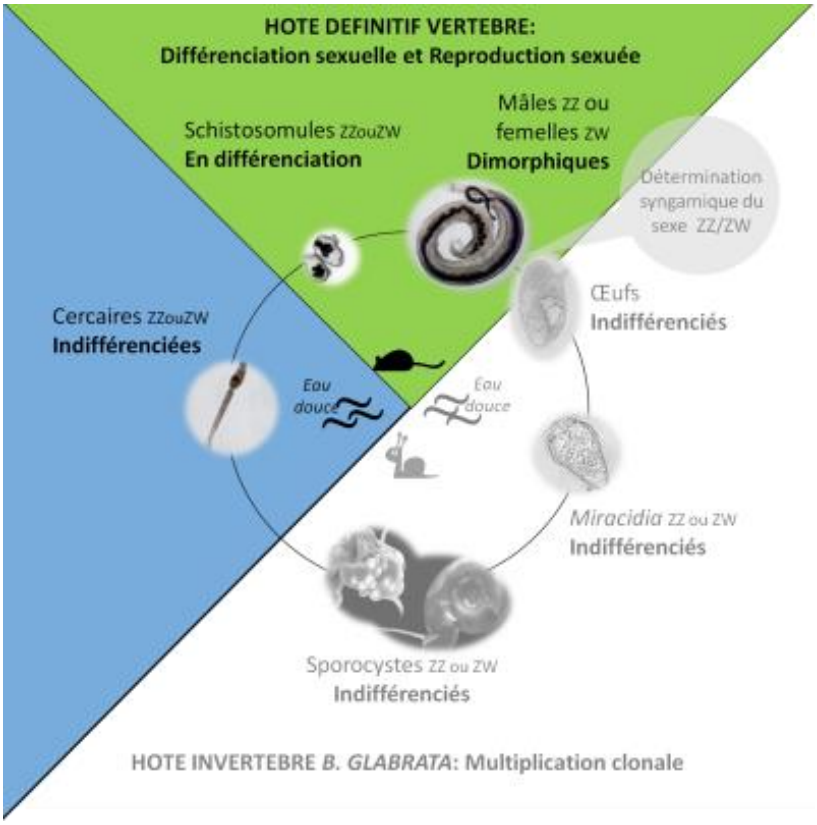


Figure 28. Les différentes phases du cycle de vie de* S. mansoni *étudiées dans ce travail : aquatiques (en bleu) et parasitaires (en vert).

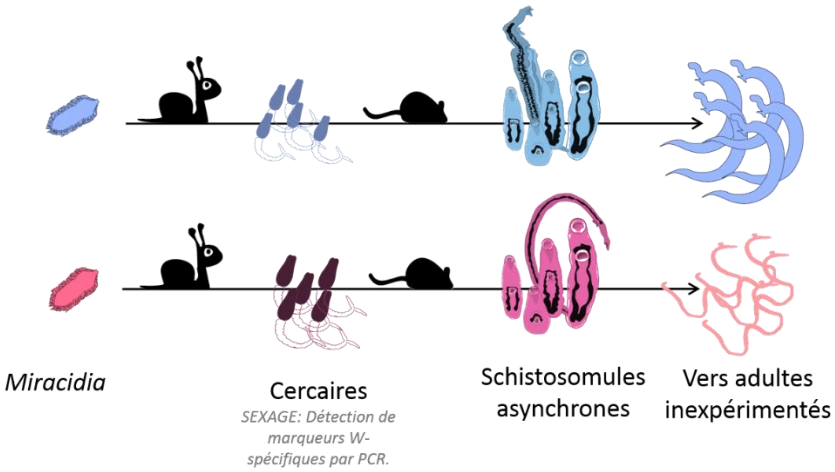


Figure 27. Méthode d'obtention des populations clonales mâles et femelles.

RESULTATS

Partie1, Approche ciblée : Revue, et étude des gènes *DMRTs* chez *S.mansoni.*

Comme nous l'avons évoqué dans la première partie de l'introduction, la famille des gènes *DMRTs* (*doublesex ad male-abnormal-3 related transcription factors*) est connue pour son rôle central dans la fonction sexuelle à travers tout le règne animal, tant chez les bilatériens (*e.g.* mammifères) que chez les non-bilatériens (*e.g.* cnidaires) (Wexler et al. 2014). On distingue neuf groupes de gènes *DMRTs*, en plus des homologues de *dsx* et *mab-3,* qui sont les deux premiers membres découverts respectivement chez la drosophile et chez *Caenorhabditis elegans* (Hildreth 1965; Shen and Hodgkin 1988). Certains sont conservés dans de nombreux taxa (comme le *dmrt2*) alors que d'autres ont une distribution plus restreinte (comme le *dmrt1* chez les vertébrés) (Wexler et al. 2014). De la même façon, ils occupent différentes fonctions dans les mécanismes de détermination, de différenciation et/ou de maintien de l'identité sexuelle à travers tout le règne animal (Kopp 2012; Matson and Zarkower 2012). Ils peuvent même avoir un rôle dans la neurogenèse (Hong et al. 2007). Nous proposons ici de nous intéresser à ces gènes aux travers de trois études complémentaires:

1. Travail de revue bibliographique : "The roles of *DMRT* (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom."(Picard et al. 2015).

Dans un premier temps, il nous est apparu important d'effectuer un travail de synthèse relevant la présence/absence des groupes de *DMRTs* dans différents taxas du règne animal, à l'exception des mammifères déjà très documentés. Nous avons considéré tous les organismes, indépendamment de leur stratégie de reproduction (*i.e.* gonochorique ou hermaphrodite) et indépendamment de leur mode de déterminisme sexuel (*i.e.* chromosomique ou environnemental). Pour chacun d'entre eux, nous avons relevé la transcription différentielle de ces gènes entre les sexes, ainsi que leur profil spatial (*Dans quel(s) organe(s) s'expriment-ils ?)* et temporel (*A quel moment du développement ou de la vie s'expriment-ils ?*). Cette étude permet ainsi d'avoir une vision globale de l'expression sexe-spécifique des différents *DMRTs*, et de constater qu'ils sont **en grande majorité impliqués dans la voie mâle.** Nous proposons également une étude de la conservation des domaines DM (*i.e.* domaine de liaison à l'ADN) des différents groupes : nous avons pu constater la stricte conservation de six résidus cystéines et de deux résidus histidines permettant la configuration en « doigts de zinc entrecroisés » (Erdman and Burtis 1993; Zhu et al. 2000) et nous avons pu définir des **séquences consensus propres à chaque groupe de gènes**.

2. Etude de transcriptomique ciblée: "Atypical female-biased expression pattern of *DMRT* genes through *in vivo* developmental stages of *Schistoma mansoni*."

Dans la continuation de ce travail de revue il est apparu particulièrement pertinent de s'intéresser au statut des *DMRTs* chez *S. mansoni* qui, comme *Schmidtea mediterranea,* est un plathelminthe mais dont le statut de parasite gonochorique en fait une curiosité évolutive (Combes 1991). Ainsi, sa position phylogénique mais aussi le caractère ancestral de ses chromosomes sexuels (ZW) et l'absence de gène spécifique de l'hétérochromosome (Portela et al. 2010; Lepesant et al. 2012) en font un modèle particulièrement intéressant pour l'évolution des systèmes de déterminisme sexuel. Jusqu'à présent aucun gène déterminant du sexe n'a encore été identifié chez cette espèce, et les gènes *DMRTs* sont particulièrement intéressants dans ce contexte. Nous proposons ici de mener une étude transcriptomique ciblée des quatre gènes *DMRTs* identifiés chez *S. mansoni*. Nous avons fait une cinétique sur 5 stades de développement : le stade indifférencié cercaire, trois stades schistosomules *in vivo* et le stade adulte. Le développement schistosomule est particulièrement asynchrone, c'est pourquoi nous avons proposé un tri basé sur des critères morphométriques, permettant la formation de trois classes synchronisées. Cela nous a notamment

permis de montrer que **les mâles se développent plus vite que les femelles** dans le contexte d'infestations unisexuées. Concernant l'expression des gènes *DMRTs*, nous n'avons pu détecter que trois d'entre eux (par une approche de PCR quantitative). Ces trois gènes (*Sm_dmd1, Sm_dmd2* et *Sm_dmd3*) présentent une **sur-expression chez les femelles pendant les trois stades schistosomules de développement. Au stade adulte, *Sm_dmd1* est associé aux mâles** comme précédemment observé (Chong et al. 2013). ***Sm_dmd2* reste associé aux femelles**. ***Sm_dmd3*** (homologue du *dmrt2* humain) quant à lui ne s'exprime plus à l'âge adulte, et ce profil **d'expression très transitoire évoque plutôt une fonction de déterminant**. D'un point de vue évolutif, il est intéressant de souligner que ***Sm_dmd1* et *Sm_dmd2* semblent être spécifiques des plathelminthes** alors que *Sm_dmd3* et *Sm_dmd4*, situés sur les chromosomes sexuels sont conservés au-delà de ce phylum.

3. Expérience de validation fonctionnelle: "Functional validation of putative molecular sex determinants: *DMRT* genes."

Il semblait ensuite indispensable de confirmer nos hypothèses par une validation de la fonction des gènes *DMRTs* chez *S. mansoni*. Cela a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Conor R. Caffrey du Center for Discovery and Innovation in Parasitic diseases (CDIPD, Université de Californie San Francisco, USA), au sein de laquelle j'ai effectué un stage de six semaines en avril et mai 2014. Nous avons proposé une validation fonctionnelle de type « perte de fonction » par des expériences d'interférence par ARNs (dsRNA et siRNA). Cette étude a été menée alternativement sur des schistosomules transformés *in vitro* (voir partie 4 pour la méthodologie de mise en culture) ou des schistosomules *ex vivo* (*i.e.* obtenus par perfusion 25 jours post-infestation, puis mis en culture). **Aucun phénotype n'a malheureusement pu être observé.** Cela nous a néanmoins permis de mener une réflexion importante sur les **enjeux techniques** de ces méthodes de validation chez les **organismes non modèles** et plus précisément dans le contexte d'un **développement parasitaire** comme chez *S. mansoni*.

C. R. Biologies 338 (2015) 451–462

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com

Molecular biology and genetics / Biologie et génétique moléculaires

The roles of Dmrt (Double-sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom.

Rôle des gènes Dmrt (Double-sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) dans le déterminisme sexuel ou la différenciation sexuelle : ubiquité et diversité dans le règne animal.

Marion Anne-Lise Picard, Céline Cosseau, Gabriel Mouahid, David Duval, Christoph Grunau, Eve Toulza, Jean-François Allienne, Jérôme Boissier *

Université Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Universite´ de Montpellier, 58, avenue Paul-Alduy, bâtiment R, 66860 Perpignan, France

* Corresponding author.
E-mail address: boissier@univ-perp.fr (J. Boissier).

http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2015.04.010
1631-0691/ © 2015 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
© 2015 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Article history:
Received 2 February 2015
Accepted after revision 15 April 2015
Available online 1 June 2015

Keywords: *Dmrt* genes / Gene expression pattern / Functional diversity

ABSTRACT

The Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes have been intensively studied because they represent major transcription factors in the pathways governing sex determination and differentiation. These genes have been identified in animal groups ranging from cnidarians to mammals, and some of the genes functionally studied. Here, we propose to analyze (i) the presence/absence of various Dmrt gene groups in the different taxa across the animal kingdom; (ii) the relative expression levels of the Dmrt genes in each sex; (iii) the specific spatial (by organ) and temporal (by developmental stage) variations in gene expression. This review considers non-mammalian animals at all levels of study (i.e. no particular importance is given to animal models), and using all types of sexual strategy (hermaphroditic or gonochoric) and means of sex determination (i.e. genetic or environmental). To conclude this global comparison, we offer an analysis of the DM domains conserved among the different DMRT proteins, and propose a general sex specific pattern for each member of the Dmrt gene family.

Mots-Clés : Gènes *Dmrt* / Profil d'expression génique / Diversité fonctionnelle

RESUME

Les gènes Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) ont été particulièrement étudiés, car ils représentent des facteurs de transcription majeurs dans le déterminisme sexuel ou dans la différenciation sexuelle. Ces gènes ont été identifiés, et parfois fonctionnellement étudiés, des cnidaires aux mammifères. Cet article propose d'analyser (i) la présence/absence des différentes familles de gènes Dmrt dans différent taxa du règne animal ; (ii) de relever leur expression relative male vs femelle ; (iii) de souligner leur expression spatiale (c'est-à-dire dans quel organe les gènes s'expriment) et temporelle (c'est-à-dire à quelle phase du développement les gènes s'expriment). Cette synthèse considère tous les animaux, qu'ils soient bien étudiés ou pas (c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'importance particulière donnée aux organismes dits « modèles »), qu'ils soient hermaphrodites ou gonochoriques et que leur déterminisme sexuel soit génétique ou environnemental. Seuls les mammifères sont exclus de cette synthèse. En guise de conclusion, nous proposons une analyse permettant de discriminer les différentes familles de protéines Dmrt et une vision globale de l'expression sexe-spécifique des gènes Dmrt.

1. Introduction

The existence of Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes was first formally proposed in the fruit fly, Drosophila [1], where the spliceforms of DSX are sex-specific: the female-specific spliceform activates genes, while the male-specific spliceform represses its targets [2]. The transcription factor family is characterized by an unusual zinc finger motif called DM domain [3,4]. The domain consists of six conserved intertwined cysteines and two histidines (site 1, CCHC and site 2, HCCC) that form a groove for the binding of DNA [4]. The presence of Dmrt genes in nonbilaterian animals (e.g., corals and placozoa) suggests that this gene family originated before eumetazoans [5]. In contrast, Dmrt genes appear to be lacking in the genomes of sponges, choanoflagellates and fungi. The members of the Dmrt family include nine Dmrt genes (Dmrt1 to Dmrt9) plus DSX from insects and Mab from Caenorhabditis [5,6]. This classification reflects monophyletic gene groups having at least one DM domain. Some species (e.g., Planaria) possess two paralogs [7]. Members of the Dmrt gene family are broadly represented in animal kingdom but they lack clear linkages with species clades, with some exceptions. For example, DSX only present in arthropoda, Dmrt1 is only present in vertebrates, and Dmrt6-9 are only present in mammals.

Dmrt genes have been intensively studied because they represent major transcription factors of the sex determination or differentiation pathways. It is generally agreed that a gene may be considered to be a sex determination gene when modification of its expression induces sex reversal. However, the identification of a gene as a sex determination gene may also consider the temporal window for sex determination, the sex chromosome localization and the genetic strict necessity of the gene. In this context, Dmrt genes have been proposed as sex determination genes for the medaka fish, Oryzias latipes [8], the African clawed frog, Xenopus laevis [9], the chicken, Gallus gallus [10], the daphnia, Daphnia magna [11] and the planarian, Schmidtea mediterranea [7]. In several other species, Dmrt genes have been implicated later in sexual development (i.e. downstream of the sex differentiation cascade), as changes in their expression levels induce sexual abnormalities rather than sex reversal. For example, the loss of Dmrt1 causes undifferentiated mouse spermatogonia to precociously exit the normal program of proliferation/differentiation to spermatids [12,13]. For the majority of species in which Dmrt genes have been identified, however, the role of such genes in sex determination or differentiation remains unknown.

Several previous reviews on Dmrt have focused on a particular animal group, such as fishes [14] or mammals [15,16], while more generalist reviews have mainly focused on knowledge gained from model organisms, such as the mouse, Caenorhabditis or Drosophila [17,18]. Except in the case of model organisms such as the hermaphroditic C. elegans, the existing reviews have largely focused on gonochoric species with chromosomal sex-determining systems (ZW or XY systems). Here, we systematically review all non-mammalian animals regardless of their level of study, their sex determination strategy (hermaphroditic or gonochoric) and whether their sex is genetically or environmentally controlled. We exclude mammals because two very recent reviews exist on their Dmrt genes (i.e. Dmrt6 to -9) [15,16]. We do not focus on the detailed downstream mechanisms of the sex determination or differentiation pathways, but instead look at different aspects of the diversity found within the Dmrt gene family. For each animal, we first examine the presence/absence of the family members [6] in various animal species and taxa. Second, we assess sex-specific differences in the expression levels of each known gene. Third, when possible, we discuss any known spatial (organ-level) and temporal (developmental stage-level) variations in Dmrt gene expression. Finally, we introduce a database and its use in a discriminant analysis of the DM domains conserved among the different proteins. A comprehensive phylogeny of the Dmrt gene family was very recently described by Wexler et al. [5].

2. Cnidaria

Dmrt genes have been identified in two stony corals (Lopheliapertusa and Acroporamillepora), one hydra (Hydra magnipapillata) and one sea anemone (Nematostellavectensis). The temporal expression of the DM domaincontaining gene, AmDM1, has been studied in Acropora millepora [19]. In this species, it is difficult to assess sexspecific spatial expression because the individuals are hermaphroditic, with male and female cells adjacent to each other. Furthermore, the presence of a hard calcium carbonate matrix makes it difficult to access the gonad for in situ hybridization. With respect to temporal expression, however, Northern blot analysis revealed that the expression of AmDM1 was correlated with the annual cycle of sexual differentiation. No expression was detected in the egg and embryonic stages, whereas expression was detected in all adult stages, with maximum expression observed during October in the branch tip compared to the base of the branch) [19]. This expression pattern is consistent with the sex differentiation of this species.

3. Platyhelminthes

Dmrt genes have been identified in a planarian (Schmidtea mediterranea, free living and hermaphroditic), the Chinese liver fluke (Clonorchis sinensis, parasitic and hermaphroditic) and a schistosome (Schistosoma mansoni, parasitic and gonochoric). Four DM domain-containing genes have been identified in each genome. A complete functional study was recently performed on Smed-dmd-1 from Schmidtea mediterranea [7]. In terms of spatial expression, this Dmrt gene is expressed in both the nervous system (in neurons) and the reproductive system, where it is expressed in somatic cells of the testes and in the accessory male sexual organs (seminal vesicles, sperm duct and penis papilla) [7]. Temporally, Smed-dmd-1 is expressed: (i) during the early stage of development, when RNAi experiments have shown that the gene is required for the development of both male and female reproductive systems; (ii) in sexually adult individuals, when RNAi was found to affect only males;(iii) during the post-amputation regeneration of males but not females. Considering this expression pattern, the authors suggest that Smed-dmd-1 functions in male development and in the subsequent development of the female consistent with the protandrous nature of the planarian. Finally, the authors showed that Schistosoma mansoni expresses a homolog of Smeddmd-1 (called Sm-dmd-1) that is more highly expressed in adult males than in adult females [7].

4. Mollusca

"+" and "++": low and high level of expression respectively; "–": no expression detected; NP: not performed.

Table 1. Comparative spatial expression of different Dmrt genes in mollusks.

	Organ	Gills		Mantle		Adductor Muscle		Digestive gland		Gonad		Reference
Species	Gene	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
Crassostrea gigas	Cg-DMl	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	[96]
Pinctada martensis	pmDmrt2	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	[21]
Chlamys farreri	Cf–dmrt4–like	+	–	+	+	+	+	NP	NP	+	–	[97]
Haliotis asinine	Ha–Dmrt1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	+	–	[98]

Dmrt genes are known in six mollusk species and have been studied in three bivalves and one gastropod species of economic importance: the pacific oyster (Crassostrea gigas), the Akoya pearl oyster (Pinctada martensis), the Japanese scallop (Chlamys farreri) and the tropical abalone (Haliotis asinina). The oysters are protandrous hermaphrodites, while the scallop and abalone are both gonochoric. A number of environmental factors have been reported to play important roles in the sex determination and differentiation of mollusks, including nutrition, water temperature, and the proportion of males and females [20]. Table 1 summarizes the spatial expression of the Dmrt genes in the different mollusk species, showing how the pattern varies greatly by species and tissue. In gonads, Dmrt expression is specific to the testes of Pinctada martensis, Chlamys farreri and Haliotis asinina, and more highly expressed in males than females in Crassostrea gigas. In the context of temporal expression, maximum gene expression is detected at the adult stage in all tested species. For Pinctada martensis, the Dmrt gene expression pattern follows the reversal of sex from male to female [21]: it is absent from juvenile gonads, increases as the testes develop, and decreases once more as the animal transitions from male to female, until no expression is detected in the mature female gonad [21].

5. Nematoda

5.1. Caenorhabditis elegans

The Nematoda include Caenorhabditis elegans, which is one of the most widely studied animal models. C. elegans uses an $XX_{hermaphrodites}/XO_{male}$ system, and the molecular aspects of sex determination and differentiation have been extensively studied in this organism (see [22,23] for review). Among the 11 DM genes predicted from genomic sequences, three genes, mab-3, mab-23 (mab stands for "male abnormal") and dmd-3, play central roles in male differentiation and behavior.

Among them, mab-3 was the first identified, in a 1988 paper [24] reporting that: (i) a mutation in mab-3 causes the synthesis of yolk protein in male worms but has no effect on hermaphrodite worms; and (ii) mab-3 is required for the development of the male-specific sense organs (called V rays) required for mating. Later studies showed that mab-3, which represses the transcription of genes related to the production of yolk proteins [25], is required for transcription of male-specific genes in sensory neurons of the head and tail [26–28] and is necessary for male-specific muscle differentiation [29]. Behavioral assays showed that male mab-3 mutants present deficits in attraction to and interaction with hermaphrodites [27]. It was recently shown that mab-3 suppresses the expression of several target genes whose transcription has been implicated in the oxidative stress, perhaps explaining why male worms are much more sensitive to oxidative stress than their hermaphroditic counterparts [30].

Mab-23 was first characterized in 2002 [29]. Male mab23 mutants have morphological abnormalities in their tails, gonads and nervous system, and are unable to sire progeny. In males, mab-23 has been implicated in the patterning of the nervous system [28,29], the development of male-specific muscles [28,29] and the development of the proctodeum

[28]. Mab-23 mutants are defective in the stereotyped sequence of copulatory behavior and show impairments in the transfer of sperm during copulation [28,29]. In hermaphrodites, mab-23 is expressed in both sex- and non-sex-specific tissues; however, hermaphrodite mab-23 mutants do not show any detectable phenotype, suggesting that this gene is unnecessary or functionally redundant in hermaphrodites [29].

Dmd-3 was first characterized in 2008 [31]. In C. elegans, the tail tip is highly dimorphic between males and hermaphrodites; male dmd-3 mutant exhibit abnormal tail tips, and dmd-3/mab-3 double mutant show more severe tail-tip abnormalities. The expression of dmd-3 is the same in the tail tips of males and hermaphrodites, suggesting that while it is essential for the development of the former, it may play a redundant role in the latter [31].

Considering their apparent position in the pathways of sexual development, mab-3, mab-23 and dmd-3 seem to be implicated in sexual differentiation rather than sex determination. The roles of the other Dmrt genes found in the genome of C. elegans (dmd-4 through dmd-11) are unknown.

5.2. Other nematodes

Dmrt gene sequences have been identified in free-living Caenorhabditis briggsae, C. remanei and C. brenneri, and in the parasitic species, Ascaris suum, Trichinella spiralis,

Brugia malayi, Loa loa and Trichostrongylus vitrinus. Characterization (a partial one) has only been performed to date for the parasite, Trichostrongylus vitrinus [32]. This worm possesses four undifferentiated larval stages before the gonochoric adult stage. Larval stage 3 (L3) is the infective stage. The Dmrt gene, Tv-mab-23 (similar to mab-23 of C. elegans), was identified and the gene product was quantified in L3 larvae, L4 larvae, and male and female adults. Gene expression was detected at all stages. The levels were similar in the L3 and adult stages, while the maximum expression level was obtained from the morphologically undifferentiated L4 stage. In males, this stage corresponds to the sperm-producing stage of freeliving and parasitic nematodes [33], suggesting that Tvmab-23 plays a specific role in males. Similar to C. elegans, in which mab-23 is expressed in both the male and hermaphroditic forms, the expression level of Tv-mab-23 is the same in male and female adults of T. vitrinus.

6. Hexapoda

In Hexapoda (insects), the primary signal for sex determination varies greatly by order, but the bottom of the cascade is conserved (see [34–36] for details). Dmrt genes, which are known as doublesex (DSX) genes in insects play a pivotal role in insect sex determination. As sex determination systems, insects can use XX/XY, ZZ/ZW, XX/XO or homomorphic chromosomes with a maledetermining factor [36]. There is no known link between the sex determination system and the *DSX* gene, but sexspecific alternative splicing of the *DSX* gene can produce DSX^M or DSX^F transcripts for males and females, respectively.

Detailed studies have been performed on Drosophila as a model organism (see [35,37,38] for review). A recent celllevel study revealed that the *DSX* gene shows dynamic and precise spatial and temporal expression patterns in Drosophila [39]. In the embryo, the *DSX* gene is only expressed in the gonad; in the larval stage, the expression extends to other tissues; and in the adult stage, the expression is localized to tissues in which *DSX* is known to play developmental roles, such as the peripheral and central nervous systems (see [39] for a detailed description). Notably, not all cells in a given tissue show expression of the *DSX* gene; instead, both males and females are mosaics of sexually differentiated and undifferentiated cells. Functional studies have shown that the sex-specific transcripts of DSX are implicated in several morphological and behavioral traits that show sexual dimorphism, as well as being intimately associated with the sex-specific transcripts of fru [37,38,40].

DSX genes have been identified in all insects studied to date, including 21 species of Diptera, four species of

Hymenoptera, four species of Lepidoptera, one Coleopteran, one Phthirapetran and one Hemipteran.

7. Crustacea

7.1. Brachiopoda

The water flea, Daphnia magna, is known to switch between sexual and asexual reproduction depending on the quality of the environment [41]. This crustacean parthenogenetically produces males when the photoperiod is shortened, food is lacking or the population density increases. In the sexual part of the water flea life cycle, the expression levels of three DM domain-containing genes (*DMRT11E, DMRT93B* and *DMRT99B*) have been compared between the sexes [41]. *DMRT11E* and *DMRT99B* are much more highly expressed in the ovary than in the testis, while *DMRT93B* is only expressed in the testis [41]. A recent study showed that these genes are not differentially expressed during embryonic development, suggesting that they are not involved in sex determination, but rather in sex differentiation [11]. Two additional DM domain genes were recently identified; they were designated *DapmaDsx1* and *DapmaDsx2* based on their similarity to the *DSX* genes of Drosophila [11]. *DapmaDsx1* encodes two mRNAs (*DapmaDsx1alpha* and *DapmaDsx1beta*) that differ in their 5′UTRs and show male-specific expression both temporally and spatially [11]. The expression levels of these two genes increase exclusively in male embryos during the development of sexually dimorphic organs (72 hours post-ovulation). Spatially, the *DapmaDsx1alpha* mRNA is only expressed in testes, while the *DapmaDsx1beta* and *DapmaDsx2* mRNAs are more highly expressed in testis than in ovary. *DapmaDsx1* and *DapmaDsx2* show even higher expression levels in the sexually dimorphic organs of the male daphnia (i.e. the first antennae and first thoracic segment). Finally, using gain (transient transgenesis) and loss (dsRNA-based gene knockdown)-of-function analyses, the same authors showed that *DapmaDsx1*, but not *DapmaDsx2*, plays a primordial role in male determination [11].

7.2 Decapoda

Eriocheir sinensis is the only Decapoda in which Dmrt genes have been studied. This mitten crab is a gonochoric animal, but the genetic bases of its sex determination remains unknown. Only one Dmrt gene has been isolated in this species [42]: the *EsDMRT-like* gene, which shows 37% homology with *DMRT99B* isolated from Drosophila. This gene is present in both males and females, but is only expressed in the testis (not in ovary, heart, hepatopancreas, muscle, thoracic ganglion or gill) [42]. Interestingly, the transcript level is higher in immature testis compared to mature testis. In situ hybridization showed that *EsDMRT-like* transcripts in the testis can be detected in both Sertoli and germ cells. Together, these findings suggest that this gene plays a role in male differentiation. Its possible role in male determination cannot be assessed, however, as the kinetic expression pattern has not yet been analyzed.

8. Amphibia

In general, amphibian sex determination is genetically controlled by XY/XX (i.e. Ranalivida) or ZW/ZZ (i.e. Xenopus) systems [43]. However, some species possess a certain amount of plasticity. For instance, different populations of the frog, Ranarugosa, possess different determination systems [44], and the sex of the salamander, Hynobiusretardatus, can be modified by environmental cues (genetic males can convert to phenotypic females at a high temperature) [45].

8.1 Anura

Table 2. Comparative spatial expressions of different Dmrt genes in Rana rugosa.

	Brain	Heart	Pancreas	Kidney	Lung	Liver	Muscle	Spleen	Testis	Ovary	Reference
Dmrt1	–	–	–	–	–	–	–	–	++	–	[49]
Dmrt2	+	–	–	++	NP	NP	NP	NP	++	–	[51]
Dmrt3	++	–	–	–	NP	NP	NP	NP	+	–	[51]
Dmrt5	++	++	++	++	NP	NP	NP	NP	++	++	[51]

"+" and "++": low and high level of expression respectively; "–": no expression detected; NP: not performed.

The important role of Dmrt genes in the sex determination process has been clearly demonstrated in the African clawed frog, Xenopus laevis. In this species, two DM domain-containing genes have been identified: *Dmrt1* [46] and its paralog, *Dm-W* [9]. *Dmrt1* is found on chromosomes 2 and 3, as Xenopus experienced genomic duplication during evolution [9]. Both genes are expressed early in embryonic development and are candidates to be sex determination genes. Spatially, *Dmrt1* is exclusively expressed in male and female primordial gonads, while *Dm-W* is only expressed in female primordial gonads [9]; both genes co-localize in the somatic cells surrounding primordial cells [45]. Temporally, *Dmrt1* is expressed during all gonadal differentiation steps in testis and ovary [9,47], while *Dm-W* is only expressed at the time of sex differentiation [9]. *Dm-W* was shown to bind the same DNA sequence as *Dmrt1*, thereby antagonizing its transcriptional activity [9]. *Dm-W* plays a primordial role in female sex determination, as shown using gain- and lossof-function analyses. These studies yielded the following three main results: First, constitutive expression of the female Dm-W gene in ZZ male Xenopus was shown to induce the development of ovotestis but not normal ovaries, suggesting that another W- or Z-specific gene might contribute to the latter. Second, knockdown of DmW expression in ZW female Xenopus induced male development. Third, constitutive expression of male Dmrt1 in ZW female Xenopus induced male development. Based on the above-described results, the following scenario was proposed for sex determination in Xenopus: in female tadpoles, Dm-W binds the Dmrt1 target sequence to block the development of testes, while in male tadpoles, Dmrt1 acts freely as a testis-forming factor [48]. To date, the DmW gene is the only known female-determining factor. It was recently shown that Dm-W is not present in all Xenopus species [46]; instead, some closely related species differ in possessing or not possessing the Dm-W gene (i.e. X. laevis versus X. borealis), suggesting that the mechanism of sex determination might differ even within the same order.

Dmrt genes have been identified in various other frog species, including Rana plancyi, R. nigro maculata, R. livida, R. rugosa, Microhyla ornata, Engystomops pustulosus and Odorrana schmackeri. R. rugosa is an interesting animal model for studying sex differentiation processes, because the sex of an XX female tadpole can be modified by injection of testosterone [49]. Four Dmrt genes have been identified in R. rugosa and their spatial expression is summarized in Table 2. All of these genes are expressed in testis but only Dmrt5 is expressed in ovary. Dmrt1 is expressed by interstitial cells, Sertoli cells and germinal cells of the testes [50]. Except for ovary, the organ-level gene expression pattern has only been tested in male adult frogs; thus, we lack detailed information on the expression of Dmrt1 in males versus females. The expression patterns vary according to the gene and organs considered [50–52]. However, as these studies used RT-PCR, not quantitative-RT-PCR, the relative expression levels should be interpreted with caution.

In terms of temporal expression, the patterns exhibited by all four genes are similar for males and females in the developing gonads of embryos and tadpoles, and for each of the seven developmental stages tested [51]. In sex-reversal experiments performed using the XX female tadpole, researchers observed that Dmrt1 is not expressed in the ovary, but rather appears after testosterone injection [50]. Because all four Dmrt genes are expressed in both male and female embryos, they would appear to be implicated in sex differentiation rather than sex determination. Consistent with this, Dmrt1 is localized on an autosomal chromosome [50].

In Bufonidae, males possess a special feature: the Bidder's organ, which is an undeveloped ovary located anterior to the testis in male toads. Following removal of the testes, the Bidder's organ develops and produces viable oocytes [53]. Thereafter, the female accessory organs develop and the male becomes a functional female. Four partial Dmrt gene sequences have been identified in the Asiatic toad (Bufo gargarizans) and one Dmrt gene has been identified

and studied in the cane toad (Bufo marinus) [54]. The latter gene is highly similar to the Dmrt1 gene from various species, such as frog, Xenopus, chicken and mouse [54]. Spatial analysis showed that this gene is expressed in testis, ovary and the Bidder's organ, but not in brain, heart, lung, liver, kidney or muscle. Temporal analysis showed that: (i) newly metamorphosed individuals do not express the gene; (ii) in the early stages of sex differentiation, males and females show similar patterns of Dmrt1 expression; (iii) later, when the testis and ovary are visible, this expression increases in males and decreases to a basal level in females. These elements suggest that in the cane toad, Dmrt1 may be implicated in sex differentiation but not in sex determination.

8.2 Caudata

One Dmrt gene, analogous to Dmrt1, was found in the salamander, Hynobius retardatus [55]. The sex of this species is temperature-sensitive, with genetic males becoming phenotypic females when reared at 28 8C. The spatial and temporal expression patterns of this Dmrt gene have been analyzed during the sexual differentiation period (i.e. 25 to 35 days after hatching) at different rearing temperatures [55]. Spatially, at normal temperature (20 8C), the gene was only expressed in testes, while at the female-producing temperature (28 8C), it was completely suppressed [55]. Temporally, a kinetic analysis performed using end-point PCR revealed that the transcript could be detected at all time-points at the normal temperature (20 8C), but was absent at the higher temperature (28 8C).

9. Testudines

Testudines (turtles) use a variety of sex determination mechanisms, including TSD (Temperature Sex Determination) and GSD (Genetic Sex Determination). Morphologically, the gonads of turtles and other reptiles develop as part of a heterogeneous tissue complex called the AKG (Adrenal, Kidney and Gonad) complex. This special feature makes it difficult to perform a precise analysis of spatial expression. In turtles, TSD has been proposed to be the ancestral trait [56]. The red-eared slider turtle, Trachemys scripta, may be considered the model organism for studying sex determination mechanisms in reptiles with TSD systems [57–61]. An analog of the chicken Dmrt1 gene was isolated in Trachemys scripta, and its expression was followed in the genital ridge during the critical period of sex determination [60]. Spatially, Dmrt1 is exclusively expressed in the gonads, and is not found in other tissues of the AKG complex [57]. Temporally, the gene is expressed prior to sexual differentiation (in stage 17 embryos). At a male-promoting temperature (26 8C), the expression increases over time, showing a strong peak at stage 19 [59]. Dmrt1 expression was found to be inhibited by injection of estradiol, which is known to produce females at a male-promoting temperature [59]. Similarly, a shift from a female-promoting temperature to a male-promoting temperature during the embryonic stage immediately increases the expression level of the gene [58]. At a femalepromoting temperature (32 8C) the expression remains low before and after sex determination. Similar results have been obtained in the sea turtles, Lepidochelys olivacea [62] and Chelydra serpentine [63]. In these two species, there is no observable difference in Dmrt1 expression at male- and female-promoting temperature in the early stages of development, but as development progresses, the expression of Dmrt1 increases at a male-promoting temperature (26 8C) and decreases to an undetectable level at a female-promoting temperature (33 8C) [62]. In the Reeves turtle (Mauremys reevesii), the expression of Dmrt1 was studied only in male individuals, where it was found to be expressed in testes but not in liver, spleen, brain or kidney [64]. Finally, DM genes have been isolated from other turtle species, but none has yet been subjected to a functional analysis [65].

10. Lepidosauria

Lizards generally have either GSD or TSD systems, and the two can co-occur within the same family. However, the Indian garden lizard, Calotes versicolor, is unusual because it does not have any distinguishable sex chromosomes [66–68]. One Dmrt1 gene was identified in this species [69]. Temporally, it

is expressed during all embryonic stages, from day 3 to the hatchling stage. Spatially, expression during the early stages is limited to the testicular pathway, while expression in the later stages can be detected in both testis and ovary [69]. Dmrt genes have been identified but not studied in four additional lizard species: Podarcis sicula, Anolis carolinensis, Eremias brenchleyi and Aspidoscelis inornata.

11. Bony fishes

The Dmrt1 genes and their functions in fishes were recently reviewed [14]. Here, we summarize the functional studies of these DM genes and mention those that have not yet been functionally studied.

Five Dmrt genes have been identified and studied in fishes. The Dmrt1 gene has been the most widely studied, as it was shown to be the sex determination factor in the Medaka fish, Oryzias latipes (see [70] for review). Because it was found on the Y chromosome, it is called Dmy or Dmrt1bY [71]. This is the only functional gene in the malespecific region of the fish's Y chromosome, making it a good (and possibly the only) candidate to be the sex determination factor [72]. The injection of a Dmy-encoding genomic fragment into XX females is sufficient to reverse the sex of 20% of fishes [8], and Dmy knockdown in XY male embryos initiates the female pathway [73]. Functional analyses have been performed on 18 other fish species, where Dmrt1 expression appears to be correlated with male development regardless of the sex determination system [14]. In gonochoric species, the gene is either exclusively expressed in males or more highly expressed in testes than ovary. In seasonal gonochoric species, the expression pattern is synchronous with the reproductive season. In hermaphroditic species, the gene expression increases or decreases in protogynous or protandrous species, respectively, during the sex-reversal period. Finally, in fish that use temperature-dependent sex determination the Dmrt1 gene is more highly expressed at the male-producing temperature than at the femaleproducing temperature. It is important to note that the Dmrt1 gene is not the universal sex-determining gene in fishes [74]; for example, it is absent from the genomes of some species related to Oryzias latipes, including Oryzias celebensis and Oryzias mekongensis [75,76].

Four other Dmrt genes (Dmrt2-5) have been identified and partially characterized in bony fishes (see Table 3). Temporally, all of these genes are active during both embryogenesis and various adult physiological processes [74,77–85]. Dmrt2 (also named Terra gene) implicated in neurogenesis [78] and left-right patterning [79] during embryonic development, while it is mainly expressed in male and female gonads or gills in adult fish. Exclusively, female expression has

Table 3. Comparative spatial expression of different Dmrt genes in fishes.

	Gene	Brain		Eye		Gills		Liver		Gonad		Muscle		Reference(s)
Species		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
Xiphophorus maculates	Dmrt2	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	[99,100]
Oryziaslatipes	Dmrt2	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	[80,101]
Takifugurubripes	Dmrt2	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[82]
Gadusmorhua	Dmrt2	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	[77]
Takifugurubripes	Dmrt3	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	[82]
Oryziaslatipes	Dmrt3	–	–	–	–	–	–	–	–	++	+	–	–	[80,101]
Daniorerio	Dmrt3	–	–	NP	NP	NP	NP	–	–	++	+	–	–	[81]
Gadusmorhua	Dmrt3	–	–	–	–	+	+	–	–	++	+	–	–	[77]
Xiphophorus maculates	Dmrt4	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	[99,100]
Oryziaslatipes	Dmrt4	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–	[100]
Takifugurubripes	Dmrt4	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	[82]
Oreochromisaureus	Dmrt4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	[83]
Paralichthys olivaceus	Dmrt4	+	+	–	–	+	+	NP	NP	+	–	NP	NP	[102]
Gadusmorhua	Dmrt4	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–	[77]
Xiphophorus maculates	Dmrt5	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	[99,100]
Daniorerio	Dmrt5	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–	[103]
Gadusmorhua	Dmrt5	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	[77]
Takifugurubripes	Dmrt5	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	[82]

"+" and "++": low and high level of expression respectively; "–": no expression detected; NP: not performed.

been identified in the gonad of the Atlantic cod [77]. In contrast, Dmrt3 has presented clearly male-gonad-biased expression in all studied species (Table 3). Such bias was also detected in other organs of the Japanese pufferfish, prompting the authors to propose that Dmrt3 functions cooperatively with Dmrt1 after gonadal differentiation in both fishes and mammals [82]. The gonadal sex-specific expression of Dmrt4 varies by species: in the Tilapia (Oreochromis aureus), Dmrt4 is only expressed in the ovary [83,85]; in the olive flounder (Paralichthys olivaceus) and the Medaka fish, it is only expressed in the testis [80,84]; and in the Atlantic cod and the Japanese pufferfish, it is expressed in the ovary and testis [77,82].

12. Archosauria

12.1 Birds

Three DM genes have been identified in birds (Dmrt1-3) [15,86]. Dmrt1, which is carried by the Z chromosome and absent from the W chromosome of all birds, including the ratites, has been demonstrated to be a key sex-determining factor in chicken [10,87–89]. The higher-dose expression of Dmrt1 in ZZ male chicken embryos induces male testicular development, while the lower dose arising in ZW female embryos produces the ovary [86,89,90]. In a recent functional validation study [10], the authors successfully knocked down Dmrt1 gene expression in the male embryo using RNA interference, creating a male loss-of-function model. However, experimental obstacles prevented the over-expression of Dmrt1 necessary to obtain a gain-offunction (i.e. masculinized) female embryo, which would be needed to fully validate the function of Dmrt1 and exclude (or not) a role for W-linked genes in female development. Compared to the chicken model, very few studies have been performed in other birds; however, Dmrt1 sequences are available for 16 Neognathes and 2 Ratites.

Relatively few Dmrt2 and Dmrt3 sequences (three and two, respectively) from birds are available in the relevant databases. However, these genes have been implicated in the embryonic development of the chicken: Dmrt2 has been implicated in left-right synchronization during chicken development [91], while Dmrt3 is expressed in several non-gonadal embryonic tissues (e.g., the nasal placode, telencephalon, spinal cord, somite, branchial arches and Mullerian ducts) [92].

12.2 Crocodiles

All crocodiles possess a TSD system. Dmrt1 expression in the crocodile was first reported in 1999 [93], in one of the first papers to show that the male-biased expression of DM genes is conserved in embryos of three distinct vertebrates: mouse, chicken and alligator (Alligator mississippienis). More recently, a detailed analysis was performed on another crocodile species, the Indian mugger (Crocodylus palustris) [66]. Eight Dmrt1 isoforms were sequenced, and expression pattern analyses revealed that they were expressed in the AKG complex and brain (at a much lower level), but not in the heart or liver [66]. Moreover, their expression levels were found to be higher at a male-promoting temperature (32.5 8C) than at a female-promoting temperature (30 8C).

13. Conclusions

13.1 Analysis of the conserved DM domain among the DMRT proteins

A comprehensive phylogeny of the Dmrt gene family was very recently published by Wexler et al. [5]. In order to complete this phylogeny, we herein provide an amino-acid alignment of the DM domains from various metazoans, highlighting the differences and similarities among the Dmrt family members (Fig. 1). All of the sequences used for this analysis are listed in a supplementary file (Table S1). As expected, the structurally important cysteine and histidine residues of the Zn finger-like DNA-binding motif are highly conserved. A module consisting of the four amino acids beginning at position 9 of the DM domain can be used to distinguish among some. The VLSW and VVSC signatures appear to be specific to the Dmrt3 and Dmrt2 groups, respectively, whereas the Y/FVSP motif is shared exclusively by members of the Dmrt1 group. This block is mainly composed of three hydrophobic residues and one polar amino acid. The DSX and DX

(unclassified sequence) groups are highly variable in this motif, suggesting that it may play a non-essential role in DM. Consistent with this, mutagenesis of these residues in the Drosophila DSX factor are tolerated and do not affect the DNA-binding affinity [94]. The nineteenth amino acid of the DM sequence is also characteristically associated with certain groups: a tyrosine is mainly detected in the Dmrt3, Dmrt5 and DSX groups, while a phenylalanine or histidine is present in the Dmrt1, Dmrt2 and DX groups, respectively. Substitution of this position (regardless of the original residue) does not appear to disrupt the structure of the DM domain [94]. Two other modules located at positions 21–24 and 28–35 of the DM sequence: WRD/XXIAE has been found in Dmrt1 group, WRD/LXVVE in Dmrt2, FKD/IXIIE in Dmrt3, WRD/TXIAE in Dmrt4, and WKD/TXIAE in Dmrt5. The XXTAD has been detected only in the DSX group, while over half of the DX sequences have a proline residue at position 21 of the sequence. All of the amino acids in these modules are functionally non-essential, regardless of their solvent accessibility and physicochemical properties [94]. Position 47 a conserved basic residue: a lysine or arginine for the DX group, and an arginine for the other groups. Its substitution induces a loss function, due to a lack of DNA binding [94]. However, this functional conservation has been detected in only 75% of the DX sequences.

13.2. Sex-specific DMRT gene expression

Table 4 summarizes the sex-specific expression by taxon for each DM domain-containing gene group. The Dmrt1 group is the most widely represented and thoroughly studied, and its expression pattern clearly favors the male developmental pathway. The single exception is DM-W, which is the female-determining factor on the W chromosome of Xenopus laevis. This exception is not explained by the fact that Xenopus possesses a female heterogametic sex determining system (ZZ/ZW), as the chicken possesses a similar system but uses a maledetermining factor on the Z chromosome. In addition, while the other gene groups seem to show a male preference, it is difficult to infer a global rule given that not all of the genes have been functionally studied at this point.

13.3. Future directions

The existing detailed analyses of the role of Dmrt genes in sex determination/differentiation have largely focused on model organisms, and spatial expression patterns have been more extensively

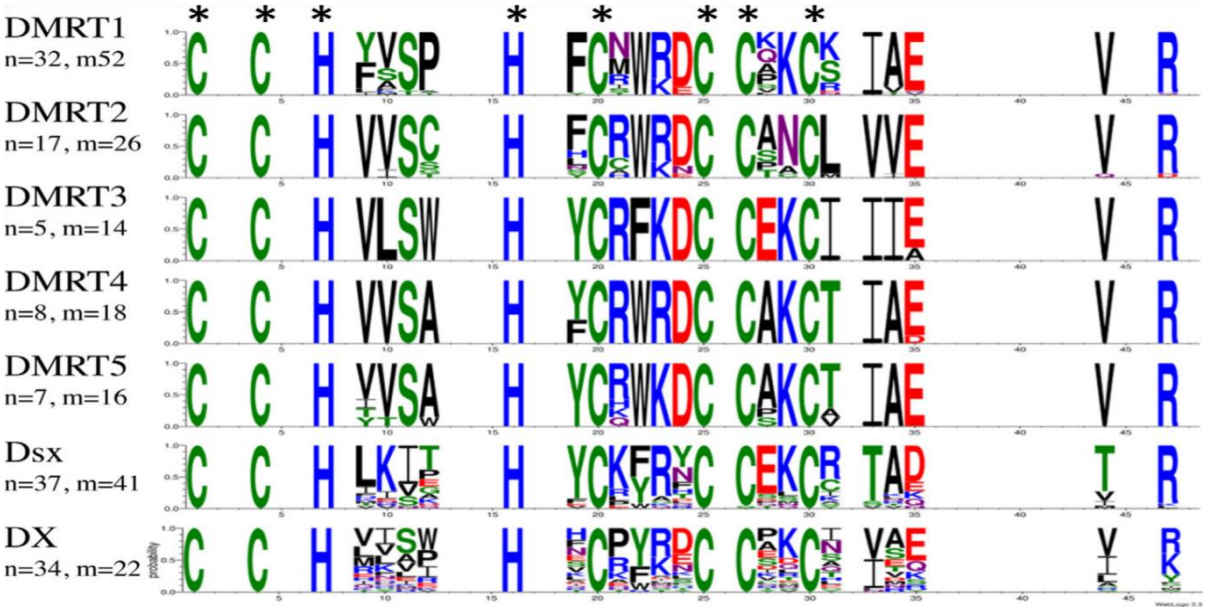


Fig. 1. Analysis of the conserved DM domain among the different proteins. Multiple amino acid sequence alignment of the DM domain from selected DMRT proteins (see supplementary Table S1) was performed using ClustalW software. Consensus sequences proposed for each DMRT protein groups and illustrated with WebLogo are indicated by the amino acid frequency at a given position. Undiscriminating amino acids are not shown. The six conserved cysteines and two histidines are marked by an asterisk, the others mentioned amino acids are represented by their physicochemical property: **acidic residues** (red), **basic residues** (blue), **polar residues** (green), **hydrophobic residues** (black) and **neutral residues** (purple). n: number of unique sequence considered. m: number of distinct species.

studied than temporal expression patterns. In the future, analyses that use both dimensions will provide better insights into the roles of these genes in sexual development.

Due to technical difficulties, functional characterizations of the Dmrt genes (such as through gain- or loss-offunction experiments) have been performed only in animal models. Transgenic techniques are likely to remain an option only for such models, but other methods for testing loss of function, such as the use of morpholino antisense oligonucletides, should continue to progress, potentially facilitating new advances in our understanding of how the Dmrt genes functions in sexual development.

This review focuses on genes that have been subjected to either partial or extensive functional characterization. The analysis of Dmrt gene expression lacks in groups were sequences are known to be present Echinodermata, Hemichordata, Chelicerata, Rotifera, Annelida, Placozoa, Tunicata, Cephalochordata, snakes and cartilaginous fish. Moreover, the sequence and diversity analyses of the Dmrt family members are biased by the fact that these genes have not been studied in some taxa. The development of next-generation sequencing programs should contribute to addressing this problem. This discrepancy between species studies is also notable in the context of gene expression. This is seen in the present review, where Table 1 summarizes information on the mollusk phylum, which has one gene per species, Table 2 addresses a single species of Anura in which several members of the Dmrt gene family have been analyzed, and Table 3 features a number of Dmrt genes in various species of fish. Some animal species are of particular interest when considering the roles of Dmrt genes in sexual development. First, it could be interesting to analyze the role of these genes in an evolutionary young sex chromosome system, such as that of the Schistosoma

Table4. Dmrt gene families according to different phyla (DX: non classified Dmrt gene).

Phylum	DM domain genes families						
	Dmrt1	Dmrt2	Dmrt3	Dmrt4	Dmrt5	Dsx	DX
CNIDARIA		P (1)					P (3)
PLATYHELMINTHES		♂ (3)			♂ (1)		♂ (8)
NEMATODA					P (2)		♂ (15)
ARTHROPODA							
Hexapoda		P (2)		P (3)		P (58)	P (3)
Crustacea		P (1)		P (2)		P (4)	P (2)
Chelicerata						P (1)	
ROTIFERA				P (1)			
ECHINODERMATA				P (1)			P (1)
ANNELIDA				P (1)			P (1)
MOLLUSCA		♂ (1)		♂(2)	♂ (1)		♂ (1)
HEMICHORDATA		P (1)		P (1)			P (1)
CHORDATA							
Tunicate		P (1)			P (1)		
Cartilaginous fishes		P (1)			P (1)		
Bony fishes	♂ (38)	♂ = ♀ (6)	♂ (4)	♂ = ♀ (4)	♂ = ♀ (5)		
Amphibia (Anura)	♂/♀ (14)	♂ (7)	♂ (10)	P (2)	♂ = ♀ (4)		
Amphibia (Caudata)	♂ (1)	P (1)					
Archosauria (Crocodiles)	♂ (1)						
Archosauria (Birds)	♂ (1)	NS (2)	NS (1)				
Testudines (Turtles)	♂ (2)						
Lepidosauria (lizards)	♂ (1)		P (2)	P (1)	P (1)		
Lepidosauria (snakes)	P (2)						

♂: higher expression in male than in female; ♂ = ♀: similar expression in male and in female; NS: No expression linked to sexual development; P: presence of DM sequences in the phylum but sex specific expression not tested.

Platyhelminth [95]. Second, studies on successive hermaphroditic organisms are also of great interest sexes of some animals that possess unusual sex-determining systems, such Rana rugosa, which possesses either XX/XY or ZZ/ZW sex chromosomes.

The analysis of Dmrt genes in the chicken has been important because in this model organism, sexual development is governed not only by the absolute gene expression, but also the relative dose between males and females at a given developmental stage. The balance between male and female expression needs to be studied in greater detail in future studies. To date, DM-W from Xenopus laevis is the only known female-determining gene among the Dmrt genes. Indeed, the roles of Dmrt genes appear to be highly biased toward male development (see Table 4). However, additional studies are warranted to assess the spatial and temporal expression patterns of the Dmrt genes in species with female heterogametic systems.

Although we herein focused on the roles of Dmrt genes in sexual development, this gene family is also known to play a pivotal in neurogenesis. Our conclusion is, even if Dmrt genes play an important role in sex determining/ differentiation mechanisms, no clear picture emerged. Relatively fewer studies (in fewer species) have examined the role of Dmrt genes in neurogenesis, but a review similar to this one could be warranted in the context of neurogenesis.

Finally, DM domain-genes are known to be the sex-determining genes in five very distinct species: the planarian, Schmidtea mediterranea; the crustacean, Daphnia magna; the fish, Oryzias latipes; the African clawed frog, Xenopus laevis; and the bird, Gallus gallus. Considering that DM domain-containing genes play such a fundamental role in individual development and species-level maintenance, it seems odd that this factor is not found in species that are very closely related to those listed above. For example, DM-Y (a paralog of Dmrt1) is absent from the genomes of some species related to Oryzias latipes (e.g., Oryzias celebensis and Oryzias mekongensis), while DM-W is absent from the genomes of some species related to Xenopus laevis (e.g., Xenopus borealis).

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

This work was supported by the region Languedoc Roussillon (Programme ''Chercheur d'avenir''). The authors would like to thank Anne Modat for preparing the bibliography.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at: http://dx.doi.org/10.1016/j. crvi.2015.04.010.

References

[1] P.E. Hildreth, Doublesex, recessive gene that transforms both males and females of Drosophila intointersexes, Genetics 51(1965)659–678.

[2] K.C. Burtis, B.S. Baker, Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation byproducingalternativelysplicedmRNAsencoding relatedsex-specificpolypeptides, Cell 56(6)(1989)997–1010.

[3] S.E. Erdman, K.C. Burtis, The Drosophila doublesex proteins share a novel zinc finger relatedDNAbindingdomain, EMBOJ.12(2)(1993) 527–535.

[4] L.Zhu, J.Wilken, N.B.Phillips, U.Narendra, G.Chan, S.M.Stratton, etal., Sexualdimorphism indiversemetazoansisregulatedbyanovelclass ofintertwinedzincfingers, GenesDev. 14 (14)(2000)1750–1764.

[5] J.R.Wexler, D.C.Plachetzki, A.Kopp, Pan-metazoanphylogenyofthe DMRTgenefamily: a frameworkforfunctionalstudies, Dev.Genes Evol.224(3)(2014)175–181.

[6] J.-N.Volff, D.Zarkower, V.J.Bardwell, M.Schartl, Evolutionarydynamicsoftheadmdomain genefamilyinmetazoans, J.Mol.Evol.57(2003) S241–S249.

[7] T. Chong, J.J. Collins 3rd., J.L. Brubacher, D. Zarkower, P.A. Newmark, A sex-specific transcription factor controls male identity in a simultaneous hermaphrodite, Nat. Commun.4(2013)p1814.

[8] M. Matsuda, A. Shinomiya, M. Kinoshita, A. Suzuki, T. Kobayashi, B. Paul-Prasanth, et al., DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish, Proc. Natl. Acad.Sci.USA104(10) (2007)3865–3870.

[9] S. Yoshimoto, E. Okada, H. Umemoto, K. Tamura, Y. Uno, C. NishidaUmehara, et al., A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in Xenopus laevis, Proc.Natl.Acad.Sci. USA105(7)(2008)2469–2474.

[10] C.A. Smith, K.N. Roeszler, T. Ohnesorg, D.M. Cummins, P.G. Farlie, T.J. Doran, et al., The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken, Nature 461(2009)267–271.

[11] Y. Kato, K. Kobayashi, H. Watanabe, T. Iguchi, Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean Daphnia magna: Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-DeterminingPathway, PlosGen.7(3)(2011)pe1001345.

[12] C.K. Matson, M.W. Murphy, M.D. Griswold, S. Yoshida, V.J. Bardwell, D. Zarkower, The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosisversusmeiosisdecisionin malegermcells, Dev.Cell19(4)(2010)612–624.

[13] A. Herpin, M. Schartl, Sex determination: switch and suppress, Curr. Biol. 21 (17) (2013) R656–R659.

[14] A. Herpin, M. Schartl, Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexualdevelopmentfactorsinfish, FEBSJ.278(2011) 1010–1019.

[15] C.-S. Hong, B.-Y. Park, J.-P. Saint-Jeannet, The function of Dmrt genes in vertebrate development: It is not just aboutsex, Dev. Biol.310 (2007) 1–9. [16] D. Zarkower, DMRT genesinvertebrategametogenesis, Curr.Top.Dev. Biol.102(2013)327–356.

[17] C.K. Matson, D. Zarkower, Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolutionandplasticity, Nat.Rev.Gen.13(3) (2013)163–174.

[18] A. Kopp, Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism, Trends Genet28(4)(2012)175–184.

[19] S.W. Miller, D.C. Hayward, T.A. Bunch, D.J. Miller, E.E. Ball, V.J. Bardwell, et al., A DM domain protein from a coral, Acropora millepora, homologous to proteins important for sex determination, Evol. Dev. 5 (3) (2003) 251–258.

[20] A. Stenyakina, L.J. Walters, E.A. Hoffman, C. Calestani, Food availability and sex reversal in Mytella charruana, an introduced bivalve in the southeastern United States, Mol. Reprod. Dev. 77(3) (2010) 222–230.

[21] F.F. Yu, M.-F. Wang, L. Zhou, J.F. Gui, X.Y. Yu, Molecular cloning and expression characterization of Dmrt2 in akoya pearl oysters, Pinctada martensii, J. Shellfish Res. 30(2) (2011) 247–254.

[22] J.N. Shukla, J. Nagaraju, Doublesex: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators, J. Genet. 89(3) (2013) 341–356.

[23] S. Zanetti, A. Puoti, Sex determination in the Caenorhabditis elegans germline, Adv. Exp. Med. Biol. 757 (2013) 41–69.

[24] M.M. Shen, J. Hodgkin, mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in C. elegans, Cell 54 (1988) 1019–1031.

[25] W. Yi, D. Zarkower, Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by Caenorhabditis elegans MAB-3 and Drosophila melanogaster DSX suggests conservation of sex determining mechanisms, Development 126 (1999) 873–881.

[26] J.M. Ross, A.K. Kalis, M.W. Murphy, D. Zarkower, The DM Domain Protein MAB-3 Promotes Sex-Specific Neurogenesis in C. elegans by Regulating bHLH Proteins, Dev. Cell 8 (2005) 881–892.

[27] W. Yi, J.M. Ross, D. Zarkower, mab-3 is a direct tra-1 target gene regulating diverse aspects of C. elegans male sexual development and behavior, Development 127 (2000) 4469–4480.

[28] M.S. Siehr, P.K. Koo, A.L. Sherlekar, X. Bian, M.R. Bunkers, R.M. Miller, et al., Multiple doublesex-Related Genes Specify Critical Cell Fates in a C. elegans Male Neural Circuit, PlosOne 6(11) (2011) pe26811.

[29] R. Lints, S.W. Emmons, Regulation of sex-specific differentiation and mating behavior in C. elegans by a new member of the DM domain transcription factor family, Genes Dev. 16 (2002) 2390–2402.

[30] H. Inoue, E. Nishida, The DM Domain Transcription Factor MAB-3 Regulates Male Hypersensitivity to Oxidative Stress in Caenorhabditis elegans, Mol. Cell. Biol. 30 (14) (2010) 3453–3459.

[31] D. Adam Mason, J.S. Rabinowitz, D.S. Portman, dmd-3, a doublesex related gene regulated by tra-1, governs sex-specific morphogenesis in C. elegans, Development 135 (2008) 2373–2382.

[32] A.J. Nisbet, P. Geldhof, M. Pellegrino, R.B. Gasser, Characterisation of a DM domain-containing transcription factor from Trichostrongylus vitrinus (Nematoda: Strongylida), Parasitol. Int. 55 (2006) 155–157.

[33] P.A. Cottee, A.J. Nisbet, P.R. Boag, M. Larsen, R.B. Gasser, Characterisation of major sperm protein genes and their expression in Oesophagostomum dentatum (Nematoda: Strongylida), Parasitology 129 (2004) 479–490.

[34] E.C. Verhulst, L. Van De Zande, L.W. Beukeboom, Insect sex determination: it all evolves around transformer, Curr. Opin. Genet. Dev. 20 (2010) 376–383.

[35] J.N. Shukla, J. Nagaraju, Doublesex: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators, J. Genet. 89 (2010) 341–356.

[36] G. Saccone, A. Pane, L.C. Polito, Sex determination in flies, fruitflies and butterflies, Genetica 116 (2002) 15–23.

[37] T.R. Shirangi, M. McKeown, Sex in flies: What "body-mind" dichotomy? Dev. Biol. 306 (2007) 10–19.

[38] K.K. Siwicki, E.A. Kravitz, Fruitless, doublesex and the genetics of social behavior in Drosophila melanogaster, Curr. Opin. Neurobiol. 19 (2009) 200–206.

[39] C.C. Robinett, A.G. Vaughan, J.-M. Knapp, B.S. Baker, Sex and the Single Cell. II. There Is a Time and Place for Sex, PLoS Biol. 8(5) (2010) pe1000365.

[40] Y. Pan, C.C. Robinett, B.S. Baker, Turning Males On: Activation of Male Courtship Behavior in Drosophila melanogaster, PlosOne 6(6) (2011) pe21144.

[41] Y. Kato, K. Kobayashi, S. Shigeto Oda, J.K. Colbourn, N. Tatarazako, H. Watanabe, et al., Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in Daphnia magna, Genomics 91 (2008) 94–101.

[42] E.-F. Zhang, G.-F. Qiu, A novel Dmrt gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, Eriocheir sinensis, Dev. Genes Evol. 220 (2010) 151–159.

[43] M. Nakamura, Sex determination in amphibians, Semin. Cell Develop. Biol. 20(3) (2009) 271–282.

[44] I. Miura, An evolutionary witness: the frog Rana rugosa underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female, Sex. Dev. 1 (6) (2007) 323–331.

[45] N. Sakata, Y. Tamori, M. Wakahara, P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (Hynobius retardatus) gonad, Int. J. Dev. Biol. 49(4) (2005) 417–425.

[46] S. Yoshimoto, E. Okada, T. Oishi, R. Numagami, H. Umemoto, K. Tamura, et al., Expression and promoter analysis of Xenopus DMRT1 and functional characterization of the transactivation property of its protein, Dev. Growth Differ. 48 (2006) 597–603.

[47] N. Osawa, Y. Oshima, M. Nakamura, Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of Xenopus, Zool. Sci. 22(6) (2005) 681–687.

[48] S. Yoshimoto, M. Ito, A ZZ/ZW-type sex determination in Xenopus laevis, FEBS J. 278 (7) (2013) 1020–1026.

[49] K. Shibata, M. Takase, M. Nakamura, The Dmrt1 expression in sexreversed gonads of amphibians, Gen. Comp. Endocrinol. 127 (2002) 232–241.

[50] S. Aoyama, K. Shibata, S. Tokunaga, M. Takase, K. Matsui, M. Nakamura, Expression of Dmrt1 protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians, Cytogenet. Genome Res. 101 (2003) 295–301.

[51] Y. Matsushita, Y. Oshima, M. Nakamura, Expression of DMRT genes in the gonads of Rana rugosa during sex determination, Zool. Sci. 24 (2007) 95–99.

[52] T. Capriglione, M.C. Vaccaro, M.A. Morescalchi, S. Tammaro, S. De Lorio, Differential DMRT1 expression in the gonads of Podarcis sicula (Reptilia: Lacertidae), Sex. Dev. 4 (2009) 104–109.

[53] F.D. Brown, E.M. del Pino, G. Krohne, Bidder's organ in the toad Bufo marinus: effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamina-associated polypeptide 2, Dev. Growth Diff. 44(6) (2002) 527–535.

[54] J. Abramyan, C.-W. Feng, P. Koopman, Cloning and Expression of Candidate Sexual Development Genes in the Cane Toad (Bufo marinus), Dev. Dyn. 238 (2009) 2430–2441.

[55] N. Sakata, K. Miyazaki, M. Wakahara, Up-regulation of P450arom and down-regulation of Dmrt-1 genes in the temperature-dependent sex reversal from genetic males to phenotypic females in salamander, Dev. Genes Evol. 216 (2006) 224–228.

[56] C.L. Organ, D.E. Janes, Evolution of sex chromosomes in Sauropsida, Int. Comp. Biol. 48(4) (2008) 512–519.

[57] C. Shoemaker, M. Ramsey, J. Queen, D. Crews, Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the Gonad of a Species With Temperature-Dependent Sex Determination, Dev. Dyn. 236 (2007) 1055–1063.

[58] C.M. Shoemaker, J. Queen, D. Crews, Response of Candidate Sex Determining Genes to Changes in Temperature Reveals Their Involvement in the Molecular Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination, Mol. Endocrinol. 21 (11) (2007) 2750–2763.

[59] C. Murdock, T. Wibbels, Dmrt1 expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination, J. Exp. Zool. Part B: Mol. Dev. Evol. 306 (2) (2006) 134–139.

[60] J.R. Kettlewell, C.S. Raymond, D. Zarkower, Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation, Genesis 26 (3) (2000) 174–178.

[61] C. Murdock, T. Wibbels, Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination, Cytogen. Genome Res. 101(3–4) (2003) 302–308.

[62] L.C. Torres Maldonado, A. Landa Piedra, N. Moreno Mendoza, A. Marmolejo Valencia, A. Meza Martinez, H. Merchant Larios, Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle Lepidochelys olivacea, Gen. Comp. Endocrinol. 129 (2002) 20–26.

[63] T. Rhen, K. Metzger, A. Schroeder, R. Woodward, Expression of putative sex-determining genes during the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, Chelydra serpentina, Sex. Dev. 1(4) (2007) 255–270.

[64] H. Hoshi, A. Nakao, Molecular Cloning of Full-Length Dmrt1 cDNA of Reeves Turtle (Chinemys reevesii), J. Vet. Med. Sci. 70(7) (2008) 687–692.

[65] L. Ren, H. Cheng, Y. Guo, X. Huang, L. Liu, R. Zhou, Evolutionary conservation of Dmrt gene family in amphibians, reptiles and birds, Chin. Sci. Bull. 46(23) (2001) 1992–1994.

[66] A. Anand, M. Patel, A. Lalremruata, A. Pratap Singh, R. Agrawal, L. Singh, et al., Multiple alternative splicing of Dmrt1 during gonadogenesis in Indian mugger, a species exhibiting temperature-dependent sex determination, Gene 425 (2008) 56–63.

[67] S. Ganesh, J. Mohanty, R. Raman, Male-biased distribution of the human Y chromosomal genes SRY and ZFY in the lizard Calotes versicolor, which lacks sex chromosomes and temperature-dependent sex determination, Chromosome Res. 5(6) (1999) 413–419.

[68] S. Ganesh, B. Choudhary, R. Raman, Temporal difference between testis and ovary determinations with possible involvement of testosterone and aromatase in gonadal differentiation in TSD lacking lizard, Calotes versicolor, J. Exp. Zool. 283 (6) (1999) 600–607.

[69] K. Sreenivasulu, S. Ganesh, R. Raman, Evolutionarily conserved, DMRT1, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, Calotes versicolor, Mech. Dev. 119S (2002) S55–S64.

[70] A. Herpin, M. Schartl, Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: insights from the medaka fish (Oryzias latipes), Mol. Cell. Endocrinol. 306 (2009) 51–58.

[71] M. Matsuda, Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda, T. Kobayashi, et al., DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish, Nature 417 (6888) (2002) 559–563.

[72] M. Kondo, U. Hornung, I. Nanda, S. Imai, T. Sasaki, A. Shimizu, et al., Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka, Genome Res. 16(7) (2006) 815–826.

[73] B. Paul-Prasanth, M. Matsuda, E.-L. Lau, A. Suzuki, F. Sakai, T. Kobayashi, et al., Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, Oryzias latipes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 351 (2006) 815–819.

[74] Y. Kikuchi, S. Hamaguchi, Novel Sex-Determining Genes in Fish and Sex Chromosome Evolution, Dev. Dyn. 242 (2013) 339–353.

[75] M. Kondo, I. Nanda, U. Hornung, S. Asakawa, N. Shimizu, H. Mitani, et al., Absence of the Candidate Male Sex-Determining Gene dmrt1b(Y) of Medaka from Other Fish Species, Curr. Biol. 13 (2003) 416–420.

[76] J.-N. Volff, M. Kondo, M. Schartl, Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish, Trends Genet. 19 (4) (2003) 196–199.

[77] H. Johnsen, O. Andersen, Sex dimorphic expression of five dmrt genes identified in the Atlantic cod genome. The fish-specific dmrt2b diverged from dmrt2a before the fish whole-genome duplication, Gene 505 (2012) 221–232.

[78] A. Yoshizawa, Y. Nakahara, T. Izawa, T. Ishitani, M. Tsutsumi, A. Kuroiwa, et al., Zebrafish Dmrta2 regulates neurogenesis in the telencephalon, Genes Cells 16(2011) 1097–1109.
[79] R. Lourenc¸o, S.S. Lopes, L. Saude, Left-Right Function of dmrt2 Genes Is Not Conserved between Zebrafish and Mouse, PlosOne 5(12)(2010) pe14438.
[80] C. Winkler, U. Hornung, M. Kondo, C. Neuner, J. Duschl, A. Shima, et al., Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal dmrt genes in embryos of the Medaka fish (Oryzias latipes), Mech. Dev. 121(2004) 997–1005.
[81] Q. Li, X. Zhou, Y. Guo, X. Shang, H. Chen, H. Lu, et al., Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish Dmrt3, Biol. Cell 100 (2008) 453–463.
[82] A. Yamaguchi, K. Hoon Lee, H. Fujimoto, K. Kadomura, S. Yasumoto, M. Matsuyama, Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish Takifugu rubripes, Comp. Biochem. Physiol., Part D 1(2006) 59–68.
[83] J. Cao, J. Chen, T. Wu, X. Gan, Y. Luo, Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DMRT4 gene in Oreochromis aureus, Mol. Biol. Rep. 37(2010) 2781–2788.
[84] A. Wen, F. You, X. Tan, P. Sun, J. Ni, Y. Zhang, et al., Expression pattern of dmrt4 from olive flounder (Paralichthys olivaceus) in adult gonads and during embryogenesis, Fish Physiol. Biochem. 35(3)(2009) 421–433.
[85] J. Cao, Z. Cao, T. Wu, Generation of Antibodies Against DMRT1 and DMRT4 of Oreochromis aurea and Analysis of Their Expression Profile in Oreochromis aurea Tissues, J. Genet. Genomics 34(6)(2007) 497–509.
[86] C.S. Raymond, J.R. Kettlewell, B. Hirsch, V.J. Bardwell, D. Zarkower, Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development, Dev. Biol. 215(1999) 208–220.
[87] H. Ellegren, Sex determination: two copies for one cock, Curr. Biol. 19 (19) (2009) R909–R910.
[88] J.A. Marshall Graves, Birds do it with a Z gene, Nature 461(2009) 177–178.
[89] I. Yamamoto, A. Tsukada, N. Saito, K. Shimada, Profiles of mRNA Expression of Genes Related to Sex Differentiation of the Gonads in the Chicken Embryo, Poult. Sci. 82 (9) (2003) 1462–1467.
[90] C.A. Smith, A.H. Sinclair, Sex determination in the chicken embryo, J. Exp. Zool. 290 (7) (2001) 691–699.
[91] L. Saude, R. Lourenc¸o, A. Gonc¸alves, I. Palmeirim, terra is a left–right asymmetry gene required for left–right synchronization of the segmentation clock, Nat. Cell Biol. 7 (9) (2005) 818–820.
[92] C.A. Smith, T.M. Hurley, P.J. McClive, A.H. Sinclair, Restricted expression of DMRT3 in chicken and mouse embryos, Mech. Dev. 119S(2002) D73–S76.
[93] C.A. Smith, P.J. McClive, P.S. Western, K.J. Reed, A.H. Sinclair, Conservation of a sex-determining gene, Nature 402(6762)(1999) 601–602.
[94] W. Zhang, B. Li, R. Singh, U. Narendra, L. Zhu, M.A. Weiss, Regulation of sexual dimorphism: mutational and chemogenetic analysis of the doublesex DM domain, Mol. Cell. Biol. 26(2)(2006) 535–547.
[95] J.-M. Lepesant, C. Cosseau, J. Boissier, M. Freitag, J. Portela, D. Climent, et al., Chromatin structural changes around satellite repeats on the female sex chromosome in Schistosoma mansoni and their possible role in sex chromosome emergence, Genome Biol. 13(2)(2012) R14.
[96] A. Naimi, A.-S. Martinez, M.-L. Specq, A. Mrac, B. Diss, M. Mathieu, et al., Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster Crassostrea gigas, Comp. Biochem. Physiol. Part A 152(2009) 189–196.
[97] Z.F. Zhang, Z.F. Feng, M.Y. Shao, Cloning, characterization and expression analysis of Cf-dmrt4-like gene in Chlamys farreri, Zhongguo Shui Chan Ke Xue (J. Fishery Sci. China) 17(5) (2010) 930–940.
[98] S. Klinbunga, P. Amparyup, B. Khamnamtong, I. Hirono, T. Aoki, P. Jarayabhand, Isolation and Characterization of Testis-Specific DMRT1 in the Tropical Abalone (Haliotis asinina), Biochem. Genet. 47(2009) 66–79.
[99] A.M. Veith, M. Scha¨fer, N. Klu¨ver, C. Schultheis, M. Schartl, C. Winkler, et al., Tissue-specific expression of dmrt genes in embryos and adults of the platyfish Xiphophorus maculatus, Zebrafish 3(3)(2006) 325–337.
[100] M. Kondo, A. Froschauer, A. Kitano, I. Nanda, U. Hornung, J.-N. Volff, et al., Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka Oryzias latipes and the platyfish Xiphophorus maculatus, Gene 295(2002) 213–222.
[101] B. Brunner, U. Hornung, Z. Shan, I. Nanda, M. Kondo, E. Zend-Ajusch, et al., Genomic Organization and Expression of the Doublesex-Related Gene Cluster in Vertebrates and Detection of Putative Regulatory Regions for DMRT1, Genomics 77(1/2)(2001) 8–17.
[102] A. Wen, F. You, X. Tan, P. Sun, J. Ni, Y. Zhang, et al., Expression pattern of dmrt4 from olive flounder (Paralichthys olivaceus) in adult gonads and during embryogenesis, Fish Physiol. Biochem. 35(2009) 421–433.
[103] Y. Guo, Q. Li, S. Gao, X. Zhou, Y. He, X. Shang, et al., Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of Dmrt5 of zebrafish, Biochem. Biophys. Res. Commun. 324(2004) 569–575.

Atypical female-biased expression pattern of *DMRT* genes through *in vivo* developmental stages of *Schistosoma mansoni*.

Ce travail fera prochainement l'objet d'une publication.

Authors

Marion Picard[1], Céline Cosseau[1], Judith R. Wexler[2], David Duval[1], Christoph Grunau[1], Eve Toulza[1], Jean François Allienne[1], Nathalie Arancibia[1], André Théron[1], Jérôme Boissier[1]*

[1]Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

[2]Center for Population Biology, Department of Evolution and Ecology, University of California, One Shields Ave, Davis, CA, 95616, USA

** Corresponding Author: boissier@univ-perp.fr*

Keywords

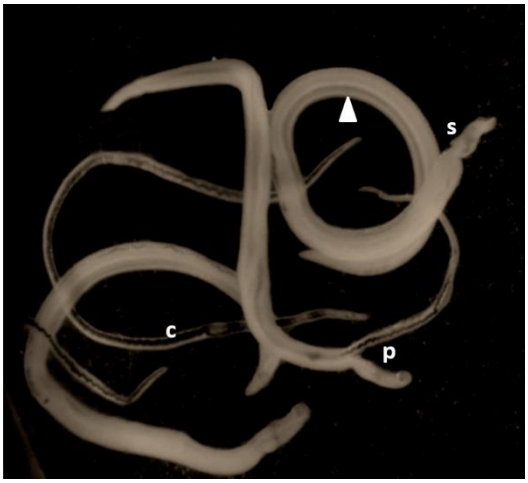
DMRT genes, gene expression pattern, *Schistosoma mansoni*, Female heterogametic species, Male *vs* female parasites *in vivo* development.

Abstract

DMRT (double-sex and male-abnormal-3 related transcription factors) genes are intensively studied because of their implication in the sex determination/differentiation pathways through all the animal kingdom. These genes have a pivotal role in sex identity of gonochoric species (*i.e.* displaying separate sexes), and seem particularly involved in male sex determination of vertebrate female heterogametic systems (*i.e.* ZZ males and ZW females) like chicken or medaka fish. We propose here to address their status in a non-vertebrate female heterogametic species: the human parasite *Schistosoma mansoni*. Reproductive biology of schistosomes is of particular interest for human health because the parasite eggs cause a chronic inflammation and are responsible of the second parasitic disease worldwide after malaria. Besides, it is an evolutionary puzzle because only hundred *Schistosomatidae* species are gonochoric parasites among 20.000 classical hermaphroditic trematodes. *S. mansoni* possess a complex life cycle with three undifferentiated larval stages, and separate sexes appear only in the vertebrate definitive host. Mechanisms triggering this late sexual differentiation remain unclear. We performed a targeted transcriptomic study of the four *DMRT* genes of *S. mansoni*, through five developmental stages of the parasite. We introduce here an unprecedented study of *in vivo* development in a sex-specific way, and report (i) developmental asynchrony between male and female individuals, and (ii) a female-associated expression of *DMRT* genes during sex dimorphism establishment following by a male-bias of *Sm_dmd1* transcription in adults. We thus can predict a conserved role in sex determination and maintenance of *DMRT* genes in this invertebrate species. Further detailed functional analyses are needed to precise their part in *Schistosoma mansoni* reproductive biology and thus potentially provide new drug targets.

Introduction

Schistosomes are unique among digeneans because they possess male and female separated sexes (*i.e.* gonochoric species). This mystery has puzzled scientific for several years (Short 1983; Basch 1990; Read and Nee 1990; Combes 1991; Despres and Maurice 1995; Morand and Müller-Graf 2000; Loker and Brant 2006; Beltran and Boissier 2008a). It is now established that these parasites have changed from hermaphroditic to gonochoric reproductive status concomitantly to the invasion of warm-blooded hosts (birds or mammals) (Platt and Brooks 1997; Loker and Brant 2006). The acquisition of gonochorism, and thus obligatory allo-fertilization, is supposed to provide genetic benefices to fight against the sophisticated immune system of the warm-blooded animals. In the meantime to the separation of sexes, a sexual dimorphism appeared: male are muscular, possess a strong ventral sucker and a ventral groove, while females are thin with a small ventral sucker (Picture 1). This sexual dimorphism has been explained by the adaptation of the parasite couples to their habitat: they leave in the hepatic portal system, a nutrient rich environment but with high blood pressure. The "separation of the domestic task" hypothesis suggests that the role of the large male is to resist against the blood flow while the role of the fine female is to insinuate into the adjacent mesenteric venules to deposit their eggs (Read and Nee 1990; Loker and Brant 2006).



Picture 1. Sexual dimorphism in* Schistosoma mansoni *adult worms.
Three muscular males displaying a gynaecophoric canal (arrow) and a developped ventral sucker (s), and three thin females with pronouced black caeca. Two individuals are paired (p).

Schistosomes possess a chromosomal sex-determination system based on Z and W sex chromosomes (*i.e.* female heterogametic system). Thus, sex of the individuals is determined at the time of fertilization (*i.e.* syngamic sex-determination): ZZ zygotes will became male worms whereas ZW ones will develop into females. Schistosome parasites have a complex lifecycle and, by definition, sexual reproduction occurs in the vertebrate host. Then, the eggs are released in freshwater through the feces and either potential-males ZZ or females ZW miracidia hatch out. These free living larvae infest the intermediate mollusk host (*Biomphalaria* species) and transform into sporocysts that clonally reproduce. This intense asexual multiplication leads to male or female clonal population of thousands of cercariae that are released in water. This second free larval stage actively seeks for the vertebrate definitive host. Through all of these aquatic stages no morphological differences exist between sexes, only variations in some life history traits (Boissier et al. 1999). The sexual dimorphism only appears in the vertebrate definitive host. During the epidermis active penetration, cercariae lose their tails and transform into obligatory parasites named schistosomula. These schistosomula migrate in the host vascular system to the liver in five to six weeks, where they achieve their development into adult dimorphic worms (Wilson et al. 1986; Faust and Hoffman 1934). Studies conducted on precise steps of the schistosomula migration have reported that males and females equally penetrate skin and reach the liver (Rowntree and James 1977) but that differences appear at the time of sexual differentiation and could lead to the adult male-biased *sex-ratio* (Beltran and Boissier 2010; Morand and Müller-Graf 2000). Sexual differentiation has a particular status in *S. mansoni* because while somatic sexual differentiation (*i.e.* sexual dimorphism) seems to

spontaneously appear, gonadic sexual maturation unavoidably needs males and females pairing (Siegel and Tracy 1988; Haseeb et al. 1989; Kunz 2001; Fitzpatrick and Hoffmann 2006; LoVerde et al. 2009; Leutner et al. 2013). Several molecular analyses have identified male or female specific pathways essential for the parasite sexual maturation (Vanderstraete et al. 2014; Beckmann et al. 2012; Dissous et al. 2011; Long et al. 2010; Long et al. 2012; Beckmann et al. 2010; Fitzpatrick et al. 2007; Hahnel et al. 2014). Nevertheless, no pivotal genes of sex determination inducing the first events of sexual differentiation have been (transcriptionally) identified so far in *S. mansoni*.

Molecular players of sex determination and/or differentiation pathways are conserved through all the animal kingdom (Bachtrog et al. 2014). Among them, *DMRT* (double-sex and male-abnormal-3 related transcription factors) genes are conserved as well as in bilaterian than in non-bilaterian animals (Wexler et al. 2014). In bilaterian, these genes were shown to be involved in either sex determination (Matsuda et al. 2002; Yoshimoto et al. 2008; Smith et al. 2009; Chong et al. 2013) or sex differentiation (Herpin and Schartl 2011; Kopp 2012; Matson and Zarkower 2012; Zarkower 2013; Picard et al. 2015). In non-bilaterian, a recent study shown their sex-specific expression in one sea anemone (Traylor-Knowles et al. 2015). *DMRT* genes are characterized by an unusual intertwined zinc-finger motif called DM domain (Erdman and Burtis 1993; Zhu et al. 2000) displaying six cysteines and two histidines. The other residus of this DM domain are more variable but they nonetheless could be sorted in consensus sequences, which are characteristic of each *DMRT* family members (Picard et al. 2015). *Schistosoma mansoni* displays four *DMRT* genes (http://parasite.wormbase.org): Smp_143190 (*Sm_dmd1*) and Smp_138230 (*Sm_dmd2*) are respectively located on the fourth and the third chromosomes, while Smp_163870 (*Sm_dmd3*) and Smp_132060 (*Sm_dmd4*) are pseudoautosomal genes. A previous study highlight the upregulation of *Sm_dmd1* in male relative to female adult worms (Chong et al. 2013).

In this work, we present a comparative kinetic of intra-vertebrate *Schistosoma mansoni* development between males and females. Development is assessed thanks to three different classes of schistosomula stages: sorting criteria are based on caecum shape, acetabulum location and gynecophoric canal appearance in male (Figure 1). Secondly, we analyze the transcription (*i.e.* quantitative PCR experiment) of the four *Schistosoma mansoni DMRT* genes. Finally we perform a phylogenetic analysis to infer phylogenetic relationships of these four *DMRT* genes among a broad range of species.

Material and methods

Animal breeding and ethics statement.

Housing, feeding and animal care followed the national ethical standards established in the writ of February 1st, 2013 (NOR: AGRG1238753A). The French *Ministère de l'Agriculture et de la Pêche* and the French *Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie* provided permit A66040 to our laboratory for experiments on animals and certificate for animal experimentation for the experimenters (authorization 007083, decree 87–848).

Mouse infection and parasite recovery.

The host parasite system used in this study was the human Guadeloupean strain of *Schistosoma mansoni* SmGH2, its sympatric intermediate host strain BgGua of the mollusk *Biomphalaria glabrata,* and a Swiss OF1 mouse strain (Charles River Laboratories) as definitive vertebrate host. Methods for

molluscs and mice infections as for as parasite recovery were previously described (Dumont et al. 2007; Beltran and Boissier 2008).

In order to obtain unisexual clones of cercariae, monomiracidial infections of mollusks were performed: sexes of the cercarial clones were determined by PCR of repetitive female specific sequences (supplementary file 1) (Portela et al. 2010). Male and female cercariae were axenically and separately recovered from the monomiracidial infected snails 35 days after infection by pipetting from spring water. Then, male and female cercariae were either immediately used for (i) mammalian infestation: each mouse was exposed to 500 cercariae of only one sex; or (ii) treated for subsequent RNA isolation: pool of 5.000 cercariae (+/- 500) were concentrated, after a first step of sedimentation on ice and obscurity for 30 minutes and a second step of cold centrifugation (4°C) at 1,200 G for 10minutes. Concerning schistosomula, individuals of each stage (Figure 1 in results) were isolated and counted under binocular microscope: from 200 to 800 schistosomula per sample (respectively stage 3 and stage 1). Concerning adult worms, each sample contain either 40 males or 100 immature females. Each sample (each sex and each stage) was recovered in triplicate and drily conserved at -80°C before molecular experiments.

Molecular analyses.

Total RNA isolation.

All biological samples were identically treated regardless of the developmental stage: they were grinded in liquid nitrogen until obtaining a homogeneous powder, suspended in 0.5 mL TRIzol and kept 5 minutes at room temperature (RT). Then, 0.1 ml of chloroform was added. The tube was shaken vigorously for 1 min and left at room temperature for 3 min. Then, the separation of phases was obtained by centrifugation at 12.000 G for 15 minutes at 4°C. The upper aqueous phase was transferred to a new RNase-free tube, an equal volume of 70% ethanol was added and the tube was vortexed. PureLink RNA Mini kit (Ambion, 12183020) was used for further purification following the manufacturer's protocol. Total RNA was recovered in 30 µl RNAsecure (Ambion, AM7006), left for 1 min at RT, collected by centrifugation for 1 minute at 8000 rpm at RT and incubated at 65°C for 10 min. To remove remaining DNA, 3 µl of 10X TURBO DNase Buffer (TURBO DNA-free™, Ambion, M1907) were added to 30 µl of total RNA in RNAsecure, followed by 3 µl of TURBO DNase (2 Units/µl). The preparation was gently mixed and incubated at 37°C for 20 minutes. 1 µl of 10X TURBO DNase Buffer and 3 µl of enzyme are added once more and the samples were then incubated for 15 minutes. The reaction was stopped by cooling down on ice for 2 minutes and total RNA was finally purified on a column (RNeasy® mini kit, QIAGEN, 74104) and eluted in 30µl RNase-free water. Quality and concentration were assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer system.

Reverse transcription and quantitative real-time PCR (Polymerase Chain Reaction).

For each sample, first stand cDNA synthesis and qPCR validation experiment were achieved in triplicate. 500ng of the purified total RNA were reverse transcribed using identical concentration (250nmol/l) of random and oligo dT primers of Maxima H Minus Reverse Transcriptase kit (ThermoSCIENTIFIC). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics). We used 2.5µl of cDNA (diluted 1/10 in water) in a total volume of 10µl containing 1× LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) and 500 nmol/l of each primer. The following protocol was used: denaturation, 95°C 10 minutes; amplification and quantification (40 cycles), 95°C for 10 s, 60°C for 5 s, 72°C for 16 s; melting curve, 60 to 95°C with a heating rate of 0.1 C/s and continuous fluorescence measurement, and a cooling step to 40°C.Single product

amplification was checked by capillary migration on a Labchip® GX DNA assay system (PerkinElmer). For each reaction, the crossing point (Cp) was determined using the second derivative maximum method using Light Cycler Software version 3.3 (Roche Diagnostics). For each studied stage, sex, and replicate, the level of transcription was normalized using the mean geometric transcription rate of three reference sequences (Smp_093230, Smp_197220 and Smp_089880) recently published (Primer on Table 1) (B. Wang, Collins, and Newmark 2013). Forward and reverse primers (Eurogentec) were designed with the primer3plus web based interface, the lack of putative primer dimers was checked with Perlprimer (v1.1.21) and the uniqueness of the target was tested with a blast on the genome v5.2. Moreover, a preliminary experiment determined an efficiency 1,9<E for each qPCR reaction. Primer sequences, expected PCR product sizes and efficiencies are listed in Table 1. T-tests were used to compare male *vs* female relative expression ratios.

Table 3. qPCR primers used in this study.

Targets	Primers	Expected product sizes (bp)	Efficiency
Smp_143190 (SmDmd1)		113	2
Forward primer	GGACATGGTATGTCTGAACCAG		
Reverse primer	TGTTGGGCTACTATACGACGAC		
Smp_138230 (SmDmd2)		176	1,9
Forward primer	ACGTAACACTACTCGTTTATCTG		
Reverse primer	GACATCGTCGACAATGTGG		
Smp_163870 (SmDmd3)		157	1,95
Forward primer	TCATTTCGTGTGCCTAAATGT		
Reverse primer	TTAATGCAACTTGTGCAGCC		
Smp_132060 (SmDmd4)		88	1,98
Forward primer	AACAGCCGAAAGTAGTCC		
Reverse primer	AGACAATTCGTCTAGTCGTG		
Smp_093230 (Housekeeping gene)		137	2
Forward primer	GAAGGCTTGGAAGGATTCTG		
Reverse primer	CAACTGCCAACTCTCGGATA		
Smp_197220 (Housekeeping gene)		138	2
Forward primer	ACGTACCTTCGTGGGACTTT		
Reverse primer	TCGTCCAGTCCAAGGTGATA		
Smp_089880 (Housekeeping gene)		73	1,99
Forward primer	TACGGTTTCTCTTCCCAACC		
Reverse primer	CATGGACCTGCTGCATTTAC		

Phylogenetic analysis.

DMRT genes from 19 species, including five representatives from platyhelminthes, were obtained from a BLAST search using nine well-characterized vertebrate and invertebrate *DMRT* genes as bait. Coding-sequences of the four trematoda *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni* and *C. sinensis* were obtained on WormBase ParaSite (http://parasite.wormbase.org/index.html) and their DM domains sequences were obtain blasting the coding-sequences on the NCBI conserved domain database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Domain predictor software from the European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequencesearch) was used to split sequences with multiple DM domains. Sequences were aligned using the –strict setting in the MAFFT alignment algorithm (Katoh et al. 2002). The –trimAl algorithm removed low-scoring regions of the alignment (Capella-Gutiérrez et al. 2009). Upon alignment, sequences which did not contain the CCH-HCC residues characteristic of DM domains were removed. A maximum likelihood tree was made using the RAxML GUI (Silvestro and Michalak 2012) with 500 bootstraps and the best fit model (LG + Gamma) determined by Prottest3.2 (Abascal et al. 2005). We ran MCMC analysis with Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) using the mixed amino acid model and default parameters.

Results

Parasite development.

We recovered schistosomula individuals by hepatic perfusion every day between 20 and 29 days post-infection. Males and females are recovered separately as those are issued from monoclonal infection (*i.e.* unisexual infection) of the definitive host. In spite of the clonality and the same age of all the schistosomula obtained from a unique mouse, we observed a huge asynchronisation between individuals in both male and female clones. This justifies the necessity to collect individuals by morphological characteristics rather than by day post-infection. Therefore, for subsequent molecular analyses, we classified the different schistosomula into three stages according to key morphological characters (Figure 1):

- Schistosomula stage s#1 (from 150 to 400µm): the ventral sucker is situated in the middle of the schistosomula. The gut is in formation. Different steps are distinguished: little spot of hemozoin black pigment above the sucker (1.a); a horseshoe-shaped gut (1.b); a fused gut (1.c). No differences are visible between males and females.
- Schistosomula stage s#2 (from 400 to 1000µm): the ventral sucker is in asymmetric position. The gut is fused. No differences are visible between males and females.
- Schistosomula stage s#3 (from 1 to 5 mm): the ventral sucker is in asymmetric position. The proportion of fused caecum is more important than not fused. Males present the beginning of the gynaecophoral canal development.

During this developmental kinetic, we counted the number of recovered males and females that were assigned to one of these previously described stages. According to our data, we observe that male development is faster than female development (Figure 2A). At 29 days post infection 80% of male have reached the adult stage whereas only 50% of female have reached this stage. We used a khi² statistic to infer the difference in the proportion of each stage (figure 2.D). All points are statistically significant ($p<0.05$) and the difference between male and female increase as the development progress. Despite a differential developmental asynchrony no difference in total number of male and female recovered for the same day post infestation has been observed ($p>0.05$) (Data not shown).

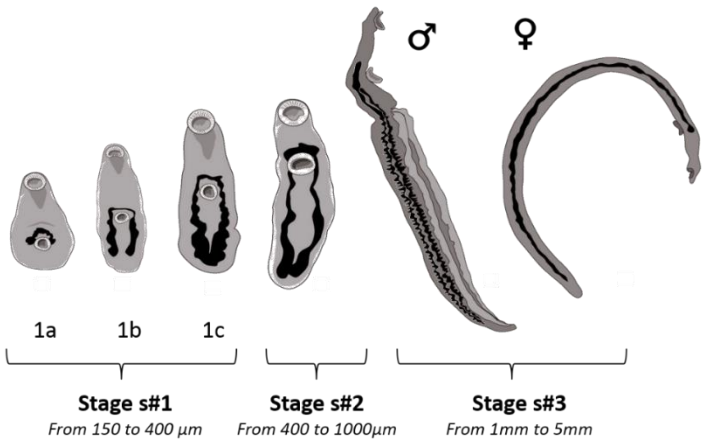


Figure 1. « Schistogram » of the three developmental stages of schistosomula analysed in this study. *Schistosomula stages s#1 and s#2 are phenotypically asexual. Stage s#1 is defined by a symmetric development on both sides of acetabulum (i.e. ventral sucker at midpoint), the caecum can be either non-fused (1a et 1b) or fused (1c). Stage s#2 is characterized by an allometric growth (i.e. top part from the oral sucker to the acetabulum smaller than the lower part of the body). Stage s#3 is marked by loss of the pear-shaped aspect of individuals and sexual dimorphism appearance (i.e. development of gynaecophoric canal in males).*

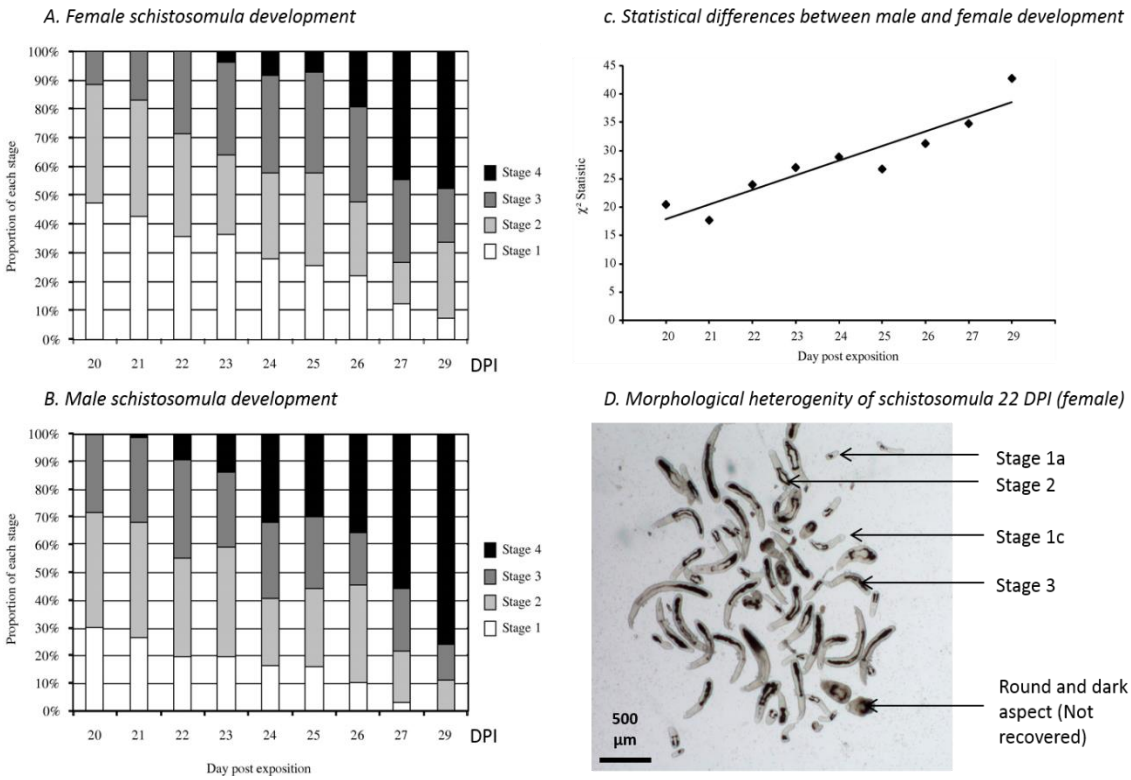


Figure 2. Developmental asynchrony in the schistosomulum stage.
Percentage of each stage in recovered individuals between day 20 and day 29 (A and B) not only show developmental asynchrony between males and females (C) but also between individuals of the same sexe (D). Abbreviation: DPI= Days post infestation

DM domain gene diversity in *Schistosoma mansoni.*

DM domain genes have been shown to be involved in both sex determination and sex differentiation processes from cnidaria (Miller et al. 2003) to mammals (Zarkower 2013). The DM domain consists of six conserved intertwined cysteins and two histidins (site 1 CCHC and sites 2 HCCC), forming a groove for the binding DNA. *S. mansoni* genome displays four *DMRT* genes (*Sm_dmd1* to *Sm_dmd4*). *Sm_dmd1* and *Sm_dmd2* are respectively located on the chromosomes 4 and 3. *Sm_dmd3* and *Sm_dmd4* are located on the pseudoautosomal region of sex-chromosomes (*i.e.* in two copies in both male and female genomes) (Table 2). *Sm_dmd1* and *Sm_dmd2* possess two DM domains while *Sm_dmd3* and *Sm_dmd4* possess only one DM domain. A *DMRT* genes duplication has been previously described in platyhelminthes (Chong et al. 2013). Amino acid alignment of species known to harbor DM genes with two DM domains show that both domains contain the short nuclear localization signal (KGHKR) and the zinc module consisting of intertwined CCHC (site 1) and HCCC (site 2) (Figure 3).

Table 4. Chromosomal location of Schistosoma mansoni DMRT genes.

Gene	DMD1	DMD2	DMD3	DMD4
ID	Smp_143190	Smp_138230	Smp_163870	Smp_132060
Location	Chr_4 from 5.100.657 to 5.131.538	Chr_3 from 18.582.240 to 18.593.940	Chr_W from 58.119.117 to 58.129.105	Chr_W from 32.926.538 to 32.930.515

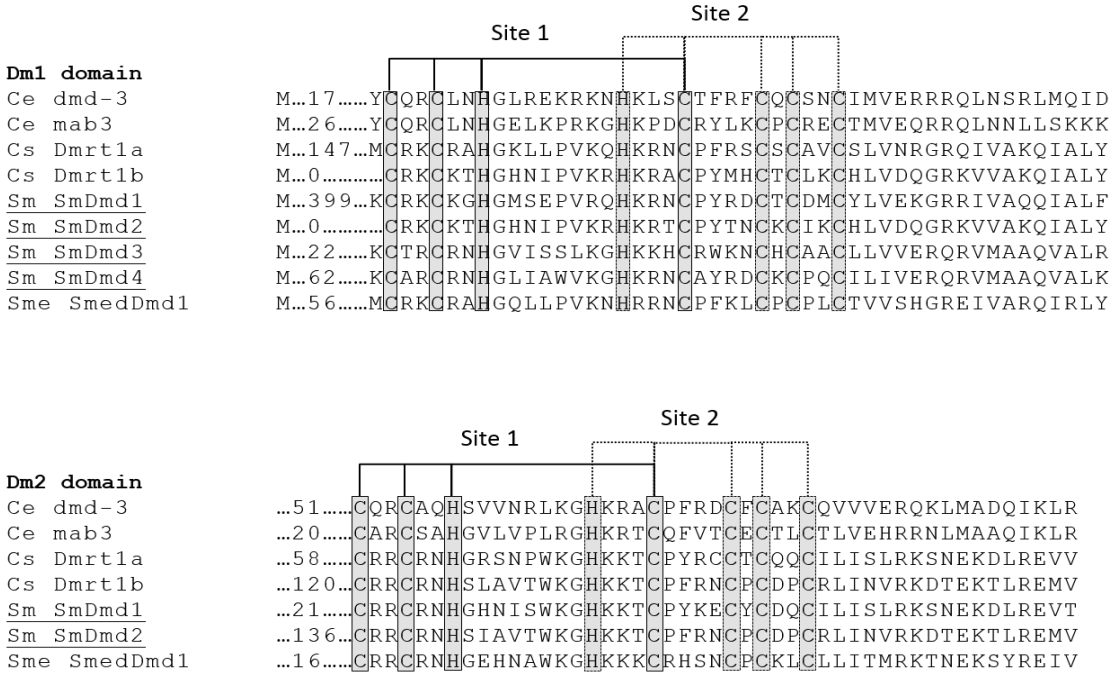


Figure 3. Amino-acid alignment of the* DMRT *genes of* Caenorhabditis elegans *(Ce),* Clonorchis sinensis *(Cs),* Schistosoma mansoni *(Sm) and* Schmidtea mediterranea *(Sme).
Genbank accession number: Ce dmd-3 (O18214), Ce mab3 (Q9XWN9), Cs Dmrt1a (GAA52246), Cs Dmrt1b (GAA34150), Sm SmDmd1 (XM_002575184.1), Sm SmDmd2 (XM_002574366.1), Sm SmDmd3 (XM_002578867.1), Sm SmDmd4 (XM_002573194.1) and Sme SmedDmd1 (KC736555).

Phylogenetic Analyse.

We recovered *Sm_dmd3* and *Sm_dmd4 S. mansoni* genes (that are localized on pseudoautosomal regions of sex chromosomes) as orthologs of the Drosophila *DMRT* genes 11E and 93B, respectively (Figure 4, supplementary file 2). These orthologous groups contain sequences from a broad number of animals – deuterostomes, lophotrochozoans, and ecdyzosoans (Wexler et al. 2014). The two other *S. mansoni* autosomal DMRT genes (*Sm_dmd1* and *Sm_dmd2*) fall into groups with orthologs only from platyhelminthes and nematoda.

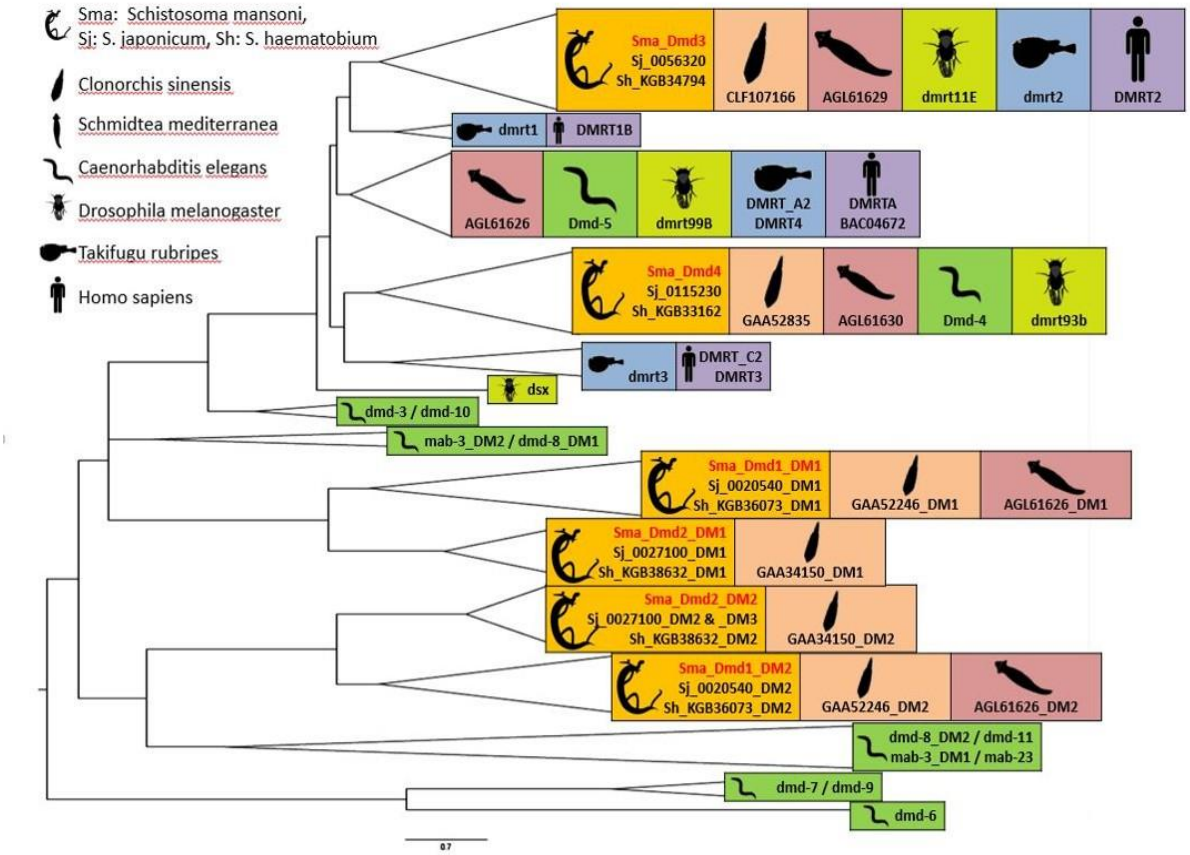


Figure 4. Maximum likelihood tree of DM domains from seven species.
Schistosoma mansoni DMRT *genes and/or DM domains are represented in red letters and orange box.* Sm_dmd3 *and* Sm_dmd4*, wich display only one DM domain are homologs of conserved* DMRT *genes.*
Sm_dmd1 *and* Sm_dmd2*, wich display to DM domains, belong to more specific groups of plathyhelmints.*

Gene expression pattern.

Among the four *DMRT* genes identified in *S. mansoni* genome, three of them show differential male vs female expression patterns (Figure 5). No expression has been detected for *Sm_dmd4* in the studied stages. *Sm_dmd1* (Figure 5.A) male/female relative expression is female biased in cercariae and in all schistosomula stages and is male biased in adults with male expressing four more time the gene than female. This shift is explained by a gradual decrease of the *Sm_dmd1* female expression during the schistosomula differentiation until the adult stage rather than an increase of the expression in male parasite. *Sm_dmd2* (Figure 5.B) male/female relative expression is female biased in schistosomula until adult stages and the ratio gradually increases as the development progress. *Sm_dmd2* female expression is constant whereas its expression in male gradually decreases during the development. *Sm_dmd3* gene (Figure 5.C) is only expressed in female in cercarial stage. Thereafter this gene is predominantly expressed in female schistosomula compare to male schistosomula. The female/male ratio reaches its maximum in schistosomula stage 3 with a fold change of 30 between male and female and this is the result of an increase in *Sm_dmd3* during schistosomula development that occurs concomitantly with a decrease in male expression. In adult stage, the expression of this gene is hardly detected for both males and females.

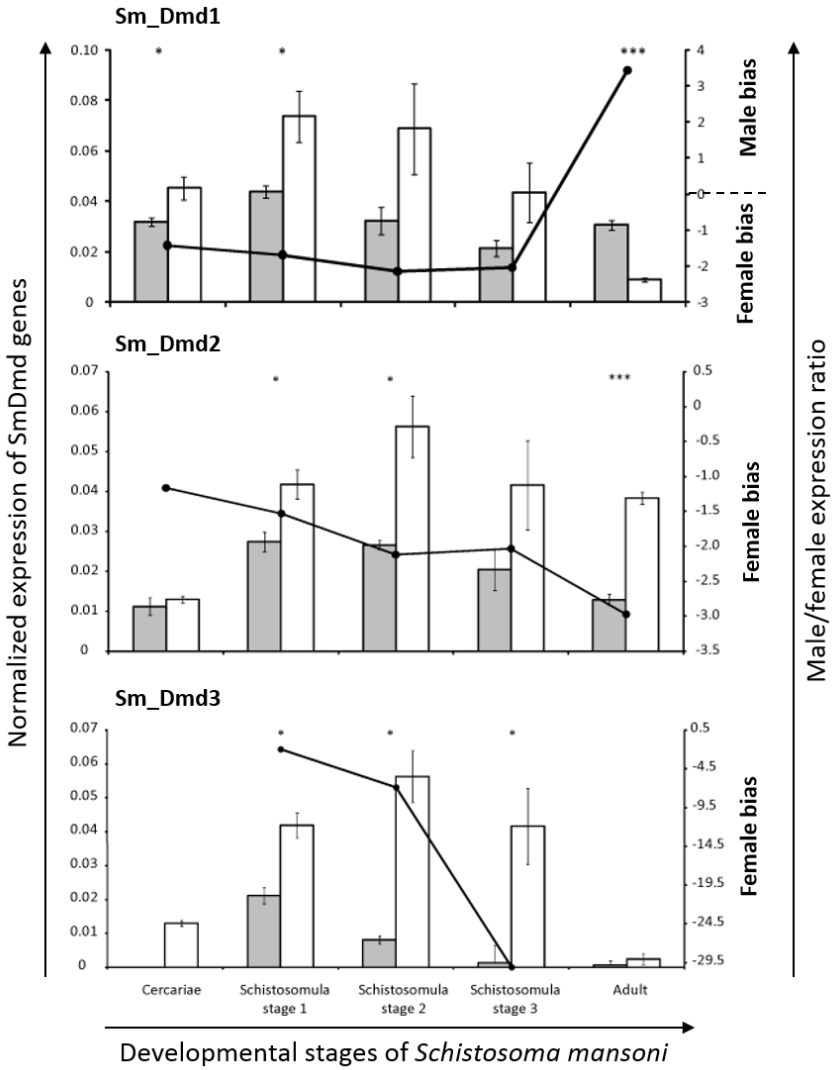


***Figure 5. Male vs female expression of three* DMRT *genes at five different lifecycle stages of* Schistosoma mansoni.** *Grey bar: male expression, White bar: female expression. Plain line represents male/female expression ratio.*

Discussion

Our study confirms differential developmental asynchrony between male and female schistosomes in mice. This developmental asynchrony has been previously reported in both *Schistosoma mansoni* (Barbosa et al. 1978) and *Schistosoma japonicum* (Cort 1921) and whatever the vertebrate host, rodent or monkey (Faust and Hoffman 1934). It has been shown that one important variable in the developmental asynchrony is a density effect: higher is the number of cercariae proposed to infection and faster is the development (Barbosa et al. 1978). In our experiment we have proposed the same number of male or female cercariae to mice (*i.e.* 500) and whatever the delay post infection no difference has been observed in the total number of male *vs* female schistosomula. In previous study on male *vs* female developmental kinetics the same number of male and female was recovered after skin penetration (day 0), after arrival to lung (day 6) and after arrival to liver (day 14) (Rowntree and James 1977). These last authors have shown that significantly more males than females were found at day 28. This difference in development success is at the origin of the male-biased *sex-ratio* observed in adult stage (Boissier and Mone 2000; Boissier et al. 2004; Beltran 2010). According to our result the density effect is not the only variable that can explain the differential asynchrony between males and females. Some early molecular sex-specific factors should be implicated in male *versus* female development differences.

Schistosoma DM gene expression will be discussed in relation to their orthologs in close related taxa. The *Sm_dmd1* and *Sm_dmd2* have only been characterized in platyhelminthes (*Clonorchis sinensis, Schistosoma sp, Schmidtea mediterranea*). Only the ortholog of *Sm_dmd1* has been fully characterized in the planaria (Chong et al. 2013). These last authors precise that using whole-mount *in situ* hybridization among the four *Smed_dmd* genes, only the *Smed_Sm_dmd1* is detected in the planaria reproductive system. Unfortunately, we don't know if the other *Smed_dmd* genes are expressed (in other organs than reproductive system) or not expressed. *Smed_Sm_dmd1* is expressed in testes of sexually immature individuals and in testes, male accessory organs and brain of mature planaria. This dual role of DM domain genes in sexual- and/or neuro-physiology is known in various groups such nematods (Ross et al. 2005), fishes (Yoshizawa et al. 2011), amphibians (Huang et al. 2005) or mammals (Saulnier et al. 2013). Using RNAi experiment it has been shown that *Smed_Sm_dmd1* is required for both male and female development in immature stage but in sexually mature individual the gene is only required for male identity (Chong et al. 2013). In the same study author showed similar results than in the present study concerning *Schistosoma mansoni* adult stage: a male-biased *Sm_dmd1* expression ratio. In *Schistosoma*, like in planaria, we could notice a clear difference in male/female *Sm_dmd1* expression ratio in development stage compared to adult stage. In planaria the difference is explained by the role of male reproductive system in subsequent female reproductive system, consistent with the protandrous status of planaria. In *Schistosoma*, sexes are separated but similar male-female interaction is known. Indeed, females remain sexually immature in absence of the males and become sexually mature only when they are mated. As observed in planaria, the difference in gene expression in *S. mansoni* unpaired worms could be consistent with the monogamous mating system of schistosomes thinking to be an intermediate state between hermaphroditism and polygamy (Beltran and Boissier 2008). No ortholog of *Sm_dmd2* gene has been functionally characterized. The global expression patterns of *Sm_dmd1* and *Sm_dmd2* genes in schistosome suggestsa role in sexual development rather than in sexual determination. Thr differential expression observed in adult compare to larval stage of *Sm_dmd1* or the progressive expression of *Sm_dmd2* do not fit with a gene switch expected in sex determining gene.

The ortholog of *Sm_dmd3* is the *Dmrt11E* gene first identified Drosophila. This gene has been partly functionally characterized in *Drosophila* (Yu et al. 2015), *Rotifera* (Kim et al. 2014) and *Daphnia* (Kato et al. 2008; Kato et al. 2011). It is interesting to notice that like in *Schistosoma* the *Dmrt11E* is female-biased with more expression in ovary than in testis of *Daphnia* (Kato et al. 2008). However, the fact that this gene is not differentially expressed during embryonic development of planaria suggests that it is not involved in sex determination, but rather in the sexual differentiation (Kato et al. 2011). At the opposite, the *Dmrt11E* is a male-associated gene in *Drosophila* because it is necessary for the maintenance in male fertility (*i.e.* in spermatogenesis process) (Yu et al. 2015). In *Rotifera* the role of *Dmrt11E* is not clearly established. It has been evidenced that the transcription level decrease according environmental stressor such UV-B radiation or environmental pollutants leading to growth retardation (Kim et al. 2014). No clear link is established with the sexual biology of the animal. In *Schistosoma* the *Sm_dmd3* pattern fit with a sex determining gene with transient and sex-biased expression during developmental stage, followed by stop in gene expression in adult stage.

To sum up, the three transcriptionally detected *Schistosoma mansoni DMRT* genes (*Sm_dmd1*, *Sm_dmd2* and *Sm_dmd3*) seem to have an enhanced role in females during the developmental stages. The transiently expressed pseudoautosomal gene *Sm_dmd3* could be a pivotal gene of female sex-determination pathway, while *Sm_dmd1* and *Sm_dmd2* could respectively be involved in male and female sexual identity maintenance. Functional validation experiments will help to confirm these hypotheses but it still a technical challenge in the context of a parasitic development.

Acknowledgments

The authors are grateful for technical support providing by Anne Rognon and Bernard Dejean. We thank the "Région Languedoc Roussillon" for financial support to this project (Chercheur d'avenir *Schistosex*).

SUPPLEMENTARY FILES*

SF1: PCR primers for sex genotyping

SF2: Maximum likelihood tree of DM domains from 19 species.

**Not joined, available on demand and in further publication.*

FUNCTIONAL VALIDATION OF *DMRT* GENES IN *SCHISTOSOMA MANSONI*: *Burroughs Wellcome Fund (BWF) schistosome toolbox travel award report.*

Intern: Marion AL. Picard, PhD student

PhD Laboratory: Ecology and Evolution of Interactions Laboratory (2EI), Perpignan University, FRANCE

Host Laboratory and Team: Dr Conor R. Caffrey, Center for Discovery and Innovation in Parasitic diseases (CDIPD), University of California San Francisco (UCSF), USA

Context: *Schistosoma mansoni*, a human bloodfluke with unique sexual features.

Schistosomiasis is the second most prevalent human parasitic disease, affecting more than 200 million people worldwide. This chronic illness is characterized by the damage of internal organs, caused by the eggs of the dioecious bloodflukes of the *Schistosoma* genus. From an evolutionary point of view, among the 18.000 species of classically hermaphroditic trematodes, the hundred species of *Schistosomatidae* are intriguing because they possess separated sexes. In this way, studying the mechanisms underlying sex development, and thus sexual reproduction and egg production, not only presents a strong medical interest but also a fascinating evolutionary biology aspect.

Sex of *S. mansoni* is genetically determined in the zygote at fertilization but sexual dimorphism only appears in adult worms, in the vertebrate definitive host. From a cytogenetic point of view, males are homogametic ZZ and females are heterogametic ZW. The W heterochromosome presents a unique feature: it does not contain any W specific gene but instead, it displays satellite repeat sequences. Moreover, the chromatin structure of these satellite repeat sequences changes through the different stages of parasite [1]. Regarding the Z-chromosome genes expression, a lack of complete dosage compensation mechanism was recently described [2]. These unique sexual features give rise to two issues: where are the determination genes of sex in *S. mansoni*? What are the genetic and/or epigenetic mechanisms that regulate them?

PhD project: Molecular bases of sex determination and sexual differentiation in *S. mansoni.*

The lack of W-specific gene and dosage compensation mechanism lead us to propose that male or female phenotype expression could be due to Z-specific or pseudoautosomal gene determinants, regulated by complex mechanisms such as chromatin structural changes. In order to identify the molecular bases of sex determination, we are applying global approaches that consist in a comparative analysis between the male and female transcriptome (RNA sequencing) and epigenome (Chromatin-ImmunoPrecipitation sequencing). These experiments are being carried out in different stages of the parasite: undifferentiated cercariae, differentiated adult worms, and three intermediary developmental stages of schistosomula. The first assay will allow us the identification molecular

determinants of sex determination, while the objective of the second one is to understand the mechanisms regulating them.

Furthermore, we have investigated the occurrence of potential candidate genes in *S. mansoni* genome involved in sex determination, based on sequence similarity with other characterized genes. Among these, we have identified four *DMRT* (*double-sex and mab-3 related transcription factors*) putative genes in *S. mansoni* (Table1). These *DMRT* genes are known to play a role in sex determination processes in different organisms [3] and two of them are known to be expressed in *in vitro* schistosomula [4]. We have confirmed the expression of three of them: *Smp_143190* (*Sm_dmd1*), *Smp_138230* (*Sm_dmd2*), and *Smp_163870* (*Sm_dmd3)* in *ex vivo* schistosomula (21days post infection). The fourth one *Smp_132060* (*Sm_dmd4*) was not yet transcriptionally detected.

Collaborative project at UCSF: Functional validation of putative molecular sex determinants: *DMRT* genes.

The BWF grant program gave me the opportunity to set up collaboration with Conor R. Caffrey, PhD, and Thavy Long, PhD, at the Center for Discovery and Innovation in Parasitic diseases (CDIPD), wich have an expertise in the RNA interference technique applied to schistosomula [5].

To complete my PhD work, we proposed to validate *dmrt* genes as sex determining genes. To do that, we used RNA interference on *in vitro* schistosomula stage in order to verify whether these genes are essential for their sexual development. Three kinds of experiments were performed: We synthesized double-stranded RNA (dsRNA) targeting *Sm_dmd1*, *Sm_dmd2* and *Sm_dmd4* using T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) (Exon locations: Table 2 / Primers: Tables 3 et 4). Then, we incubated these dsRNA, with (1) *in vitro* newly transformed schistosomula (NTS, Figure 1) or (2) more developed *ex vivo* individuals (25 days post infection, Figure 2). 30µg of dsRNA was added twice a week during six weeks. (3) On another hand, we electroporated NTS in the presence of siRNA targeting *Sm_dmd3* (synthesized by Eurogentec, Primers: Table 5) and the treated NTS are left for two weeks in order to visualize the phenotype (Figure 3). We performed the *Sm_dmd3* silencing experiment with siRNA method because of the very short coding sequence of the gene (249bp, Table1). These experiments where performed in quadruplicate: two replicates were sampled 10 days after the beginning of the experiment in order to test the transcriptional effect on targeted genes. The two remaining replicates are intended for the phenotypic study.

We did not observe any morphological changes, neither for dsRNA/siRNA in *in vitro* nor *ex vivo* expermiments, but the transcriptomic study is currently being performed (qPCR primers: Table 6).

References

[1] Lepesant, J. M., Cosseau, C., Boissier, J., Freitag, M., Portela, J., Climent, D., ... & Grunau, C. (2012). Chromatin structural changes around satellite repeats on the female sex chromosome in Schistosoma mansoni and their possible role in sex chromosome emergence. Genome Biology, 13(2), R14.

[2] Vicoso, B. & Bachtrog, D. (2011). Lack of global dosage compensation in Schistosoma mansoni, a female-heterogametic parasite. Genome biology and evolution, 3, 230.

[3] Matson, C. K., & Zarkower, D. (2012). Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. Nature Reviews Genetics, 13(3), 163-174.

[4] Protasio, A. V., Tsai, I. J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M. A. & Berriman, M. (2012). A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke Schistosoma mansoni. PLoS neglected tropical diseases, 6(1), e1455.

[5] Štefanić, S., Dvořák, J., Horn, M., Braschi, S., Sojka, D., Ruelas, D. S. & Caffrey, C. R. (2010). RNA interference in Schistosoma mansoni schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. PLoS neglected tropical diseases, 4(10), e850.

Figures

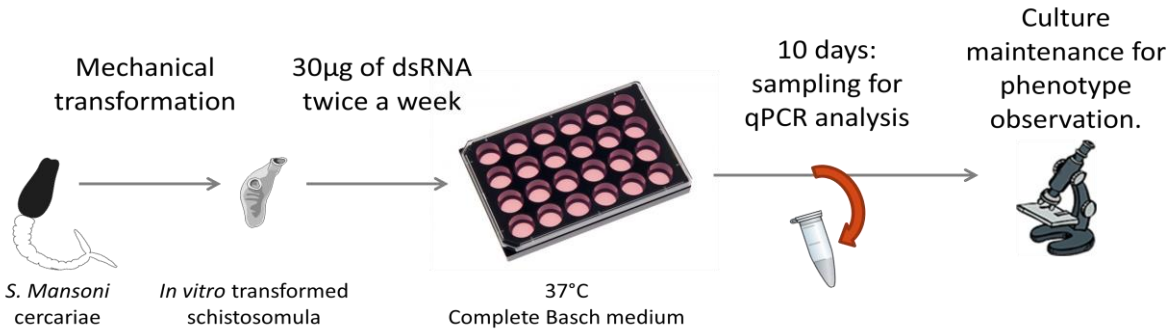


Figure 1. dsRNA experiment on in vitro *newly transformed schistosomula (NTS).*

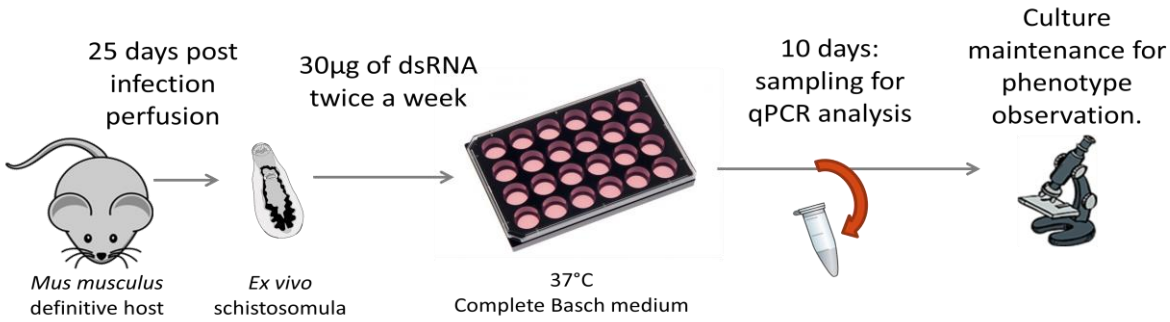


Figure 2. dsRNA experiment on in vivo *developed schistosomula.*

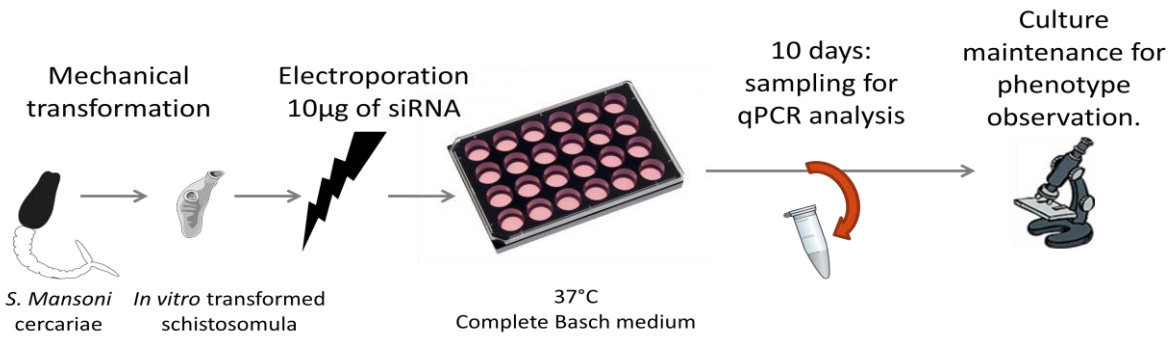


Figure 3. siRNA experiment on in vitro *transformed schistosomula (NTS).*

Tables

Table 1. Schistosoma mansoni DMRT *genes.*

Gene		DMD1	DMD2	DMD3	DMD4
ID		Smp_143190	Smp_138230	Smp_163870	Smp_132060
Gene type		Protein coding	Protein coding	Protein coding	Protein coding
Description		Hypothetical protein	Hypothetical protein	Double sex and Mab3 Related Transcription factor	Double sex and Mab3 Related Transcription factor
Location		Chr_4 from 5.100.657 to 5.131.538	Chr_3 from 18.582.240 to 18.593.940	Chr_W from 58.119.117 to 58.129.105	Chr_W from 32.926.538 to 32.930.515
EST		Yes	Yes	Yes	No
Coding sequence lenght		2976bp	1872bp	249bp	1341bp
PFAM domain		PF00751: DM DNA binding domain			
Biological process	Process	sex differentiation			
	GO ID	GO:0007548			
Molecular function	Function	(1)DNA bindingsequence - (2)specific DNA binding transcription factor activity			
	GO ID	(1)GO:0003677 (2)GO:0003700			

Table 2. Location of DMRT *gene exons.*

DMD1	Chromosomal location (Negative strand)	Location on coding sequence
Exon 1	5119509	0
	5121688	2179
Exon 2	5124521	5012
	5125437	5928
Exon 3	5127536	8027
	5128281	8772
DMD2	**Chromosomal location (Positive strand)**	**Location on coding sequence**
Exon 1	18581223	0
	18582356	1133
Exon 2	18585608	4385
	18586177	4954
Exon 3	18587475	6252
	18589464	8241
Exon 4	18593804	12581
	18593940	12717
DMD3	**Chromosomal location (Positive strand)**	**Location on coding sequence**
Exon 1	58119117	0
	58119122	5
Exon 2	58121847	2730
	58122055	2938
Exon 3	58129072	9955
	58129105	9988
DMD4	**Chromosomal location (Negative strand)**	**Location on coding sequence**
Exon 1	32926538	0
	32927325	787
Exon 2	32929963	3425
	32930515	3977

Table 3. dsRNA experiment: primer for matrix synthesis.

Targeted gene	Primers sequences (Primers to synthetise matrix for dsRNA experiment)	Product size (bp)
DMD1		
Forward primer	5' TACTAGAACTAATACTAGTCCTACTG	633
Reverse primer	5' CATTTAAACAAATAAATCCTGTTGA	
DMD2		
Forward primer	5' CAAATACTATTGATGCTAAACGTTAT	533
Reverse primer	5' TATCTCAAGAGGCATAAATGATGG	
DMD4		
Forward primer	5' TAACATCAATCAACTATTCTTCAAC	659
Reverse primer	5' GACCATGTTGATAATTGTCATGAG	

Table 4. dsRNA experiment: primer for dsRNA synthesis.

Targeted gene	T7 Primers sequences (Primers for transcription *in vitro*)	Product size (bp)
DMD1		
Forward primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATACTAGAACTAATACTAGTCCTACTG	633
Reverse primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACATTTAAACAAATAAATCCTGTTGA	
DMD2		
Forward primer	5'CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAATACTATTGATGCTAAACGTTAT	533
Reverse primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATATCTCAAGAGGCATAAATGATGG	
DMD4		
Forward primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATAACATCAATCAACTATTCTTCAAC	659
Reverse primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCATGTTGATAATTGTCATGAG	
GFP		
Forward primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACAT	
Reverse primer	5' CGATTTAATACGACTCACTATAGGGACGAACTCCAGCAGGACCATGTGAT	

Table 5. siRNA experiment: siRNA sequences against Sm_dmd3.

Targeted gene	siRNA sequences
DMD3	
sense1	(GUUGCAUUAAGAAGAGAAU)TT
antisense1	(AUUCUCUUCUUAAUGCAAC)TT
DMD3	
sense2	(UAAGUAUAAUACUAAUUCC)TT
antisense2	(GGAAUUAGUAUUAUACUUA)TT
DMD3	
sense3	(AGAGAAUUCUAUAUUCAAG)TT
antisense3	(CUUGAAUAUAGAAUUCUCU)TT

Table 6. Tanscriptomic evaluation of silencing experiments: qPCR primers.*

**Sm_dmd1, Sm_dmd2 and Sm_dmd3 primers are similar to thus used in the previous transcriptomic study while SM_DMD4 primers are new ones because of the overlap of dsRNAsequences and previous primers.*

Targeted gene	qPCR - Primers sequences	Primers lenght (nucl)	% GC	Tm	Product size (bp)
DMD1 (Smp_143190)					
Forward primer	GGACATGGTATGTCTGAACCAG	22	50	49,7	113
Reverse primer	TGTTGGGCTACTATACGACGAC	22	50	49,7	
DMD2 (Smp_138230)					
Forward primer	ACGTAACACTACTCGTTTATCTG	23	39,1	60,3	176
Reverse primer	GACATCGTCGACAATGTGG	19	52,6	60,1	
DMD3 (Smp_163870)					
Forward primer	TCATTTCGTGTGCCTAAATGT	21	38,1	60,1	157
Reverse primer	TTAATGCAACTTGTGCAGCC	20	45	60,9	
DMD4_SF1 (Smp_132060)					
Forward primer	TCGTGATTGCAAATGTCCAC	20	-	60,5	122
Reverse primer	AATGTTGCCAATCCATAGCA	20	-	59	
DMD4_SF2 (Smp_132060)					
Forward primer	CCGATAACAGCCAGACGAAT	20	-	60,1	129
Reverse primer	TGCACATTTGGGTCGTCTTA	20	-	60,1	
28s					
Forward primer	CGGAGATGGCGGCTTCGCAT	20	65	57,9	120
Reverse primer	CGCAACCGCCGACGTGACAA	20	65	57,9	

Appendix: Logistic details of BWF project and budget

I complete an internship in the CDIPD of six weeks from the 9th of April, to the 23rd of May 2014. Hereinbelow are shown the global expenses of my stay:

Accomodation	1st hotel night	$ 121
	April (from 8th to 30th)	$ 2816
	May (from 1th to 18th)	$ 1245
Meals	41 days x 15 $	$ 615
Flight	Normal two-way trip	$ 809
	Anticipated return	$ 2173
Other transportations	Taxi Aeroport --> Accomodation	$ 42
	Shuttle Accomodation --> Aeroport	$ 16
Visa	Administratives fees	$ 776
	Trip to Paris for interview	$ 216
Insurance Cover	*No supplementary fees*	

Partie 2 : Déterminisme et différenciation sexuelle de *S. mansoni*: implication de facteurs génétiques et/ou épigénétiques.

Nous l'avons souligné plusieurs fois, la biologie reproductive de *S. mansoni* est intéressante sous plusieurs aspects, entre autres : son gonochorisme atypique au sein des plathelminthes, le caractère ancestral de ses chromosomes sexuels et l'absence de gène W-spécifique. Nous pouvons aussi nous étonner de l'apparition tardive, dans l'hôte vertébré, du dimorphisme sexuel malgré un déterminisme syngamique (*i.e.* hétérogamétie femelle ZZ/ZW). **Ce contexte d'interaction hôte-parasite a non seulement guidé la stratégie reproductive de cette espèce à l'échelle évolutive mais il est sans nul doute un facteur essentiel de l'apparition du dimorphisme sexuel à l'échelle du cycle parasitaire.** Afin d'élucider les bases moléculaires de la différenciation sexuelle, nous proposons ici de mener une étude des transcriptomes mâles et femelles par séquençage haut-débit (*i.e.* RNA-seq) à travers cinq stades de développement. Ce sont ceux que l'on vous a précédemment présentés dans l'approche ciblée : le stade cercaire indifférencié, trois stades de différenciation schistosomules *in vivo* s#1, s#2 et s#3 et le stade adulte dimorphique. Cependant pour des raisons techniques, nous allons focaliser l'étude fonctionnelle globale sur les stades cercaires, schistosomules s#2 et adultes.

Ces dernières années, deux études réalisées au sein de notre laboratoire ont montré : (1) La présence de nombreuses **séquences répétées W-spécifiques dont la transcription et la structure chromatinienne varient au cours du cycle parasitaire** (Lepesant et al. 2012). (2) **Une évolution de l'épigénome global au cours du cycle de vie du parasite,** avec notamment la présence de marques chromatiniennes spécifiques révélant un état de **pause transcriptionnelle au stade cercaire, immédiatement levé à l'entrée dans l'hôte définitif** (Roquis et al. 2015). Ces deux études soulignent l'indiscutable implication de facteurs épigénétiques dans le développement du parasite et donc potentiellement, dans sa différenciation sexuelle. C'est pourquoi nous aurons une attention toute particulière pour ce type de mécanismes dans l'étude qui va suivre.

Dans cette étude nous présentons :

1. **De nouveaux candidats au déterminisme sexuel** tel que le gène *MagoNashi* surexprimé chez les mâles schistosomules s#2 et déjà décrit comme impliqué dans la structure testiculaire chez *Schistosoma japonicum* (Zhao et al. 2008). La reconstruction de son réseau d'interactions révèle un biais mâle concomittent au stade schistosomule s#2 de nombreux partenaires potentiels, dont beaucoup auraient un rôle dans les mécanismes d'épissage.

2. **Différents profils transcriptomiques chez les mâles et les femelles pouvant être corrélés à des traits de vie connus.** Par exemple, les mâles semblent plus réceptifs aux facteurs de l'hôte vertébré (dont les signaux hormonaux et facteurs de croissance), ce qui peut expliquer leur développement plus efficace (voir approche ciblée) et au-delà, le biais mâle de *sex-ratio* au stade adulte (Beltran and Boissier 2010). Les transcriptomes des mâles et des femelles présentent également des molécules tégumentaires et/ou sécrétées variées pouvant expliquer leur différence de pathogénicité et d'immunogénicité (Boissier et al. 1999).

3. Des mécanismes épigénétiques sexe-spécifiques, tels que l'expression de micro-ARNs, d'éléments génétiques mobiles ou de régulateurs chromatiniens. Nous focaliserons plus précisemment sur les remodellements chromatiniens mâles-spécifiques intenses au stade schistosomule. Nous préciserons notamment notre précédente étude de l'épigénome global du parasite (Roquis et al. 2015) par l'étude sexe-spécifique d'une modification d'histone (H3K27Me3, ChIP-seq) impliquée dans le phénomène de pause transcriptionnelle au stade cercaire. Cette approche va réveler que cette stratégie originale de transcription est en fait spécifique du sexe mâle.

Sex-specific transcriptome of *Schistosoma mansoni* through *in vivo* development: genetic and epigenetic interplay to trigger off the sexual differentiation.

Une version améliorée et documentée de ce travail a été soumise le 19 février 2016 à PlosNTD.

Authors

Marion Anne-Lise Picard[1], Jérôme Boissier[1], David Roquis[1], Christoph Grunau[1], Jean-François Allienne[1], David Duval[1], Eve Toulza[1], Nathalie Arancibia[1], Conor R. Caffrey[2], Thavy Long[2], Sabine Nidelet[3], Marine Rohmer[3], Céline Cosseau[1*]

[1]Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

[2]Center for Discovery & Innovation in Parasitic Diseases, Department of Pathology, University of California, San Francisco, CA 94158, USA

[3]MGX-Montpellier GenomiX - c/o Institut de Génomique Fonctionnelle - 141 rue de la cardonille - 34094 Montpellier, France

**Corresponding author: celine.cosseau@univ-perp.fr*

Abstract

Background

Schistosomatidae are unusual gonochoric parasites (*i.e.* displaying separate sexes) among more than 20.000 species of classical hermaphroditic trematodes (*i.e.* individuals possessing both male and female reproductive organs). In schistosomes, sex is determined at the fertilization by a female heterogametic system (*i.e.* ZZ/ZW) but sexual dimorphism only appears after infection of the vertebrate definitive host (*i.e.* schistosomulum stage). For the moment, molecular mechanisms that trigger the sexual differentiation remain unsolved, and *in vivo* studies on the developing schistosomula stage are lacking.

Methodology / Principal Findings

We investigated the global transcriptome of the human parasite *Schistosoma mansoni* in a stage- and sex-specific manner applying a high-throughput RNA sequencing experiment on males and females of five developmental stages. Among them, three *in vivo* schistosomula stages (s#1, s#2 and s#3) were unprecedented. We highlight here (i) potential genetic players of sex determination/differentiation cascade as the male-associated *MagoNashi* (Mag-1) gene, (ii) striking evidences of differential host/pathogen interactions between males and females and (iii) potential epigenetic regulations and male-specific chromatin remodeling supported by changes in histone modifications.

Conclusions / Significance

Sex determination/differentiation in the human parasite *S. mansoni* is the result of a complex interplay of genetic factors, epigenetic regulators and host signals. Males have an enhanced perception of their environment and thus have a privileged crosstalk with the host, which may results in the unusual male-biased *sex-ratio* of this species. All male-specific molecular mechanisms

of the lifecycle lead to its efficient development and thus enhance its capacity to care for the female, improving the reproductive success of the couple. Thus our study provides both (i) data on the schistosome development in interaction with its vertebrate host and (ii) data on its reproductive function. These two aspects of schistosome biology are promising sources of therapeutic targets.

Author summary

Parasitic flatworms include more than 20.000 species that are classically hermaphrodites (*i.e.* individuals possessing both male and female reproductive organs). Among them, the hundred species of *Schistosomatidae* are intriguing because they are gonochoric (*i.e.* having separate sexes). Sex of schistosomes is genetically determined with ZZ sex chromosomes in males or ZW in females (*i.e.* female heterogametic system). There is however no phenotypic dimorphism in the larval stages: sexual dimorphism appears only in the vertebrate definitive host. In order to relate the appearance of phenotypic sexual dimorphism to molecular mechanisms, we performed transcriptome (RNA-Seq) analysis in five different *in vivo* stages of the parasite lifecycle of which three were yet unprecedented. This study considerably improves the comprehension of many aspects of sexual biology of schistosomes showing (i) the pivotal role of host/pathogen interaction in sex differentiation, (ii) the involvement of epigenetic mechanisms and (iii) the sex-associated expression of pivotal genes of sex determination/differentiation pathways. Since eggs are the main cause of the inflammatory disease, sexual reproduction mechanisms of schistosomes is of particular interest for drug development. Our sex-comparative approach and particularly this unprecedented *in vivo* schistosomula transcriptional data provide undoubtedly new therapeutic prospects.

Introduction

Among the 100 species of *Schistosomatidae* some of them have peculiar medical importance like the *Schistosoma* genus which is pathogenic for humans. At least seven known *Schistosoma* species are responsible of the schistosomiasis (or bilharziasis), which represents the second parasitic disease after malaria and affects 67 million people worldwide (Lawton et al. 2011) (Chitsulo et al. 2004). *S. mansoni,* responsible for the intestinal schistosomiasis, is endemic in Africa and South America (Lawton et al. 2011) and has been used as a model species for the *Schistosomatidae*. *S. mansoni* has a 364,5MB genome (version 5.2), containing 18.852 genes assembled in seven pairs of autosomal chromosomes and one pair of sex chromosomes of the ZW/ZZ type (Protasio et al. 2012; Criscione et al. 2009). *S. mansoni* has a complex life cycle in which a freshwater snail (*Biomphalaria* species) serves as intermediate host and human or murine species respectively serve as definitive or reservoir host. Sexual reproduction occurs in the vertebrate host and parasite's eggs are released in freshwater *via* the feces. Free living larval miracidia hatch out of the eggs, and infect the mollusc intermediate host to transform into sporocysts which produce many human infecting cercariae. These larvae actively seek skin contact and penetrate the epidermis. During skin penetration, the cercariae lose their tails and undergo drastic morphological and physiological transformations. Within two hours, free-living larvae become obligatory endoparasitic schistosomula. They leave the dermis to reach the bloodstream and migrate to the liver *via* the lungs (Wilson et al. 1986; Wilson 2009). All around these first steps of the life cycle, the parasites possess genetic separated sexes, and even if some life-history traits have been shown to be different between males and females (Boissier et al. 1999), no apparent sexual dimorphism exist from the eggs to the early stages of schistosomula. The schistosomula develop from 150µm juvenile undifferentiated individuals to 1cm differentiated adult worms once they reach the hepatic portal system after two to five weeks within the definitive

host (Lawson and Wilson 1980). Then, dimorphic males and females definitively mate and migrate together to the mesenteric venules where they intensely reproduce. At this stage, the dimorphic phenotype is crucial for the fitness of the parasite: (i) the muscular male clasps the female in the gynaecophoric groove to resist to the high blood pressure environment, (ii) the filiform female is able to insinuate into the tiniest venules of the intestine to depose the eggs one by one (Basch 1990). Each female deposes up to 300 eggs per day and approximately 50% of these eggs remain caught in the vertebrate host, causing the inflammatory chronic disease (Hoffmann et al. 2002). The paired adult parasites can remain during decades in their host, showing their highly adapted relationship with the vertebrate host and the success of the gonochorism strategy.

In this context, the understanding of developmental and reproduction success of schistosome appears crucial to fight against schistosomiasis and many studies have addressed the question of the development of the parasite within its vertebrate host and the establishment of the highly efficient reproductive system. Numerous works have highlighted the responsiveness of the developing *S. mansoni* to the host blood microenvironment showing that the parasite exploits endocrine and host immune signals to accomplish its development (Hernandez et al. 2004; De Mendonça et al. 2000; Escobedo et al. 2005; LoVerde et al. 2007; Oliveira et al. 2009). The mating state has also been shown to play an essential role for the maturation of both males and females (Siegel and Tracy 1988; Haseeb et al. 1989; Kunz 2001; Fitzpatrick and Hoffmann 2006; LoVerde et al. 2009; Leutner et al. 2013). Besides, other molecular studies have highlighted male or female specific pathways essential for the development and the reproduction of the parasite (Vanderstraete et al. 2014; Beckmann et al. 2012; Dissous et al. 2011; Long et al. 2010; Long et al. 2012; Beckmann et al. 2010; Fitzpatrick et al. 2007; Hahnel et al. 2014). Epigenetic control for gene expression regulation and development has also been investigated and has highlighted some gender specific epigenetic process. Chromatin structural changes occur on female specific microsatellite repeats of the W-gonosome during the development of the parasite (Lepesant et al. 2012) and sex-biased and stage-specific miRNAs expression suggest that non-codingRNAs (ncRNAs) participate in *S. mansoni* sexual differentiation process (Simões et al. 2011; Marco et al. 2013a).

In the present report, we investigated the global transcriptome of *S. mansoni* in a stage and sex specific manner. Previous transcriptomic analyses were carried out on diverse developmental stages (Gobert et al. 2010; Parker-Manuel et al. 2011; Protasio et al. 2012; Protasio et al. 2013; Williams et al. 2007) and sex-biased expressions were only explored in adult (Fitzpatrick et al. 2005; Hoffmann et al. 2002) or cercariae (Fitzpatrick et al. 2008). Here, we present RNA-sequencing analysis on five stages of *in vivo* development, from the undifferentiated cercariae to the phenotypically very distinctive male and female worms. The *in vivo* schistosomula differentiating stages, critical in host/parasite interaction, were sub-categorized in three morphologically consistent groups of individuals (Faust and Hoffman 1934; Barbosa et al. 1978) in order to overcome with the issue of highly non-synchronized *in vivo* development (Protasio et al. 2013). We analyse gender-biaised expression and molecular pathways for the five stages in order to correlate molecular candidates to phenotypic dimorphism appearance.

Methods

Sampling and raw data production

Animal breeding and ethics statement

Housing, feeding and animal care followed the national ethical standards established in the writ of February 1st, 2013 (NOR: AGRG1238753A). The French *Ministère de l'Agriculture et de la Pêche* and the French *Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie* provided permit A66040 to our laboratory for experiments on animals and certificate for animal experimentation for the experimenters (authorization 007083, decree 87–848).

Parasite culture and sample preparation

The human Guadeloupean strain of *Schistosoma mansoni* SmGH2 was used in this study. Its lifecycle was maintained in its sympatric intermediate host strain BgGua of the mollusk *Biomphalaria glabrata,* and *Mus musculus* as definitive vertebrate host.

In order to obtain unisexual clones of cercariae, monomiracidial infections of mollusks were carried out. Sexes of the cercarial clones were determined by PCR of repetitive female specific sequences (supplementary file 1) (Portela et al. 2010).

Male and female cercariae were axenically and separately recovered from the monomiracidial infected snails 35 days after infection by pipetting from spring water. Then, they were either immediately used for infestation of mammalian or treated for subsequent RNA isolation: they were concentrated by a first step of sedimentation on ice and obscurity for 30 minutes and a second step of cold centrifugation (4°C) at 1,200 G for 10minutes. They were finally kept at -80°C. Mammalian infestations were performed with 500 cercariae, either males or females on each mouse. *In vivo* Schistosomula were obtained by retrograde perfusions of the hepatic portal system with citrate (7.5%) saline (8.5%) solution between three and four weeks post-infection (Duvall and DeWitt 1967). These recovered schistosomula were sorted in finely defined stages, in order to get parasite samples as synchronized as possible during the schistosomula development. For technical facilities, sorting criteria are based on caecum shape, acetabulum location and gynecophoric canal appearance in male. Three classes of schistosomula were defined: (1) first steps of symmetric development on both sides of acetabulum, the caecum can be either non-fused or fused; (2) phenotypically asexual stage showing a top part from the oral sucker to the acetabulum smaller than the lower part of the body (*i.e.* allometric growth); (3) male and female dimorphic developmental stage following gynecophoric canal apparition in male, and lengthening with loss of pear-shaped aspect in female: the linked caecum is longer than the bifurcated one but it still less than three-fold longer. Details and illustrations of these sorting criteria are shown in (supplementary file 2). During this thoroughly sorting, the juvenile parasites were maintained in Basch medium without serum and sorted one by one under stereoscopic microscope in less than an half of hour. After sampling, they were concentrated by cold centrifugation (4°C) at 1,200 G for five minutes and kept at -80°C until RNA extraction. Male and female adult worms were recovered from unisexually infected mice after 49 days post infection (PI) by perfusion as described for Schistosomula. Adults were drily conserved at -80°C until the subsequent RNA isolation.

Total RNA isolation

RNA extraction (for one biological replicate) were performed from 5,000 cercariae (+/- 500), 200 to 800 schistosomula (respectively stage s#3 and s#1) and 20 (for males) to 100 (for females) adult

worms. All biological samples were identically treated regardless of the developmental stage: they were grinded in liquid nitrogen until obtaining a homogeneous powder, suspended in 0.5 mL TRIzol and kept five minutes at room temperature. Then, 0.1 ml of chloroform was added. The tube was shaken vigorously for one min and left at room temperature for three min. Then, the separation of phases was obtained by centrifugation at 12,000 G for 15 minutes at 4°C. The upper aqueous phase was transferred to a new RNase-free tube, an equal volume of 70% ethanol was added and the tube was vortexed. PureLink RNA Mini kit (Ambion, 12183020) was used for further purification following the manufacturer's protocol. Total RNA was recovered in 30 µl RNAsecure (Ambion, AM7006), left for one min at room temperature, collected by centrifugation for one minute at 8,000 rpm at room temperature and incubated at 65°C for 10 min. To remove remaining DNA, 3 µl of 10X TURBO DNase Buffer (TURBO DNA-free™, Ambion, M1907) were added to 30 µl of total RNA in RNAsecure, followed by 3 µl of TURBO DNase (2 Units/µl). The preparation was gently mixed and incubated at 37°C for 20 minutes. 1 µl of 10X TURBO DNase Buffer and 3 µl of enzyme are added once more and the samples were then incubated during 15 minutes. The reaction was stopped by cooling down on ice during two minutes and RNA was finally purified on a column (RNeasy® mini kit, QIAGEN, 74104) and eluted in 30 µl RNase-free water. Quality and concentration were assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer system.

Chromatin Immunoprecipitation assay

Native immunoprecipitation was done according to an earlier published protocol (Cosseau et al. 2009) using 4 µl of H3K27me3 (cat. number C15410069, lot number A1821D, 1.45ug/ul) and at least 10,000 cercariae, or 20 adult males, or 100 adult females per sample. Experiments were done in duplicates for males and triplicates for females. Antibodies were carefully tested for specificity as described before (Cosseau et al. 2009). Further details are available at http://methdb.univ-perp.fr/epievo/.

Illumina libraries construction and high-throughput sequencing

cDNA library and ChIP library constructions and sequencing were performed at the sequencing facilities of Montpellier GenomiX (MGX, France).

cDNA library: PolyA cDNA single strand library 50 (positive strand) nucleotides were constructed from 300ng of total RNA for each sample with TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina Inc., USA). The quantitative and qualitative analysis of the library was carried on puce AgilentDNA 1000 and qPCR (Applied Biosystems 7500, SYBR Green). The sequencing was performed on a HiSeq2000 (Illumina Inc., USA) by SBS (Sequence By Synthesis) technique. A stranded library was performed. Samples were multiplexed by three on the seven lanes of a same flow cell.

ChIP library: The TruSeq® ChIP sample preparation kit (Illumina Inc., USA) was used according to the manufacturer's protocol on 30 ng of DNA per condition. Briefly, these 30 ng of DNA were blunt ended and adenylated on their 3' ends. Illumina's indexed adapters were ligated to both ends of the adenylated DNA. Ligated DNA were enriched by PCR and size separated by electrophoresis. Size selection was performed at 400 bp. The quantitative analysis of the DNA library was carried on puce Agilent High Sensitivity and qPCR (Applied Biosystems 7500, SYBR Green). The sequencing was performed on a HiSeq2000 and HiSeq2500 (Illumina Inc., USA) by SBS (Sequence By Synthesis) technique. RNA-Seq and ChIP-Seq reads are available at the NCBI-SRA under the BioProject accession numbers PRJNA312093 (RNAseq on both sexes and ChIPseq on males) and PRJNA236156 (ChIPseq on females).

Processing of raw data - RNAseq

RNAseq Sequences treatment

A general workflow of the bioinformatic pipeline is described in the supplementary file 3. All data treatment was carried out under a local galaxy instance (http://galaxy.univ-perp.fr) (Goecks, Nekrutenko, and Taylor 2010). Fastq Groomer (Galaxy tool v1.0.4) was used for verification of the fastqsanger format (Blankenberg et al. 2010). The FASTX-Toolkit (Galaxy tool v1.0.0) which (1) computes quality statistics, (2) draws quality score boxplot and (3) draws nucleotides distribution chart, was used for initial quality control. Phred quality scores were all good (≥25) and consequently no quality filter was applied. The reads were mapped (splice junction mapping) to the *Schistosoma mansoni* reference genome (assembly version 5.2) using TopHat (v2.0.9) with the following parameters: single end, FR first strand, 2 mismatches allowed, no bowtie n-mode, anchor length: 8, mismatch in anchor: 1, min intron length = 20bp, max exon lenght: 50kb, indel yes, maximum allowed number of alignements: 20, no own junction, no coverage search, microexon yes, no fusion search, Bowtie (v2.1.0.0) settings: preset options yes: very sensitive. The resulting BAM files were converted to SAM format (SAM tools v0.1.18.0) and the unmapped reads were removed. In order to be consistent in the further differential analysis between the different samples, 65.844.021 reads were randomly picked (Galaxy tool v1.0.0) from each file. Exon-intron structure was then constructed with Cufflinks (v2.1.1) (Trapnell et al. 2010) without any correction parameter: neither quartile normalization, nor bias corrections were applied. All the obtained data were joined with Cuffmerge (v1.0.0) (Trapnell et al. 2010), without any genome reference nor guide, in order to create a new *S. mansoni* transcriptome containing the exon-intron structures of the five developmental stages. Then, we quantified each sample reads abundance by mapping each condition to the *de novo* assembled transcriptome with HTseq (v0.6.1p1) with the overlap resolution mode union (Anders et al. 2014). The results of the mapping step were corrected by the amounts of kb generated by conditions and by the transcript length and therefore expressed as reads per kilobase per million mapped reads (RPKM). Finally, the differential gene expression between sexes was analyzed with the DESeq package (v1.12.1) (Anders and Huber 2010). The quality of the metrics is also presented in the supplementary file 3.

Blast analysis

The 100 first (100 best P-values) differentially expressed genes between sexes of each stage were *de novo* manually annotated using basic blast (Blastx v2.2.30), specialized blast (for conserved domain) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), the free open source software AmiGO (v1.8; http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/blast.cgi) and information available from the web based interface geneDB. (http://www.genedb.org; (Logan-Klumpler et al. 2012)). An overview of this functional *de novo* annotation is presented in the supplementary file 4.

Blast2Go analysis

The *de novo* assembled transcriptome was automatically annotated using Blastx searches against the non-redundant nr database of the NCBI (14-oct-2013), that were performed on a local server using ncbi-blast-2.2.26+ and evoking parameters -seg yes -strand both -matrix BLOSUM62 -max_target_seqs 10. XML files were loaded onto Blast2GO for GO mapping and annotation with version b2g_sep13 of the B2G database. InterProScan-5-44.0 was used with parameter -f XML to search motifs in local instances of ProDom-2006.1, PIRSF-2.84, PfamA-27.0, SMART-6.2, PrositeProfiles-20.89, HAMAP-201302.26, PrositePatterns-20.89, PRINTS-42.0, SuperFamily-1.75,

Coils-2.2, and Gene3d-3.5.0 (oct-2013). Interproscan gene ontologies (GO) were merged to Blast2GO GO. To identify Gene Ontology term that was significantly up- or down-regulated between male and female, Blast2GO enrichment analysis were performed (version 2.6.4). Six test sets were used: genes up-regulated in either male or female for each of the three stages: cercariae, schistosomule s#2 (as previously defined in parasite culture and sample preparation) and adults. Each set of up-regulated genes was tested for enrichment against its reference set which was the total number of expressed genes for each stage (29,209; 30,543 and 29,944 genes for cercariae, schistosomule s#2 and adults). Increases in GO terms were considered statistically significant at $p < 0.02$. We focused our analysis on biological processes only. We manually classified each of the enriched GO terms in one of the following category : General cellular process, Signal transduction, Heme process, Behavior, Cell Cycle, Regulation of Ribonucleoprotein, Cytoskeleton/Actin, Transport, Development, Neurological and brain process, Reproduction, Sexual differentiation, Immune response, Response to environmental stimulus, Chromatin structure, DNA repair, RNA process, Replication-transcription-translation, Protein process, General metabolism, Amino acid metabolism, Macromolecules process, Purine metabolism, Heterocycle molecules, Energy, Carbon metabolism.

miRNAs analysis

The *de novo* transcriptome previously constructed with Cuffmerge (v1.0.0) was intersected with *miRBase* datas (http://www.mirbase.org/) using Blast v2.2.30. Only the hits containing the entire *S. mansoni* miRNA precursor or at least one mature miRNA were conserved.

Expression pattern clustering

Sex-biased hits obtained after DEseq experiment and Blast2GO annotation process were sorted in order to conserve only transcripts that (1) displayed a sex-biased expression in at least one of the studied stage and (2) encoded a predictive product. They were clustered according to the evolution of their sex-biased expression (represented by the log10 fold-change) with the help of the *Gene Cluster 3.0* software and using the complete linkage method and hierarchical parameters with similarity metric: correlation (uncentered). Graphic representations were obtained with *Java treeView* software version 1.1.6r4 (http://jtreeview.sourceforge.net) and the following pixel settings: contrast value of 2.0, positive values in pink (FF0066) and negative values in cian (00CCCC).

Functional networks prediction

Networks of candidate genes were predicted using *String DB online software* v10 (http://string-db.org/ described by Szklarczyk et al. 2011). A “search by name” was performed, with the default parameters of medium required confidence score (0.400) and no more than ten interactors shown.

Processing of raw data - ChIPseq

ChIP-Seq sequence treatment

Fastq Groomer (Galaxy tool v1.0.4) was used for verification of the fastqsanger format (Blankenberg et al. 2010) and the FASTX-Toolkit (Galaxy tool v1.0.0) for quality check. Reads were aligned to the *S. mansoni* reference genome, assembly version 5.2 using Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) evoking parameters --sensitive -k 2. Mapping quality (mapq) in Bowtie 2 is related to “uniqueness” of the read. SAM alignment files were converted into the bed format with pyicos (Althammer et al. 2011) and sorted with sortBed -i of the bedtools suite (Quinlan et al. 2011). For peaks identification

an equal number of 15,000,000 random lines in the bed-file was chosen for each biological replicate. Identification of peaks was done with ranger of Peakranger v1.16 (Feng et al. 2011) with P-value cut off 0.0001, FDR cut off 0.01, Read extension length 200, Smoothing bandwidth 99 and Delta 1. We used the input samples (*i.e.* from unbound samples) as negative controls for the peakcalling (-c). The quality of the metrics is presented in the supplementary file 3.

Comparative EpiChIP analysis

Average histone modification profiles around TSS (Transcriptionnal Start Site) were generated by doing a "window analysis" around the TSS of genes, using EpiChIP v0.9.7-e (Hebenstreit et al. 2011). EpiChIP allows for generating genome-wide, average profiles for histone modifications at a given genomic feature (in our case from -1,000 to +5,000bp relative to the TSS of genes). As input, we used the randomly sampled aligned reads that also served as inputs for PeakRanger all in bed format. The average histone profiles were generated on the chromosome 1 and ZW. For this purpose, we used the output file of Cuffmerge and selected the 6,225 and the 5,797 of these chromosomes respectively. Chromosome names were converted in the input bed files into EpiChIP canonical names ("Chr*number*"). The average H3K27me3 and input profiles were generated for the two male biological replicates and the three female biological replicates. Each average H3K27me3 profile was normalized with its respective input average profile.

Quantitative real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)

For each developmental stage and sex of the parasite, first stand cDNA synthesis and qPCR validation experiments were achieved on two different biological replicates. 500ng of the purified total RNA were reverse transcribed using identical concentration (250 nM) of random and oligo-dT primers of Maxima H Minus Reverse Transcriptase kit (ThermoSCIENTIFIC). qPCRs were performed using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) with the LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics). Single product amplification was checked by analysis of the amplicon melting curve and capillary migration on a Labchip® GX DNA assay system (PerkinElmer). For each reaction, the crossing point (Cp) was determined using the second derivative maximum method using Light Cycler Software version 3.3 (Roche Diagnostics). For each studied stage, sex, and replicate, the level of transcription was normalized using the mean geometric transcription rate of three reference sequences Smp_093230 (Sm-arp 10, actin protein 10), Smp_197220 (Sm-RPL35, subunit of the oligosaccharyltransferase) and Smp_089880 (Sm-fad oxidoreductase, FAD dependent oxidoreductase domain containing protein) previously described (Wang et al. 2013). Forward and reverse primers (Eurogentec) were designed for 43 genes (in addition to the three housekeeping genes) with the Primer3plus web based interface. Primer sequences and expected PCR product sizes are listed in the supplementary file 1. Correlation between RNAseq and qPCR was tested both globally and individually for each gene with a Spearman Rank test.

Results

Identification of sex-biased genes

We generated the transcriptome of cercariae, three developmental stages of schistosomula (s#1, s#2 and s#3) and adult worms. Males and females were analyzed separately with two biological replicates for each condition. Transcriptome sequencing yielded 1,080,386,261 Illumina single reads of 50bp and 981,363,482 mapped to the *S. mansoni* reference genome (v5.2) (supplementary file 3). In total, these reads corresponded to 54,956 transcripts representing splice variants of 34,755 different expressed loci of the *S. mansoni* genome. All these transcripts were subjected to blast2GO analyses for *de novo* annotation of this transcriptome. This analysis yielded either a Gene Ontology term, or an InterProScan number, or an Enzyme Code, or a sequence description for 39,591 transcripts. Quantification of reads abundance and analysis of differential gene expression between sexes was performed for each stage and generated 5,264; 1,534; 1,645 sex-biased locus for the three stages cercariae, schistosomula s#2 and adults; while less than 500 were sex-biased for the two other schistosomula stages s#1 and s#3 (pval<0.05 with FDR correction). The amount of sex-differentially expressed genes relied on the quality of the biological replicates. Despite thorough sorting of *in vivo* schistosomula stages, this juvenile parasite were really difficult to synchronize which probably explains the poor quality of the biological replicates for schistosomula s#1 and s#3. However, the 100 best p-values of all the developmental stages were good enough for further structural and functional analyses. Global analyses presented here include all the sex-biased genes of the three stages cercariae, schistosomula s#2 and adults: 7,168 hits appeared as sex-biased in at least one of the classes and only 131 ones conserved a sex-bias through the development (Figure 1). To further support our transcriptomic analysis, quantitative RT-PCR experiment was performed to validate the expression patterns obtained from the DEseq analysis: 43 transcripts were randomly tested and a Spearman Rank test determined that RNAseq and qPCR experiments were significantly (p<0.0001) and positively correlated, with a coefficient R=0.65 (supplementary file 5).

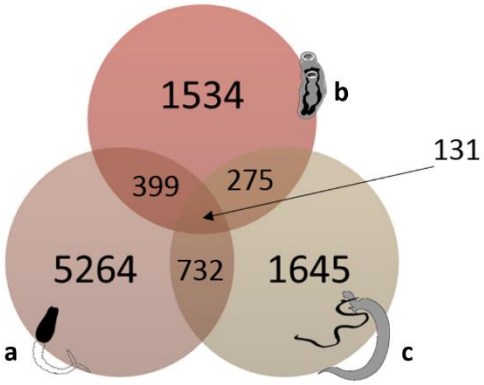


Figure 1. Venn diagram of sex-biased transcripts in three developmental stages.
(a: cercariae, b: schistosomula s#2, c: adults)

Male- and female-associated biological pathways through *S. mansoni* cycle.

The genes that were identified as being up-regulated in either males or females for the three stages cercariae, schistosomula s#2 and adults (p<0,05 with FDR correction) were subjected to an exact Fisher test using the *blast2GO* software. In order to gain insight into major biological processes that would be enriched during development specifically in either male or female individuals, we focused our test on the "biological processes" ontology. Enriched GO terms are presented in the supplementary file 6. To gain a more synthetic overview of the sex-associated biological processes, we manually sorted the GO terms into more general categories and consider the GO terms enrichment for each of them (supplementary file 6). We used this enrichment as a quantitative indication of a category that is over-represented in each stage in either males or females (*i.e.* sex-biased). As expected, we obtained more enriched GO terms in test sets that contain more sex-biased

genes, which relies on the quality of the biological replicates of our RNA-seq experiments. To avoid this bias, we normalized the obtained number in each category by the total amount of enriched GO term for each test set.

Of particular interest we detected some categories that were more enriched in males whatever the developmental stage such as “protein process”, “heme related process”, “energy” and “carbon metabolism” (supplementary file 6). Therefore, metabolic functions in males seemed to be more dedicated to the production of energy while female-associated metabolic categories were more specialized such as “heterocycle molecules related process” and “purine metabolism” that were particularly enriched in schistosomula s#2 (supplementary file 6). The response to “environmental stimulus” occured in cercariae at the same level for both males and females, although GO terms were different and indicated a distinct perception of environmental factors (supplementary file 6): Female cercariae displayed a better “response to light” and “mechanical stimulus” than males. Male cercariae were better responsive to “chemical stimuli” and this capacity was maintained in schistosomula and adult worms. Among the GO terms involved in response to “chemical stimuli”, we noticed the particular biological processes “Response to vitamin D”, “Growth Epidermal Factor” (specifically enriched in male cercariae) and “Response to cortico/gluco-steroid stimulus” (specifically enriched in male schistosomula) (supplementary file 6). Our GO terms analysis also indicated that “development” was a category over-represented in female cercariae and especially some developmental subcategories such as “sexual differentiation” and “neuronal development” (supplementary file 6). This last category was specifically enhanced in female whatever the stage. The “reproduction” category was over-represented in male cercariae and schistosomula, and then reversely over-represented in adult females. Besides, and of particular interest, was the category “Chromatin structure” which was enriched in males in schistosomula and adult stages and represented with GO terms that all converged toward a strong chromatin re-organisation (Table1) (supplementary file 6).

CHROMATIN STRUCTURE ASSOCIATED GO-TERM	*P value*
Female schistosomula stage 2	
Histone dephosphorylation	*0,014*
Male schistosomula stage 2: INTENSE CHROMATIN REMODELLING	
DNA conformation change	*3,57E-05*
DNA packaging	*6,78E-05*
Nucleosome assembly	*9,46E-05*
Chromatin assembly	*9,46E-05*
Nucleosome organization	*1,64E-04*
Chromatin assembly or disassembly	*2,12E-04*
Chromatin silencing	*8,90E-04*
Negative regulation of gene expression, epigenetic	*8,90E-04*
Chromosome organization	*2,03E-03*
Chromatin organization	*1,83E-03*
Gene silencing	*3,61E-03*
Nucleus organization	*4,45E-03*
Regulation of gene silencing	*5,54E-03*
Regulation of chromatin silencing	*5,54E-03*
Female adult worms	
DNA conformation change	*6,10E-03*
Male adult worms	
Gene silencing	*6,88E-03*
Gene silencing by RNA	*6,95E-03*
Regulation of histone acetylation	*8,26E-03*

Table 1. Chromatin structure associated GO terms in male and female vertebrate stages.

Functional clusters of sex-biased genes through the life cycle

As mentioned before, 7,168 genes could be defined as sex-biased in at least one of the three studied stages (cercariae, schistosomula s#2 and adults). Among all these sex-biased genes, 4,067 could be

functionally annotated. 45%, 68% and 63% of them are male-biased in cercariae, schistosomula and adults. We sorted these 4,067 putative products in 17 categories, based on their sequence homology and Gene Ontology (Overview in supplementary file 7). Then, we focused our analysis on five categories because of their importance in sex-specific development in the host-pathogen context: "sexual determination and somatic sexual differenciation", "development", "host-pathogen interactions", "miRNA precursors" and "DNA/RNA modifications and transcription control", containing respectively 57, 229, 227, 16 and 339 sex-biased genes.

Sex determination and somatic sexual differentiation.

This sex- and stage-specific gene expression analysis allowed us to highlight some key genes expressed in a stage and/or sex-specific manner and whose function are related to the sexual identity (*i.e.* sex determination or sexual differentiation pathways) and the reproductive function (*i.e.* meiosis). Both sexes displayed interesting candidates. We particularly detected the "*pololike kinase 1*" (Smp_009600 or XLOC_001539) as a female-biased gene in adults, and this gene was previously shown as involved in schistosome reproduction (Long et al. 2010). In cercariae we detected a female-bias for "*dachshund homolog*" (Dac, Smp_196410 or Smp_180990 or XLOC_000057) which is also sex-specifically regulated in *Drosophila melanogaster* (Atallah et al. 2014). In males we detected several other genes of particular interest: In cercariae, the male-biased "*cytoplasmic kinase SmTK3*" (Smp_212730 or XLOC_023844) which was known to be involved in schistosome reproduction (Kapp et al. 2004). In the schistosomulum stage s#2, the unplaced "*mago nashi protein homolog*" (Mag, Smp_103470 or XLOC_029759), the Z-specific gene "*Sex comb on midleg homolog*" (SCMH1, Smp_006250 or XLOC_025309) and the pseudoautosomal gene "*transformer-2*" (Tra2.1, Smp_045950 or XLOC_026534) were of particular interest because of their involvement in the sexual differentiation of different model organisms. For reconstructing a predictive network involved in sexual differentiation, we submitted the *Dac, Mag, SCMH* and *Tra2.1* male-biased genes to the STRING DB software and retained the 10-best interactions. In addition, and in spite of the lack of sex-bias detected in our RNAseq, we included in this network analysis seven other *S. mansoni* sex-regulator candidates (supplementary file 8) which we identified in the WormBase ParaSite online database (http://parasite.wormbase.org/). These non-biased genes were "*Tra2 homolog*" (Tra2.2, Smp_050920 or XLOC_019601), "fem-1" (Smp_175780 or XLOC_031831) and four "*doublesex and mab-3 related transcription factor*" (DMRT genes, Sm_dmd1: Smp_143190 or XLOC_016370, Sm_dmd2: Smp_138230 or XLOC_012074, Sm_dmd3: Smp_163870 or XLOC_024653, Sm_dmd4: Smp_132060 or XLOC_026318). Among the *Dac* partners, six developmental genes were detected as sex-biased, three in females and three in males (supplementary file 8). The four *DMRT* genes networks, considered as one, revealed female-expression of three other developmental genes in cercariae, and a putative interaction with the herein below described *Tra2.1*. As for the *fem1* network, we observed a male-bias of four partners and a sex-switching pattern of transcription for *Gli2* (Smp_000530 or XLOC_029461). This gene, which encoded a transcription factor was male-biased in cercariae and adult stages but female-biased in schistosomula s#2. *SCMH1* had two putative Z-specific partners and both are male biased. Of particular interest, "*polycomb protein EED*" (Smp_165220 or XLOC_023151), involved in chromatin structure, was among the 100-best hits of the s#2 schistosomulum stage (supplementary file 4).

The last three networks of *Mag*, *Tra2.1* and *Tra2.2* genes respectively presented five, five and seven sex-biased partners. These networks shared common features: the putative partners are mainly male-biased in schistosomula and involved in regulation of transcription or translation. Among the

Tra2.2 partner we also detected the known male-associated "*Fog*" gene (Smp_174880 or XLOC_025404).

We then constructed a super-network, linking all the 35 sex-biased members of the seven above described systems (Figure 2). *Mag, Tra2.1* and *Tra2.2* networks appeared tightly intertwined. Besides, and of particular interest, *Gli2* of the *Fem-1* network strongly interacted with the *Dac* and the *DMRT* genes networks.

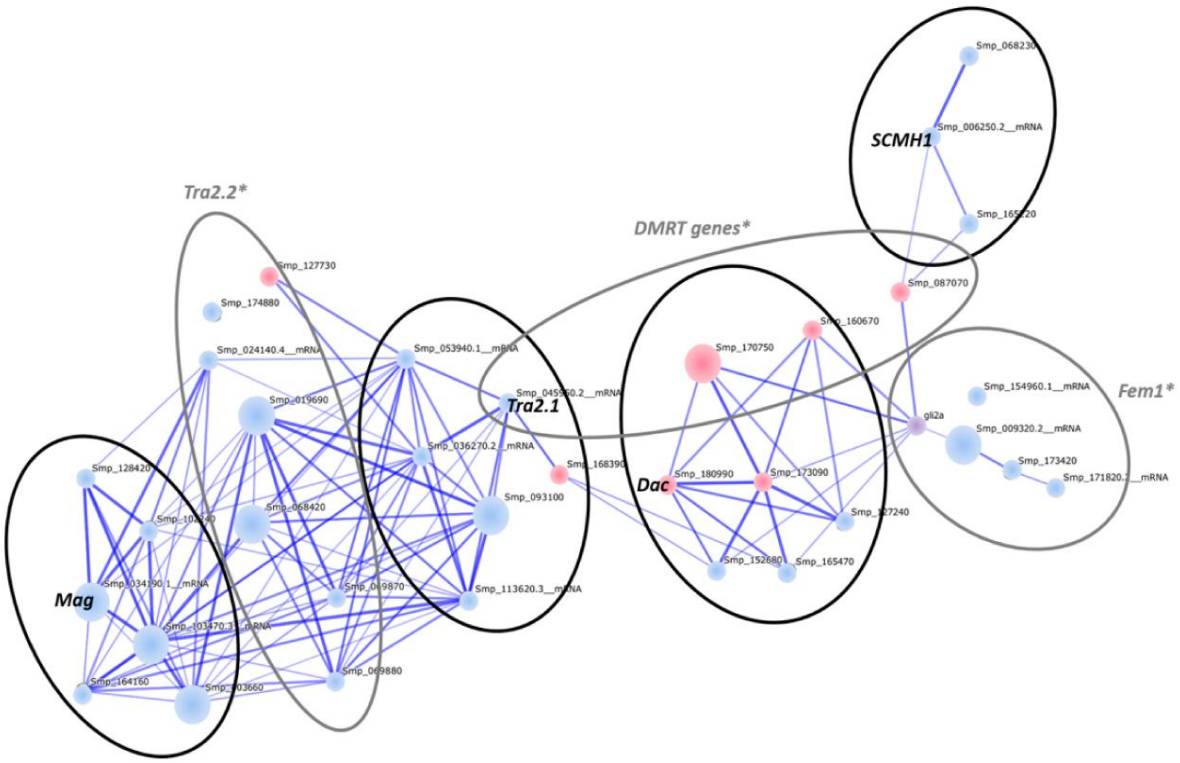


Figure 2. Super-network of sex-biased candidate regulators of sexual differentiation. *This putative network was generated by StringDB software and represents potential interactions (blue lines) between genetic factors (dots). Here are represented interconnections between seven under-networks (ellipse) of candidate genes for the sexual differentiation regulation. In our RNAseq, these seven candidate genes were detected as sex-biased (in black: Mag, Tra2.1, Dac and SCMH1) or not (in grey*: Tra2.2, DMRTgenes and Fem1). In this figure, all the dot-represented genetic factors display a sex-biased expression in at least one stage of development, in blue for male-biased gene, in pink for female-biased gene and in purple for switching gene.*

Development

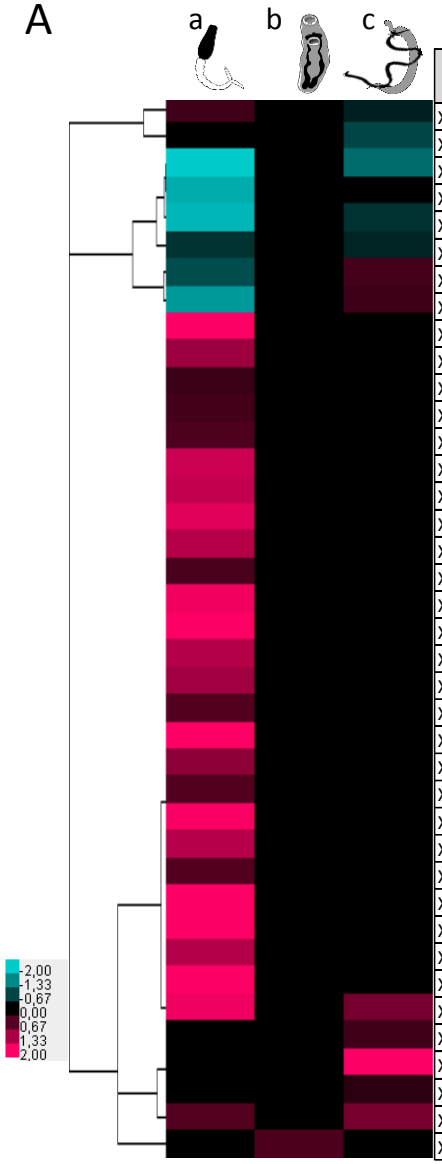
In the "development" category, 39 genes corresponded to homeotic genes. On average, they are almost three times more transcribed in cercariae (384 rpkm) than in schistosomula s#2 (131 rpkm), and 32 of them were female-biased in cercariae stage (Figure 3). Still in the development category but considering growth-factors pathways, 57 sex-associated hits were identified. They correspond to signal molecules (growth factors), receptors, downstream effectors and/or regulators. They were related to the epithelium growth factor (EGF) pathway, the transforming growth factor β (TGFβ) and the closely related bone morphogenetic protein (BMP) pathways, the tumor necrosis factor pathway (TNF), the fibroblast growth factor pathway (FGF), the WNT and the notch signaling pathway (supplementary file 7). EGF and TGF pathways were essentially male-biased. Among the interesting candidates involved in these pathways three putative products (Smp_141030, Smp_035260 and one non-annotated XLOC_034035) matched with "EGFRs kinase substrate 8-like", receptors that were

previously described as expressed in schistosome gonads (Beckmann et al. 2010). In the context of hepatic localization of schistosomes during the development, two interesting male-associated transcripts were detected: Smp_159110, a “hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate”; and Smp_174700, a hormonal receptor “hepatocyte nuclear factor 4-alpha” (hnf-4-alpha). In this context and regarding more precisely the hormonal system, the steroid pathway was strongly male-associated from cercariae to adult stages (Table 2): seven enzymes, three receptors and many other products involved in cholesterol perception and transport, or lipid metabolism were differentially expressed in males. In this category, the “ecdysone induced protein 78c like” (Smp_000340) is an interesting candidate as it is known to be a transducer of an ecdysone signal in *S. mansoni* (Wu et al., 2008). In addition, a sex-specific exploitation of blood nutriments reinforced the male importance of steroidogenesis: we detected three male-associated “saposin containing proteins”, involved in lipid degradation. Besides of the steroid pathway, three and five genes respectively involved in thyroid hormones and insulin pathways were also sex-biased.

Host-pathogen interactions

Still in the context of host-pathogen cross-talk, but focusing on immunogenic aspects: 96 genes encoding peptidases and proteases were differentially expressed between males and females. In cercariae, four genes encoding “nardilysin” and three “leishmanolysin-peptidase” were more expressed in males. Besides, two “elastases” (serine-proteases), one invadolysin and another matrix-metallopeptidase were more expressed in females. In addition, seven protease inhibitors, six genes encoding “venom-allergen-like” (VAL) molecules and six “microexons genes” were either male or female biased. In addition, we detected 63 tegumental antigens and receptors differentially expressed between males and females: nine “tetraspanin” were mainly male biased.

A



B

RNAseq experiment ID	Gene ID	Chromosomal location	Predictive product	Sex of bias	Fold changes		
					a. Cercariae	b. s#2	c. Adults
XLOC_011364	Smp_137890	3	homeobox protein 4	Switch	♀ 3,25	N.A.	♂ 2,11
XLOC_012123	Smp_138390	3	homeobox protein nkx-like	♂	N.A.	N.A.	4,91
XLOC_005605	Smp_154800	1	homeobox protein	♂	6,24742E+11	N.A.	12,02
XLOC_026961	Smp_145200	PSA4 zw	homeobox protein engrailed- partial	♂	51,04	N.A.	N.A.
XLOC_029617	Smp_127240	SC_0125	homeobox protein six-related	♂	62,60	N.A.	3,14
XLOC_013486	Smp_144380	3	muscle segment homeobox d	♂	3,12	N.A.	2,27
XLOC_015065	Smp_009040	4	pou4 brn-3	Switch	♂ 5,76	N.A.	♀ 3,51
XLOC_005689	Smp_063520	1	pre-b-cell leukemia transcription factor 4	Switch	♂ 32,46	N.A.	♀ 3,11
XLOC_031472	Smp_161280	SC_0177	homeobox domain containing protein 100*	♀	190,73	N.A.	N.A.
XLOC_017332	Smp_136900	4	homeobox protein distal-less dlx	♀	17,26	N.A.	N.A.
XLOC_033843	Smp_199560	SC_0331	homeodomain transcription factor 1	♀	2,91	N.A.	N.A.
XLOC_009767	Smp_146580	2	homeobox protein meis3	♀	3,44	N.A.	N.A.
XLOC_006593	Smp_173830	SC_0010	homeodomain transcription factor 2	♀	4,13	N.A.	N.A.
XLOC_003667	Smp_079260	1	lim homeobox protein	♀	40,28	N.A.	N.A.
XLOC_002958	Smp_144120	1	lim homeobox protein awh	♀	33,97	N.A.	N.A.
XLOC_006267	Smp_097470/175710	1	homeobox protein aristaless-related	♀	59,18	N.A.	N.A.
XLOC_031015	Smp_169500	SC_0164	antennapedia-like homeobox protein ★	♀	26,68	N.A.	N.A.
XLOC_028932	Smp_149570	SC_0062	pou class transcription factor 1-a-like	♀	3,78	N.A.	N.A.
XLOC_010806	Smp_140350	2	homeobox protein aristaless-related	♀	79,11	N.A.	N.A.
XLOC_024624	Smp_017020.1	PSA4 zw	visual system homeobox 2	♀	1,51263E+12	N.A.	N.A.
XLOC_027318	Smp_163140	PSA4 zw	pituitary homeobox	♀	26,01	N.A.	N.A.
XLOC_011525	Smp_129490	3	lim homeobox protein lhx5-like	♀	18,77	N.A.	N.A.
XLOC_000614	Smp_035650	1	homeobox protein aristaless-related	♀	4,39	N.A.	N.A.
XLOC_014466	Smp_138140	SC_0124	gsx family homeobox protein	♀	392,44	N.A.	N.A.
XLOC_016808	Smp_053520	4	homeobox protein aristaless-like 3	♀	12,93	N.A.	N.A.
XLOC_029282	Smp_128060	SC_0097	homeotic protein spalt-major	♀	4,43	N.A.	N.A.
XLOC_016875	Smp_160670	4	paired box protein pax-6 qPCR 100* ★	♀	93,86	N.A.	N.A.
XLOC_006236	Smp_027990	1	nk homeobox 2-1	♀	27,59	N.A.	N.A.
XLOC_002197	Smp_164180	1	par domain protein	♀	4,36	N.A.	N.A.
XLOC_017450	Smp_170750	4	paired box protein pax-6 ★	♀	141,35	N.A.	N.A.
XLOC_028377	Smp_045470	SC_0037	Prospero-like homeobox domain cont. prot. qPCR	♀	145,88	N.A.	N.A.
XLOC_011527	Smp_129480	3	lim homeobox 5	♀	26,43	N.A.	N.A.
XLOC_012965	Smp_013600	3	nk homeobox protein	♀	128,76	N.A.	N.A.
XLOC_005102	Smp_126560	1	orthopedia homeobox protein	♀	77,69	N.A.	8,45
XLOC_024267	Smp_162760	PSA4 zw	homeobox protein prospero	♀	N.A.	N.A.	3,21
XLOC_007651	Smp_142430	2	paired box protein pax-1-related	♀	N.A.	N.A.	1,86014E+11
XLOC_000398	Smp_123910	1	lim homeobox protein lhx2- partial	♀	N.A.	N.A.	2,18
XLOC_032224	Smp_174610	SC_0204	lim homeobox protein lhx3-like isoform 1	♀	4,50	N.A.	8,68
XLOC_007652	Smp_142440	2	retinal homeobox 1a	♀	N.A.	4,05	N.A.

FIGURE 3. Overview of the 39 homeotic genes displaying a sex-biased pattern of expression in at least one stage of development*: General clustering of sex-biased homeogenes (A). Table of gene IDs, chromosomal location, putative products and bias of expression (B). Key: PSA = PseudoAutosomalRegion, ZW = Sex Chromosomes, 100* = transcripts that belong to the 100 best-hits, qPCR = sex-bias validated by qPCR experiment, Stars indicate genes of particular interest, N.A. = no sex-bias of expression.*

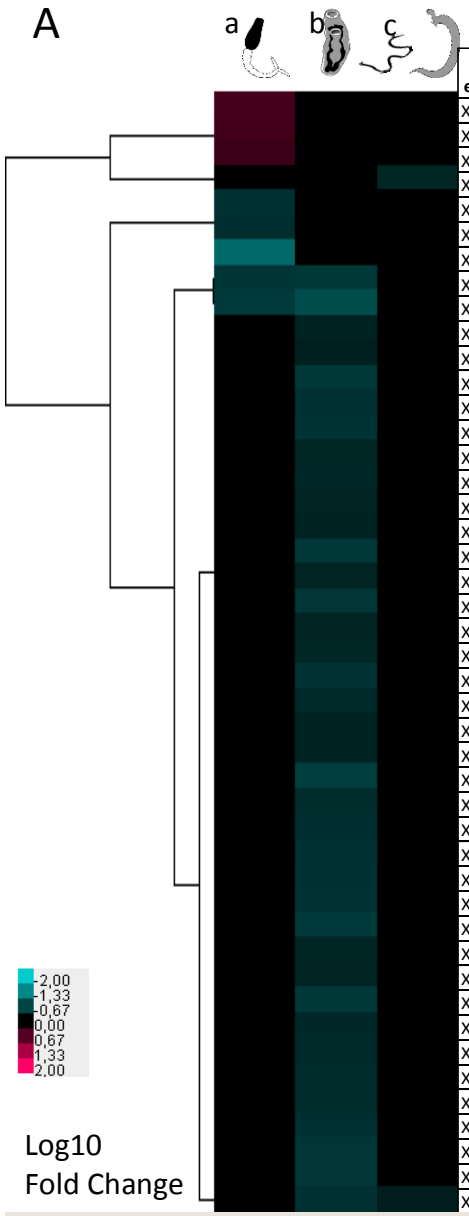
Gene ID	RNAseq experiment ID	Predictive product	Chromosomal location	Sex of bias	Fold Change		
					Cerc.	S#2	Adults
MALE ASSOCIATED HITS							
Smp_131430	XLOC_020743	Steroid dehydrogenase 100*	6	♂	N.A.	N.A.	0,14
Smp_178940	XLOC_019794	Steroid dehydrogenase	6	♂	N.A.	N.A.	0,15
Smp_039130	XLOC_031720	Niemann-pick c1	SC_0182	♂	N.A.	N.A.	0,43
Smp_000340	XLOC_013919	Ecdysone-induced protein 78c-like	SC_0044	♂	N.A.	N.A.	0,39
Smp_168560	XLOC_014202	Steroid dehydrogenase	3	♂	0,05	N.A.	N.A.
Smp_031180	XLOC_022172	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase...	Z1 ♂z	♂	0,01	N.A.	N.A.
Smp_011000.1	XLOC_019699	Lipase 1 sterol esterase	6	♂	0,06	N.A.	N.A.
Smp_139200	XLOC_006888	Nuclear hormone receptor nor-1	1	♂	0,07	N.A.	N.A.
Smp_081430	XLOC_007239	Retinol dehydrogenase 11	1	♂	0,05	N.A.	N.A.
Smp_212430	XLOC_010372	Nuclear hormone receptor	2	♂	2E-12	N.A.	N.A.
Smp_212440	XLOC_010374	Nuclear hormone receptor	2	♂	4E-12	N.A.	N.A.
Smp_134390	XLOC_022289	Sterol o-acyltransferase 1	Z1 ♂z	♂	0,04	N.A.	N.A.
Smp_058980	XLOC_016831	Oxysterol-binding protein 1	4	♂	0,28	N.A.	N.A.
Smp_146950	XLOC_010670	Low-density lipoprotein receptor	2	♂	0,01	N.A.	N.A.
Smp_144850	XLOC_021589	Oxysterol-binding protein 1	7	♂	0,26	N.A.	0,50
Smp_163610	XLOC_028219	Glutathione S-transferase	SC_0013	♂	0,04	N.A.	0,15
Smp_172730	XLOC_025257	Fatty aldehyde dehydrogenase	Z1 ♂z	♂	0,24	0,28	0,48
Smp_175090	XLOC_022547	Long-chain-fatty-acid ligase	Z2 ♂z	♂	0,10	0,35	0,27
Smp_166500	XLOC_029395	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase...	SC_0111	♂	N.A.	0,31	0,53
Smp_054160	XLOC_031085	Glutathione s-transferase	SC_0166	♂	N.A.	0,33	0,27
Smp_159420	XLOC_023760	Low-density lipoprotein receptor	PSA4 ♂zw	♂	N.A.	0,39	N.A.
Smp_086190	XLOC_008361	Progestin and adipoq receptor family member vi	2	♂	N.A.	0,38	N.A.
Smp_167200	XLOC_001919	ATPase family aaa domain-containing protein 3	1	♂	N.A.	0,34	N.A.
Smp_004220	XLOC_010130	Fatty-acid amide hydrolase 1	2	♂	N.A.	0,43	N.A.
Smp_102070	XLOC_018319	Glutathione s-transferase m1	5	♂	N.A.	0,47	N.A.
Smp_016490	XLOC_016024	Saposin b domain-containing protein	4	♂	N.A.	N.A.	0,26
Smp_000260	XLOC_013930	Saposin containing protein	3	♂	0,07	N.A.	0,53
Smp_130100	XLOC_009806	Saposin containing protein	2	♂	N.A.	N.A.	0,32
Smp_014570	XLOC_008031	Saposin containing protein	2	♂	N.A.	N.A.	0,29
FEMALE ASSOCIATED HITS							
Smp_099670	XLOC_007916	Lipoprotein receptor	2	♀	6,39	N.A.	N.A.
Smp_033930	XLOC_034712	Phosphatidylcholine transfer protein	SC_2144	♀	7,33	N.A.	N.A.
Smp_156400	XLOC_002643	Cytochrome p450	1	♀	10,70	N.A.	N.A.
Smp_120070	XLOC_024337	Retinol dehydrogenase 11	PSA4 ♀zw	♀	83,68	N.A.	N.A.
Smp_099670	XLOC_007916	Lipoprotein receptor	2	♀	6,39	N.A.	N.A.
Smp_174750	XLOC_010596	Coup transcription factor	2	♀	14,40	N.A.	N.A.
Smp_016180	XLOC_003273	Nuclear hormone receptor	1	♀	3,68	N.A.	N.A.
Smp_196050	XLOC_031165	Low-density lipoprotein receptor	SC_0169	♀	73,06	N.A.	N.A.
Smp_034860	XLOC_003869	Nuclear hormone receptor	1	♀	28,26	6,30	N.A.
Smp_139680	XLOC_024341	Retinol dehydrogenase 11	PSA4 ♀zw	♀	N.A.	N.A.	1,8E+11
SWITCH OF SEX BIAS							
Smp_105420	XLOC_008222	Prosaposin-like protein 100*	2	Switch	N.A.	2,59	0,29

Table 2: Sex-biased hits associated with lipid metabolism and steroid pathway.

DNA/RNA modifications and transcription control

We then focused our study on molecular mechanisms that regulate directly or indirectly transcription and RNA-transcripts: 339 hits were related to “transcription, DNA and/or RNA processing”. Most of all were male-biased (mainly in schistosomula s#2): 37 among the 59 “Chromatin structure regulation” hits, 42 among the 45 “splicing machinery and factors” hits (Figure 4), 46 among the 49 “post-splicing control and mRNA modifications” hits. Eight of the splicing factors were previously shown as *Tra-2.1* or *Tra-2.2* partners. As part of the post-splicing regulators, we particularly detected two "apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like" (APOBEC) known to generate protein diversity by mRNA editing: Smp_142220 (male-biased in adults) and Smp_144450 (male biased in cercariae and adults).

A



B

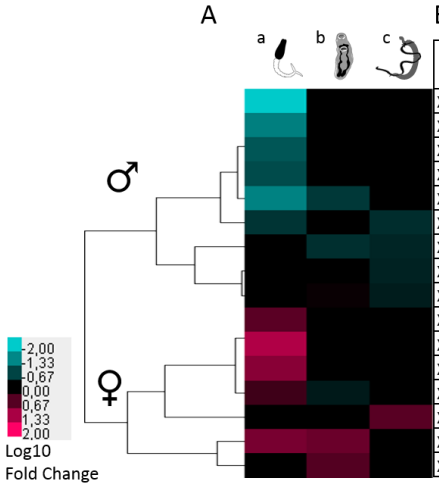
RNAseq experiment ID	Gene ID	Predictive product	Chromosomal location	Sex of bias	Fold Change		
					a. Cerc.	b. S#2	c. Adults
XLOC_018681	Smp_143920	integrator complex subunit 9	5	♀	3,53	N.A.	N.A.
XLOC_003821	Smp_035310	sfrs11 protein	1	♀	3,39	N.A.	N.A.
XLOC_001666	Smp_141630	splicing factor 3b subunit 1	1	♀	2,92	N.A.	N.A.
XLOC_029827	Smp_059360	pre-mrna-splicing factor 18-like	SC_0129	♂	N.A.	N.A.	0,41
XLOC_020022	Smp_089400	beta-catenin-like protein 1	6	♂	0,33	N.A.	N.A.
XLOC_001561	Smp_005160	muscleblind-like protein 3	1	♂	0,35	N.A.	N.A.
XLOC_027208	Smp_039810	muscleblind-like protein	PSA4	♂	0,09	N.A.	N.A.
XLOC_022759	Smp_078420	pre-mrna-processing factor 6	Z2	♂	0,30	0,29	N.A.
XLOC_031937	Smp_019690	Splicing factor U2AF (U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor)★	SC_0187	♂	0,27	0,17	N.A.
XLOC_013050	Smp_105860	ski interacting protein	3	♂	N.A.	0,46	N.A.
XLOC_022226	Smp_093100	splicing factor u2af 35 kda subunit isoform x2 ★	Z1	♂	N.A.	0,49	N.A.
XLOC_027559	Smp_016990	methylosome subunit picln 100*	PSA4	♂	N.A.	0,28	N.A.
XLOC_007775	Smp_068420	small nuclear ribonucleoprotein sm d3 ★	2	♂	N.A.	0,34	N.A.
XLOC_018039	Smp_069870	u1 small nuclear ribonucleoprotein a ★	5	♂	N.A.	0,30	N.A.
XLOC_024342	Smp_032320	fus-interacting serine-arginine-rich protein 1	PSA4	♂	N.A.	0,42	N.A.
XLOC_000613	Smp_141330	u2 small nuclear ribonucleoprotein a	1	♂	N.A.	0,41	N.A.
XLOC_028712	Smp_104660	nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1	SC_0049	♂	N.A.	0,44	N.A.
XLOC_026292	Smp_017890	u4 tri-snrnp-associated protein 2 isoform x2	PSA4	♂	N.A.	0,45	N.A.
XLOC_004980	Smp_005860	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k	1	♂	N.A.	0,28	N.A.
XLOC_027457	Smp_075560	small nuclear ribonucleoprotein sm d2	PSA4	♂	N.A.	0,45	N.A.
XLOC_026507	Smp_025130	pre-mrna-splicing factor rbm22	PSA4	♂	N.A.	0,29	N.A.
XLOC_021876	Smp_021540	splicing factor 1-like	PSA1	♂	N.A.	0,44	N.A.
XLOC_018928	Smp_179270	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	6	♂	N.A.	0,41	N.A.
XLOC_025771	Smp_011710	a1 cistron-splicing factor partial	Z3	♂	N.A.	0,32	N.A.
XLOC_019799	Smp_009400	serine arginine repetitive matrix protein 2	6	♂	N.A.	0,38	N.A.
XLOC_018040	Smp_069880	u1 small nuclear ribonucleoprotein a ★	5	♂	N.A.	0,46	N.A.
XLOC_019477	N.A.	splicing factor 3b subunit 5	6	♂	N.A.	0,46	N.A.
XLOC_030263	Smp_067420	splicing factor subunit 49kda	SC_0142	♂	N.A.	0,25	N.A.
XLOC_007344	Smp_096810	splicing factor 3b subunit 2	1	♂	N.A.	0,36	N.A.
XLOC_024185	Smp_071640	arginine serine-rich splicing factor	PSA4	♂	N.A.	0,35	N.A.
XLOC_016739	Smp_043100	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2 b1 homolog	4	♂	N.A.	0,33	N.A.
XLOC_027983	Smp_076880	splicing factor 3a subunit 2	SC_0013	♂	N.A.	0,33	N.A.
XLOC_026073	Smp_046980	pre-mrna-splicing factor 38a	Z3	♂	N.A.	0,32	N.A.
XLOC_027706	Smp_137430	splicing factor 3b subunit 3	Zwunplaced	♂	N.A.	0,27	N.A.
XLOC_004633	Smp_152740	u3 small nucleolar rna-associated protein 4	1	♂	N.A.	0,43	N.A.
XLOC_024759	Smp_064590	splicing factor	Z1	♂	N.A.	0,45	N.A.
XLOC_006780	N.A.	fus-interacting serine-arginine-rich protein 1	1	♂	N.A.	0,29	N.A.
XLOC_032401	Smp_054600	pre-mrna-splicing factor spf27-like	SC_0214	♂	N.A.	0,40	N.A.
XLOC_009795	Smp_113200.1	splicing arginine serine-rich 2 ★	2	♂	N.A.	0,38	N.A.
XLOC_014497	Smp_098890	splicing arginine serine-rich 7	3	♂	N.A.	0,38	N.A.
XLOC_005866	Smp_170570	pre-mrna processing protein prp39-related	1	♂	N.A.	0,37	N.A.
XLOC_001685	Smp_036270	arginine serine-rich splicing factor ★	1	♂	N.A.	0,34	N.A.
XLOC_017499	Smp_053940	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2 homolog 1 ★	4	♂	N.A.	0,29	N.A.
XLOC_034346	Smp_091320	u1 small nuclear ribonucleoprotein c	SC_0622	♂	N.A.	0,29	N.A.
XLOC_026001	Smp_180070	gem-associated protein 5	Z3	♂	N.A.	0,33	0,52

FIGURE 4: Overview of the 45 splicing-linked genes presenting a sex-biased pattern of expression in at least one stage of development: *General clustering of gender-enriched genes expression (A). Table of gene IDs, chromosomal locations, putative products and expression bias (B). Key: N.A. (i) GeneID=Non Annotated on genome v5.2 OR (ii) Foldchange=No signifiative sex-bias, 100*=transcript present in the 100 best-hits, Stars indicate products of particular interest.*

miRNA precursors

We finally intersected the 7,168 sex-biased hits to the all known miRNAs in *miRBase.* 16 homologies with *Schistosoma mansoni* miRNAs were identified, nine were male-biased exclusively, six were female-biased exclusively and one was alternatively female-biased in cercariae and male-biased in schistosomula (Figure5). Almost all of them were previously experimentally determined (2013) with the exception of sma-mir-125b that was only computationally predicted (Souza Gomes et al. 2011). Twelve of these hits corresponded to the entire predicted precursor and four transcripts contained only the 3' mature miRNA. Only one of them was previously described as sex-biased: sma-mir-281-3p (Marco et al. 2013) and the authors predicted *Smad2* (TGFb transducer) as one of its putative targets. The putative role of miRNAs in male differentiation and maintain of masculinization was reinforced by male-biased transcription of two main components of the RISC complex (RNA-induced silencing complex): the "Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1" also known as "Tudor domain-containing protein 11" (Smp_118190) in adults and the endoribonuclease "Dicer 2" (Smp_033600) in cercariae.

A



B

RNAseq experiment ID	miRNA homology	Chromosomal location	Sex of bias	Fold Change		
				a. Cerc.	b. S#2	c. Adults
XLOC_006836	sma-mir-125b	1	♂	0,01	N.A.	N.A.
XLOC_004251	sma-mir-8409-3p	1	♂	0,06	N.A.	N.A.
XLOC_009582	sma-mir-8428	2	♂	0,14	N.A.	N.A.
XLOC_007976	sma-mir-8429	2	♂	0,18	N.A.	N.A.
XLOC_017143	sma-mir-8446	4	♂	0,05	0,28	N.A.
XLOC_025201	sma-mir-8459	Z1 X z	♂	0,30	N.A.	0,36
XLOC_028658	sma-mir-2162-3p	SC_0049	♂	N.A.	0,34	0,43
XLOC_022489	sma-mir-8465	Z1 X z	♂	N.A.	N.A.	0,45
XLOC_027304	sma-mir-8469	Z3 X z	♂	N.A.	N.A.	0,53
XLOC_004797	sma-mir-125c	1	♀	5,20	N.A.	N.A.
XLOC_024750	sma-mir-1a	PSA1 X zw	♀	24,68	N.A.	N.A.
XLOC_021781	sma-mir-8458	7	♀	11,78	N.A.	N.A.
XLOC_025377	sma-mir-96-3p	Z2 X z	♀	3,09	N.A.	N.A.
XLOC_019312	sma-mir-8451	6	♀	N.A.	N.A.	4,98
XLOC_017349	sma-mir-281-3p 100*	4	♀	8,87	6,93	N.A.
XLOC_032455	sma-mir-8483	SC_0218	♀	N.A.	4,53	N.A.

FIGURE 5: Overview of the 16 sex-associated miRNAs through three stages of the schistosome lifecycle.
(a: cercarie, b: schistosomula s#2, c: adults)
General clustering of gender-enriched miRNA expression (A), table of IDs, chromosomal locations and expression bias (B).
Key: PSA = PseudoAutosomalRegion, ZW = Sex Chromosomes, Z = Zspecific gene, 100 = transcripts present in the 100 best-hits), N.A. = no sex-bias of expression.*

Male- and female-specific chromatin remodeling: ChIPseq approach

RNA-seq data highlighted sex-specific differences in the transcription of genes involved in chromatin modifications. Therefore, we used ChIP-Seq against H3K27me3 as a proxy to study genome-wide chromatin structure of *S. mansoni*. We generated an average enrichment profile for H3K27me3 on cercariae and adults, in distinct samples of both sexes (supplementary file 3). In males, the tri-methylation of H3K27 is removed from cercariae to adults whereas the average profile from female cercariae to adults remains the same (Figure 6 and supplementary file 3). In addition, the comparison between males and females show that male and female adults display the same profile whereas the profile in cercariae differs between the two sexes (Figure 6). Therefore, our results show that some specific chromatin structure differences exist between male and female. Male-specific chromatin remodeling occurs from cercariae to adults and confirms RNA-seq results which highlighted an overrepresentation of chromatin modifier enzymes in males.

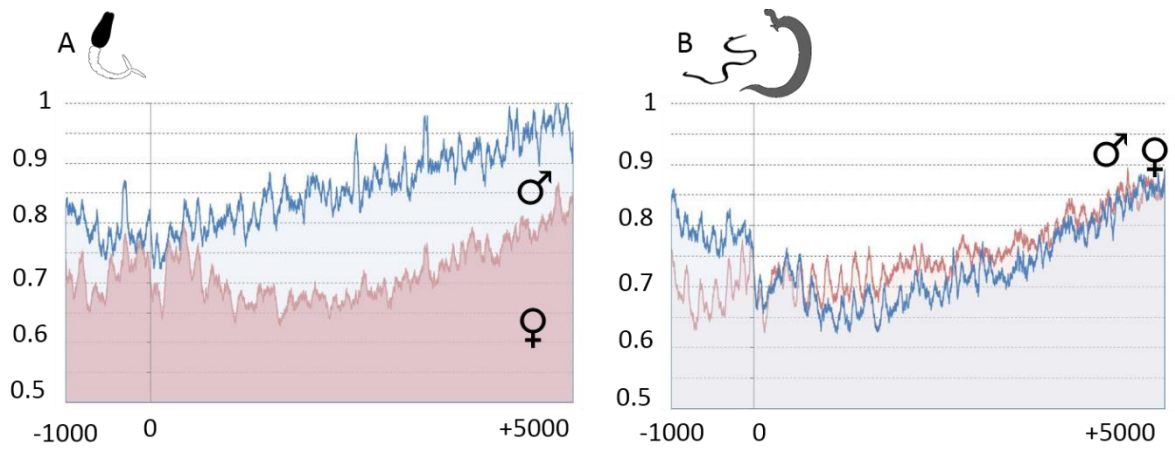


Figure 6. H3K27me3 EpiChIP profile on chromosome 1
X axis represents the position in bases relative to the transcriptional start site (TSS = position 0), Y axis represents the normalized mean enrichment of reads obtained after a ChIP targeting the H3K27me3 mark on cercariae (A) and adults (B). The EpiChIP enrichment has been calculated around the TSS of the chromosome 1 transcripts obtained in our RNA-Seq experiment. It has been normalised with the same mean enrichment of reads obtained after a ChIP without antibody. The mean profile for two male biological replicates (blue) and three female biological replicates (pink) are represented, at two stages of development: cercariae (left) and adults (right). The profile for each replicate is provided in the supplementary file 3. The same profile was obtained on the chromosome ZW.

Discussion

Schistosomatidae species are unique among the 24,000 classically hermaphroditic species of trematodes because they are gonochoric (Loker and Brant 2006). It seems clearly established that *Schistosomatidae* have acquired separate sexes when they invaded warm blooded animals (Loker and Brant 2006; Basch 1990; Beltran and Boissier 2008): ancestors of *Schistosomatidae* were parasites of reptilians and they switched from hermaphroditic to gonochoric system concomitantly to the infection of birds or mammals (Platt et al. 1991; Platt and Brooks 1997). This may be explained by both genetic and environmental non-exclusive hypotheses (Loker and Brant 2006). Indeed, gonochorism enables blood environment colonization: (i) sexual dimorphism allows both resistance to mechanical constraints and reproductive success by deposit of eggs, and (ii) obligatory allofertilization allows genetic diversity providing benefice to adapt and to fight against the sophisticated immune system. We provide here the comparative transcriptome of male and female *S. mansoni* through five stages of development from undifferentiated larval cercariae to dimorphic adult worms. The analysis of the three *in vivo* developmental stages of schistosomula was never reported before. Our functional analysis allows us to bring out three important aspects of schistosomes development, sex determination and somatic sexual differentiation: (1) Parasites interact in a sex-specific manner with their vertebrate host. (2) Several candidate regulators of sexual determination/differentiation are sex-biased during the development and thus could be involved in the fascinating schistosome sexual biology (Mone and Boissier 2004). (3) Sex-specific chromatin structure exists and is sex-specifically modified during development.

Host-Parasite crosstalk has a central role in parasite development and sex determination/differentiation

The obligate implication of the host system regarding the parasite development has received many attention (Briggs 1972; De Mendonça et al. 2000; You et al. 2009; Nakazawa et al. 1997; Eloi-Santos et al. 1992; Osman et al. 2006; Freitas et al. 2007; LoVerde et al. 2007; Beckmann et al. 2012; You et al. 2011; Ahier et al. 2009; Vicogne et al. 2004) as interfering with the host environment perception might be a possible therapeutic target (You et al. 2011; Morel et al. 2014). Spectacular cases of hermaphroditism in *S. mansoni* adult worms that developed in a non-permissive host are further indisputable illustrations of host environment importance in the reproductive biology of schistosomes (Cioli et al. 1977; Neves et al. 2003). In our study, we confirm all these previous biological and molecular observations on host perception and exploitation and we further identify new unprecedented molecular candidates which could play a pivotal role during the tight crosstalk that occurs between the host and *S. mansoni* interaction. At the cercarial stage, the main issue of the parasite is to encounter its host: cercariae are specialized in the function of locomotion (they actively seek skin contact), host invasion and preparation of their maturation in adult worms (Dorsey et al. 2002; Pereira et al. 2013). Then in vertebrate stages, parasites have to overcome the immune system of the host, to develop into males and females, and to reproduce. In cercariae, we detected sex-specific catalogs of secreted and/or tegumental molecules allowing host invasion (skin penetration first, and resistance to immune system then). Among them, micro-exon genes encoding for variant secreted proteins (DeMarco et al. 2010), proteases and proteases inhibitors (Curwen et al. 2006), tetraspanins (Tran et al. 2006). In addition, we show for the first time the sex-biased expression of venom-allergen like proteins (Yoshino et al. 2014; Chalmers et al. 2008). The sex-specific pattern of surface protein expression is maintained further in vertebrate stages and could account for the known differences between males and females immunogenicity and pathogenicity (Dumont et al. 2007). At the time of host invasion in cercariae, males appear to be responsive to more-specific (*i.e.* chemical) stimuli and thus they are certainly more efficient to encounter their host. This could explain the parasite sex-specific structure, considering both the male-biased *sex-ratio* (in addition to male-favorable development stage, Beltran and Boissier 2010), and the higher genetic dissimilarity in males (Mone and Boissier 2004; Prugnolle et al. 2002). Males maintain this receptiveness in their vertebrate host, presenting large extent of receptors to growth-factors and hormonal pathways. Altogether these data indicate that males have an enhanced perception of the definitive host in comparison to females and confirm the necessity for them to exploit the host endocrine system and growth factors for their development.

Sex-determining/differentiating candidates

Despite the large attention given to *S. mansoni* reproduction biology, no molecular candidates have been shown to be key players of sex determination/differentiation but most of all are related to sexual maturation after pairing. They mainly belong to the TGFb pathway (Knobloch et al. 2007; LoVerde, Osman, and Hinck 2007; LoVerde, Andrade, and Oliveira 2009; Buro et al. 2013) or to the "kinome" (Vanderstraete et al. 2014; Long et al. 2010; Long et al. 2012; Dissous et al. 2011; Dissous et al. 2014; Beckmann et al. 2010) and were identified as new potential target for therapies (Morel et al. 2014). Our transcriptional study allows the identification of three promising candidates with a sex-biased expression that certainly deserve further attention. The "*Mago Nashi protein homolog*" (Mag-1, Smp_103470), that is male biased in schistosomula, is undoubtedly one of the more important candidates detected in our study. Its product is a nuclear factor highly conserved from plants to

animals (Micklem et al. 1997; Newmark and Boswell 1994) and is a sex determined protein in some model organisms: it is necessary for oocyte organization in *D. melanogaster* (Boswell et al. 1991; Newmark and Boswell 1994) and for maintaining oogenesis in *C. elegans* hermaphrodite individuals (Li et al. 2000). A previous experiment carried on *S. japonicum* functionally showed its importance for male testes organization (Zhao et al. 2008). They did not provide any information on female individuals. In *C. elegans*, *Mag-1* interacts with *Fog* and *Tra-2*, and our predictive super-network illustrates the highly intertwined relation of *S. mansoni* male-biased networks of *Tra2.1* and *Tra2.2* and *Mag-1*. Another important candidate is the *Dachshund* gene (*dac*) which is involved in leg patterning and sensory organ development in *D. melanogaster* (Atallah et al. 2014). In this organism, the sex-specific regulation of this developmental gene leads to masculinization of legs. It is thus an example of downstream actor of the sex-differentiation cascade. The zinc finger transcription factor *Gli2* is also a candidate of particular interest for two reasons: (i) It connects three different networks (the male-biased *Fem-1* network, the mixed *Dachshund* network and the female-biased *DMRT* genes networks) and thus could play a pivotal role in "sex-orientation" of the development. (ii) *Gli2* is alternatively male or female biased depending on the *S. mansoni* developmental stage and thus confirms its "bipotentiality" (Koebernick and Pieler 2002). In the sex-differentiation context it can switch to shape the sperm/oocyte decision. This kind of mechanism is known to be involved in germ-line cell decision in hermaphroditic nematodes (Guo et al. 2013). In our study, several sex-switching genes appear alternatively as male and/or female biased depending on the developmental stage. We can easily hypothesize that these genes are particularly sensitive to host environment and molecular dysfunction on these candidates or environment variation could consequently lead to hermaphroditism in *S. mansoni* (Hulstijn et al. 2006; Neves et al. 2003).

Sex-specific chromatin structure exists and changes in sex-specific way during development

Our analysis highlights that the schistosomulum developmental stage is characterized by sex-differences in expression of miRNAs (microRNAs) and genes encoding proteins involved in chromatin reorganization, post-transcriptional events (splicing, mRNA editing), and post-translational regulation. Previous studies have highlighted miRNAs stage- and sex-specific expression (Simões et al. 2011; Marco et al. 2013; De Souza Gomes et al. 2011) and their possible role in female maturation (Sun et al. 2014b). In addition, other non-coding RNAs are involved in sex chromosome evolution (Lepesant et al. 2012). Some schistosome's miRNAs have been detected in the blood of the definitive host which underlines their possible implication in the pathological processes of schistosomiasis (Zhu et al. 2014; Cai et al. 2015). We show here important sex-bias of expression of miRNA precursors in favor of either male or female individuals. Their sex-biased expression may be another argument to explain the differences of pathogenicity between males in females and also underlines that non-coding RNAs certainly desserve further attention for their implication in the sexual biology of schistosomes and their role in the interaction with the human host. Another interesting molecular mechanism highlighted in our study is the sex-biased expression of mobile genetic elements. This aspect undoubtedly needs further investigation because: (i) of their high bias of expression (great proportion among the 100 best hits), (ii) of their particular structural features (intronic localization of genes), and (iii) previous works in model organisms that showed that they could be necessary for reproduction playing a role in sex chromosome inactivation (Lyon 2000). Another interesting aspect of schistosome developmental biology is the intense chromatin remodeling that occurs after penetration into the definitive host (Roquis et al. 2015). We have previously shown that cercariae

chromatin carries a transcriptional silenced signature indicating that transcription is adjourned at this stage. This chromatin signature is lost in schistosomula just after the definitive host penetration. We show here that the male schistosomula development is characterized by an over-expression of genes involved in nucleosome assembly, structural maintenance of chromatin and structural genes encoding for histones compared to female. These transcriptomic observations are confirmed by sex-specific chromatin structural changes as we observe a loss of the H3K27me3 from cercariae to adult in males specifically. This result suggests that the silenced chromatin signature might be a male specific feature. In addition, female cercarial stage is characterized by a strong female over-expression of developmental genes while males are not.

This combination of transcriptomic and epigenetic analyses led us to propose the subsequent scenario (Figure 7, from step 0 to 6): In cercariae, females prepare their development through active transcription of developmental genes while in contrast males are transcriptionally silenced (Step 1). They are still receptive to environmental signals because of anticipation that results from the previous intramolluscan transcriptional activity (Step 0). When parasites meet the definitive host, “silenced marks” are released in males and the change into chromatin structure allows the transcription of genes and thus, male development (Step 2). This development is as intense as the male can efficiently fight against host immune system (Step 3) and has an enhanced perception of host endocrine factors (Step 4). This strategy, tightly regulated by specific chromatin mechanisms, could serve to an enhanced pre-zygotic paternal investment (Step 5) and thus benefit not only the males but also to the females which need males to achieve their maturation (Beltran and Boissier 2008). This ability is essential for the survival and thus the reproductive success of the couple (Step 6). Taken together, transcriptomic and epigenomic analysis highlight molecular mechanisms accompanying male *S. mansoni* sexual differentiation. In contrast, female developmental strategy seems to be focused on intrinsic factors to counterbalance the weak interaction with the host. In addition, no extended sexual differentiation pathway was identified so far in females nor in our transcriptomic study nor in previous genomic works (lack of known W-specific genes). Being a female schistosome is it a “default option”?

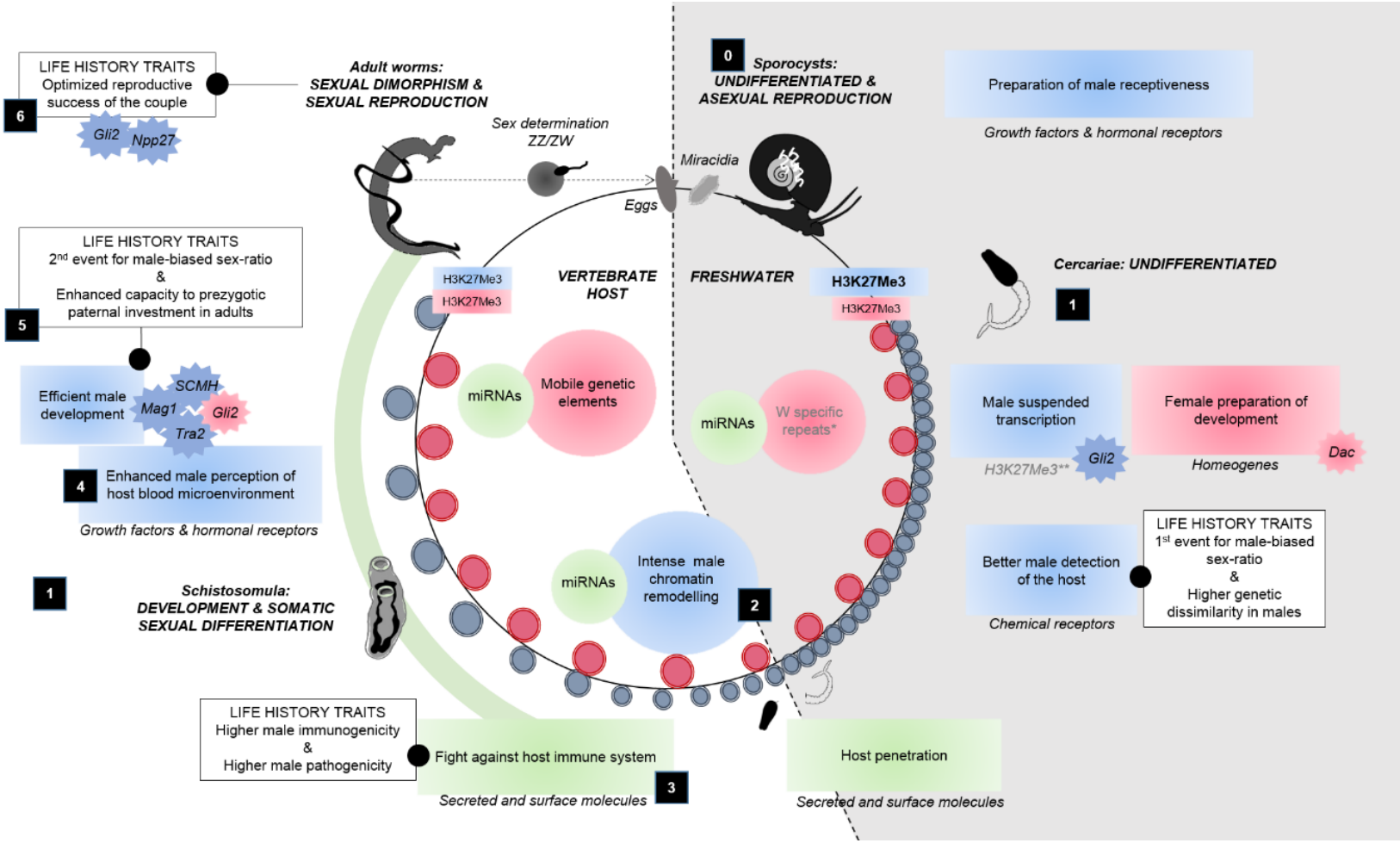


FIGURE 7. General model for sex-biased molecular events through S. mansoni development. *Sex of the individuals is genetically determined at the time of fertilization and the subsequent larval stages are undifferentiated (aquatic stages in grey on the right). The sexual differentiation occurs in the vertebrate host at the schistosomulum stage. Nonetheless, molecular events preparing sex-specific development (blue for males and pink for females) start from the intramolluscan sporocyst stage. In addition to genetic factors, epigenetic regulators (bubbles at the center) and host signals lead to sex-specific growth and differences in life history traits. The combination of these molecular events result in an optimized fitness of the couple. Different candidate regulators of sexual differentiation are represented in stars. Key: Green: differences in male & female catalogs, References: In grey: *Lepesant et al. 2012, **Roquis et al. 2015*

Conclusive remarks and perspectives

In our study we present a model of multi-factorial events combination leading to sexual dimorphism establishment: environmental factors, chromatin modifications and genetic determinants. Our results show that schistosomes have an elaborate interplay with their host, resulting from an old co-evolution. This crosstalk occurs in a sex-specific manner and directly influences the sexual differentiation of the parasite. Our analysis represents a first step towards the identification of sex-pivotal genes and now further studies are required to validate the candidate functions and clarifying the sexual differentiation pathways. These coming works could involve tissue-specific expression, knock-down and/or over-expression of the candidate genes.

Since schistosomiasis represents the second parasitic disease worldwide and affects millions of people, providing new therapeutic targets is a substantial issue for the scientific community (Caffrey 2015). We describe here an *in vivo* transcriptome of developmental stages of both sexes of *S. mansoni.* Our work paves a new way toward understanding the complex molecular interplay that occurs between the host and *S. mansoni* through the sexual differentiation of the parasite, thereby suggesting new potential drug targets and vaccine candidates.

Acknowledgments

The authors are grateful for technical support providing by Anne Rognon, Bernard Dejean and Rémi Emans. We thank Julie MJ Lepesant for improving cercariae total-RNAs extraction. We also thank the "Région Languedoc Roussillon" for financial support to this project (Chercheur d'avenir *Schistosex*).

Supplementary files*

SF1 : PCR and qPCR primers
SF2 : Sorting criteria of *in vivo* schistosomulum stages
SF3 : Bioinformatic workflow and quality of the metrics
SF4 : *De novo* functional annotation and structural analysis of the 100 best P-values: an overview
SF5: Global statistics of qPCR experiment
SF6: Gene Ontologies
SF7: Functional analysis: an overview
SF8: Sex determination/differentiation networks

**Annexe 1 p186.*

NB : Les « supplementary files » SF4, SF5 et SF7 complets, ainsi que des données additionnelles seront disponibles dans la version publiée de ce travail.

Partie 3 : La compensation de dose génique chez *schistosoma mansoni* : études transcriptomiques et structurales.

Ce travail fera prochainement l'objet d'une publication.

Contexte

Comme nous l'avons déjà dit, *Schistosoma mansoni* présente une considérable plasticité développementale au cours de son cycle de vie. Ceci est particulièrement flagrant en ce qui concerne sa différenciation sexuelle tardive où il passe de l'état de larves nageuses libres et indifférenciées à un état parasitaire obligatoire et très dimorphique chez les vers adultes. Ces métamorphoses successives subies par le parasite lors de son cycle peuvent paraître surprenantes si l'on considère que tous ces individus sont porteurs du même patrimoine génétique. Il est dès lors pertinent de s'intéresser aux mécanismes qui régulent l'expression de ces gènes, autrement dit, les mécanismes épigénétiques. Selon sa définition historique, énoncée par Conrad Hal Waddington, l'épigénétique est une science permettant de mettre en relation les gènes et l'environnement pour créer le phénotype des individus et pour expliquer les incohérences du modèle génétique, qui postule une équivalence unique entre phénotype et génotype (ce qui était incompatible avec les phénomènes de différenciation cellulaire !). Ainsi, il semble incontournable d'étudier l'implication de ces mécanismes épigénétiques dans le contexte de la différencition sexuelle chez *S. mansoni.*

Nous allons nous focaliser particulièrement sur les chromosomes sexuels, qui ont déjà été montrés comme étant le siège de ce type de régulation épigénétique au niveau de l'hétérochromosome W (Lepesant et al. 2012). Plus précisemment, nous allons chercher à **caractériser le statut de la compensation de dose génique** : ce mécanisme a déjà été décrit comme étant « incomplet » au stade adulte (Vicoso and Bachtrog 2011). Il s'agit ici de s'intéresser à la **dynamique de ce mécanisme au cours du cycle de vie de *Schistosoma mansoni*, et aux phénomènes structuraux qui l'accompagnent.** Pour cela, nous allons corréler des données transcriptomiques issues de notre précédente étude (Partie 2), et des données d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq).

Matériel et méthodes

Les méthodes d'échantillonnage, de séquençage et de traitement bio-informatique des données ont été décrites dans la partie 2 du chapitre « résultats » de ce manuscrit.

En ce qui concerne l'aspect transcriptomique, les analyses ont été réalisées en parallèle chez des mâles et des femelles, aux stades cercaires, schistosomule s#2 et adultes.

En ce qui concerne l'approche de ChIP-seq, nous allons nous intéresser uniquement aux femelles, qui sont le sexe hétérogamétique, et donc le sexe concerné par le mécanisme de compensation de dose génique. Nous présentons ici l'étude de deux marques portées par l'histone 3 : la tri-méthylation de la lysine 4 (H3K4Me3), une marque considérée comme « permissive » (*i.e.* corrélée avec des

structures euchromatiques) et la mono-méthylation de la lysine 20 (H4K20Me1), une marque plutôt hétérochromatique. Les données concernant la marque H4K20Me1 ont été générées dans le cadre de la thèse d'un autre étudiant du laboratoire (D. Roquis).

Résultats

Analyse des profils transcriptomiques.

A partir des données de transcriptomique sur les stades cercaires, schistosomules s#2 et adultes, nous avons calculé le ratio de l'expression moyenne des gènes provenant de la partie spécifique du chromosome Z sur l'expression moyenne des gènes autosomaux. Il est attendu que ce ratio soit de 1 dans le cas d'un phénomène de compensation de dose globale et soit inférieur à 1 dans le cas d'un phénomène de compensation de dose partielle pour le sexe hétérogamétique (Vicoso and Bachtrog 2011). Nous trouvons un ratio de 0.96, 0.72 et 0.71 chez les femelles cercaires, schistosomules s#2 et adultes respectivement contre 1.04, 1.08 et 1.03 chez les mâles pour ces mêmes stades (Tableau 1). Ce résultat montre qu'il existe une dynamique du système de compensation de dose : une compensation globale chez la femelle cercaire évolue vers une compensation incomplète (*i.e.* gène par gène) aux stades schistosomules et adultes.

***Tableau 1. Ratio de l'expression moyenne des gènes autosomaux sur l'expression moyenne des gènes Z-spécifiques chez* S. mansoni.** *Chez le mâle : le taux d'expression des gènes Z-spécifiques est identique aux autosomaux (Ratio proche de 1, en vert). Chez la femelle : Mécanisme complet de compensation de dose (en vert) ou incomplet (en orange).*

A. Ratios mâles

	Cercaires	Schistosomules	Adultes
Z-spé.	1461.9	1777.3	1372.0
Autosomal	1408.3	1644.6	1332.6
Z:A	1.04	1.08	1.03

B. Ratios femelles

	Cercaires	Schistosomules	Adultes
Z-spé.	942.7	655.9	765.7
Autosomal	983.7	906.2	1073.1
Z:A	0.96	0.72	0.71

L'analyse de la distribution des gènes biaisés sur les chromosomes sexuels montre un biais mâle important de la transcription des zones Z-spécifiques aux stades schistosomules et adultes (Figure 1). Cela peut s'expliquer soit par une sur-transcription spécifique de ces zones chez le mâle (incompatible avec le ratio Z/A=1) soit par une diminution de transcription chez les femelles. Les données d'expression globale montrent effectivement une diminution de l'expression chez les femelles, du stade cercaire vers le stade schistosomule sur la partie spécifique au chromosome Z (Figures 2). Cette diminution de transcription n'est pas observée sur la partie autosomale, ce qui explique la diminution du ratio Z/A.

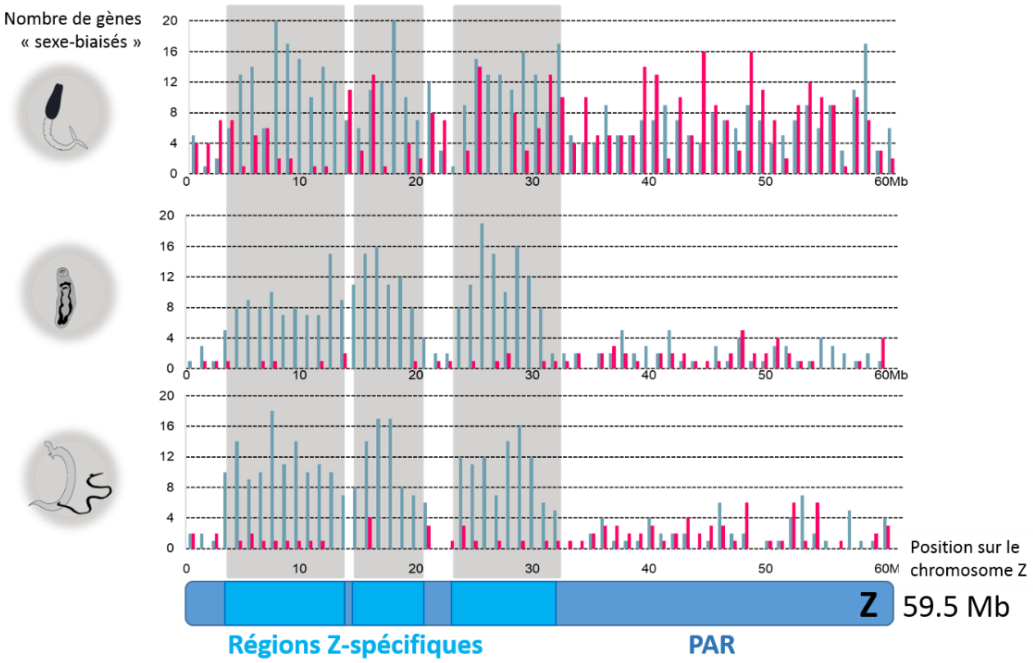


Figure 1. Distribution des gènes biaisés mâles (en bleu) et femelles (en rose) le long du chromosome sexuel Z, aux stades cercaire (en haut), schistosomule (au centre) et adulte (en bas). *L'axe des ordonnées indique le nombre de gènes biaisés à une position donnée. On peut constater une répartition relativement homogène au stade cercaire, alors que les stades schistosomules et adultes sont caractérisés par un biais d'expression mâle des régions Z-spécifiques.*

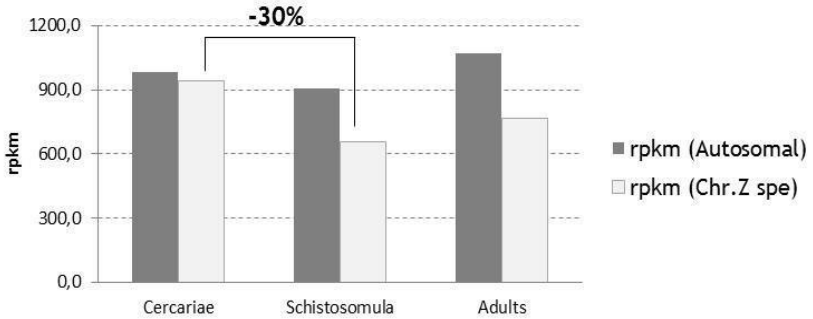


Figure 2. Chez la femelle : niveau d'expression de l'ensemble des gènes aux stades cercaire, schistosomule et adulte *(en rpkm). Provenant de la partie autosomale (en gris foncé) ou Z-spécifique (en gris clair).*

Analyse des profils chromatiniens.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux remaniements de chromatine susceptibles d'intervenir lors d'un phénomène de compensation de dose globale, comme observé chez les organismes modèles (Georgiev et al. 2011; Wells et al. 2012). Dans ce contexte, nous avons étudié des changements de marques d'histones ayant lieu sur la partie spécifique du chromosome Z (qui fait l'objet de la compensation de dose). Dans cette région Z-spécifique et chez les femelles : on observe à la fois un enrichissement en H4K20me1 (marque plutôt hétérochromatique) et un appauvrissement de H3K4me3 (marque plutôt euchromatique) en passant du stade cercaire au stade adulte (Figure 3, graphes de gauche). Cela signerait une structure chromatinienne plus ouverte au stade cercaire, cohérente avec les données de transcriptomique (Pour rappel : une expression globale plus élevée

des gènes provenant de la région Z-spécifique région au stade cercaire par rapport au stade adulte, Figure 2). Le chromosome 1, utilisé comme représentant de profils autosomaux, ne présente pas ce type de remaniement (résultats non montrés), ce qui reste cohérent avec l'analyse transcriptomique et la variation du ratio Z/A. Enfin, afin d'avoir une vision globale de la structure des chromosomes sexuels, nous nous sommes également intéressés aux remaniements chromatiniens ayant lieu dans les parties pseudo-autosomales (Figure 3, graphes de droite). Nous n'observons pas de changement au niveau de l'enrichissement en H4K20Me3, mais un appauvrissement de la marque H3K4Me3. Ainsi, cette région pseudoautosomale subit également un remaniement chromatinien (hétérochromatisation), mais de moindre ampleur. La confrontation de ces deux témoins de la structure chromatinienne nous a permis d'évaluer le degré d'ouverture de la chromatine des régions Z-spécifiques et pseudoautosomales en fonction des stades (Figure 3, colonne de droite ; Tableau 2 et Figure 4).

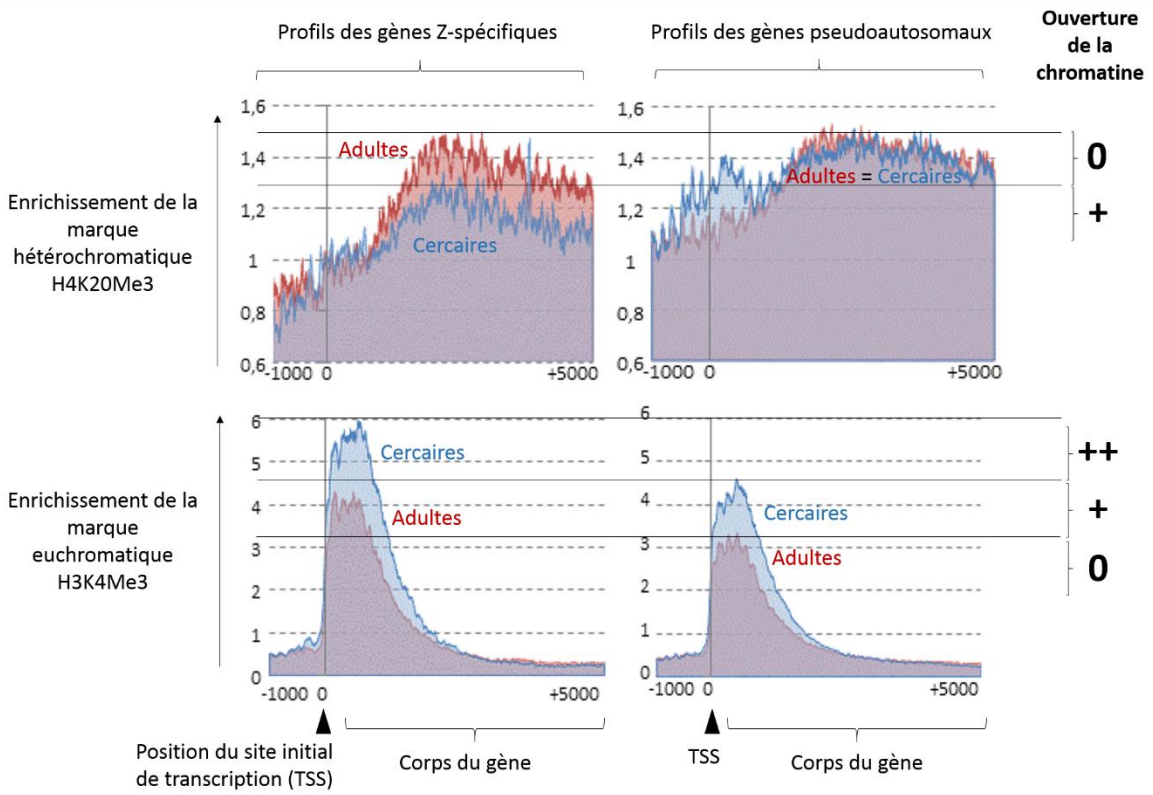


Figure 3. Profils d'enrichissement moyen des marques H4K20Me3 (en haut) et H3K4Me3 (en bas) en fonction de la région des chromosomes sexuels Z-spécifique (à gauche) ou pseudoautosomale (à droite), chez les adultes (en rouge) et les cercaires (en bleu), chez la femelle. *L'enrichissement d'H4K20Me3 est mesuré dans le corps des gènes, alors que l'enrichissement d'H3K4Me3 est plus proche du TSS. La colonne de droite correspond à une estimation du degré d'ouveture de la chromatine. Plus l'enrichissement en H4K20Me3 est fort, moins la chromatine est ouverte (0), et à l'inverse plus l'enrichissement en H3K4Me3 est intense plus la chromatine est ouverte (+ à ++).*
Ces profils d'enrichissement sont obtenus à partir du logiciel EpiChIP.

*Tableau 2. **Confrontation des enrichissements d'H4K20Me3 et H3K4Me3 sur les chromosomes sexuels femelles**. Ils sont représentés entre crochets [ ]. On considère que l'ouverture de la chromatine est proportionnelle à [H3K4Me3] et inversement proportionnelle à [H4K20Me3].*

Région	Stade	-[H4K20Me3]	[H3K4Me3]	Ouverture de la chromatine
Z	Adultes	0	+	+
	Cercaires	+	++	+++
PSA	Adultes	0	0	0
	Cercaires	0	+	+

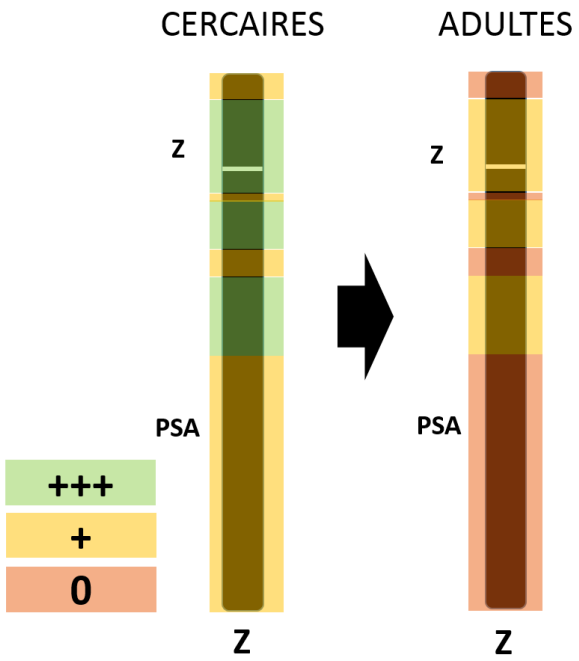


Figure 4. Evolution de la structure chromatinienne du chromosome Z femelle entre les stades cercaires et adultes : *hétérochromatisation de la région Z-spécifique, d'un niveau d'ouverture +++ (vert) vers un niveau + (jaune). Et hétérochromatisation de la région pseudoautosomale, d'un niveau + vers un niveau 0 (orange).*
NB : Un niveau « +++ » (vert) représente arbitrairement un niveau maximal d'ouverture de la chromatine alors qu'un niveau « – » serait le niveau le moins ouvert.

Discussion

Nous proposons donc ici un modèle pour **l'implication de phénomènes chromatiniens participant à la mise en place de la compensation globale chez *S. mansoni* au stade cercaire**, intégrant les précédants résultats générés au sein de notre laboratoire dans le cadre de la thèse de J. Lepesant (Figure 5). Pour rappel, cette étude montrait une transcription des séquences répétées W-spécifiques sous forme de longs ARNs non-codants durant les stades larvaires, qui s'éteignait au stade adulte. Cette diminution de transcription était corrélée à leur hétérochromatisation (Lepesant et al. 2012).

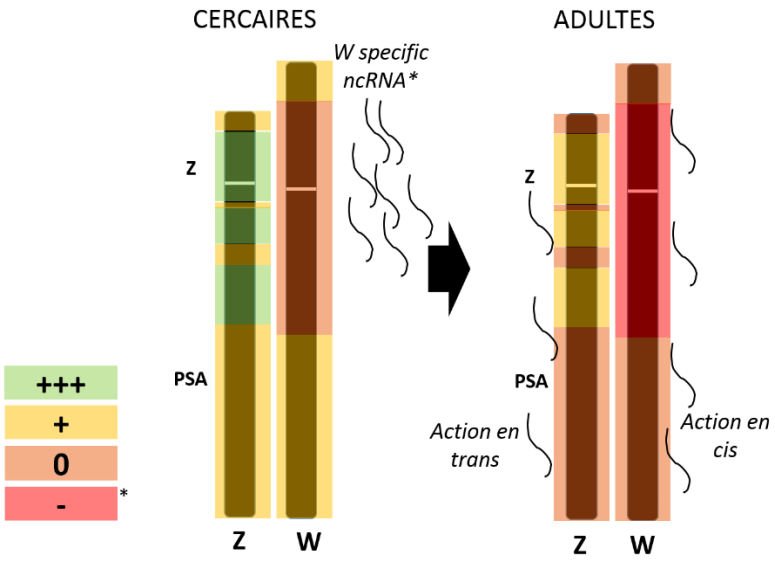


Figure 5. Evolution de la structure chromatinienne des chromosomes sexuels femelles entre les stades cercaires et adultes. *Les ARNs non codants W-specifiques synthétisés pendant les stades larvaires auraient une action hétérochromatisante en cis (sur le W) et en trans (sur le Z) afin notamment de moduler les mécanismes de compenssation de dose chez* S. mansoni.
**Lepesant et al. 2012*
NB : Un niveau « +++ » représente arbitrairement un niveau maximal d'ouverture de la chromatine alors qu'un niveau « – » (rouge) est le niveau le moins ouvert.

Nous proposons, au stade cercaire et chez la femelle, que l'appauvrissement pour la marque H4K20me1 concomitante à l'enrichissement pour la marque H3K4me3 dans la **partie spécifique au chromosome** Z permettent **d'augmenter l'expression globale des gènes situés dans cette région** par une **structure « ouverte » ou « permissive » de la chromatine**. Cela induirait ainsi la compensation globale à ce stade larvaire. Ce modèle s'apparente au phénomène d'hypertranscription du chromosome X observé chez la drosophile (Lucchesi et al. 2005). De plus, il met en jeu la marque H4K20me1 connue pour son implication dans l'inactivation du chromosome X des hermaphrodites chez *Caenorhabditis elegans* (Lucchesi et al. 2005). Par la suite, **l'hétérochromatisation de la région Z-spécifique entraînerait un changement de l'expression des gènes, et la compensation de dose deviendrait alors un phénomène gène par gène** (RatioZ:A<1) tel que décrit précédemment (Vicoso and Bachtrog 2011). L'intégration de ce modèle à celui proposé précédemment par notre équipe (Lepesant et al. 2012), permet d'imaginer **une action « *en trans* » des séquences répétées W-spécifiques, participant au mécanisme d'hétérochromatisation du chromosome Z, et ainsi à la dynamique de la compensation de dose.** Ainsi, les phénomènes chromatiniens proposés à l'échelle évolutive comme des moteurs de l'évolution des chromosomes sexuels chez *S. mansoni* (Lepesant et al. 2012) seraient également, à l'échelle du cycle parasitaire, des acteurs pivots du système de compensation de dose génique. Chez les espèces ZZ/ZW il a déjà été décrit des mécanismes de détermination du sexe dose dépendant, c'est le cas du poulet (Smith et al. 2009) et de la sole (Chen et al. 2014). **La dynamique du mécanisme de la compensation de dose au cours du cycle de vie du parasite, et sa régulation fine par des mécanismes chromatiniens, nous conduit à supposer qu'il a une implication active dans le déterminisme sexuel chez *Schistosoma mansoni*.** La mutiplication des études sur les organismes non-modèles, dont la nôtre, permet de dire aujourd'hui que la compensation de dose n'est pas une simple conséquence de l'évolution des chromosomes sexuels mais peut être un acteur important du développement.

Partie 4 : Développement méthodologique de la culture *in vitro* des stades schistosomules.

Introduction

Nous avons vu, tant dans notre revue bibliographique en introduction que dans les résultats de notre étude transcriptomique globale, que les interactions hôte-parasites occupent un rôle central dans le développement des schistosomules. Néanmoins, le développement intra-vertébré présente deux inconvénients majeurs : l'asynchronie de développement (décrit dans la partie 1 de nos résultats) et l'inaccessibilité des phases juvéniles. Or, tant pour les approches de validations fonctionnelles que pour le développement de nouvelles thérapies, il apparaît important de contourner ces inconvénients du mode de développement parasitaire. De nombreuses études se sont ainsi intéressées à la mise au point de protocoles de culture *in vitro* (Basch 1981; Mann et al. 2010; Brink et al. 1977; Milligan and Jolly 2011). Il a été montré que dans les stades précoces de développement, les schistosomules cultivés *in vitro* seraient très semblables à des parasites *vivo* (Protasio et al. 2013). Ces stades juvéniles de développement sont donc utilisés pour de nombreuses approches tanscriptomiques (Gobert 2010; Parker-Manuel et al. 2011; Protasio et al. 2012), ou pour des criblages moléculaires à visée thérapeutique (Panic et al. 2015; Pereira et al. 2013).

Dans le contexte de la biologie reproductive de *Schistosoma mansoni*, et surtout de sa différenciation sexuelle, ce développement méthodologique revêt un enjeu particulier : depuis les travaux de Basch (Basch 1981), il n'a jamais été décrit de développement *in vitro* jusqu'au stade adulte. Nous vous présentons ici nos efforts d'amélioration de la culture *in vitro* : ils ont permis l'optimisation de cette culture à moyen terme (un mois post-transformation), mais restent infructueux pour ce qui est de la différenciation sexuelle des schistosomules. Nous allons décrire (1) un protocole général de mise en culture, de maintien et d'évaluation de cette culture ; (2) une expérience justifiant notre choix de méthode de transformation (*i.e.* étape critique de la mise en culture) ; (3) un exemple de suivi et d'évaluation d'une culture.

1. Protocole général

Le protocole général de culture *in vitro* des schistosomules (de l'émission des cercaires aux conditions de maintien de la culture), est adapté à partir du matériel et méthode décrit en 2010 par *VH Mann et al.* (Mann et al. 2010). Nous avons été en contact régulier avec son équipe, dirigée par le Docteur Brindley au *George Washington University Medical Center*, et avons apporté nos propres modifications à la procédure. Nous décrivons ici sa dernière version. Les remarques en italique sont des réflexions menées *a posteriori* et pouvant aider à l'amélioration du protocole.

a. Mise en culture

(1) Afin de provoquer l'émission des cercaires monoclonales, les mollusques infestés sont placés dans des piluliers individuels contenant de l'eau de Volvic (non chlorée), sous une source lumineuse, à une température aux alentours de 25°C. Au préalable, leur coquille a été nettoyée pour ôter les rotifères, petits parasites des mollusques dont les résidus métaboliques sont toxiques pour les cercaires.
(2) Les cercaires ainsi émises sont ensuite récoltées dans des tubes, placées à l'obscurité et dans de la glace : les cercaires étant thermo et photosensibles, ces conditions entraînent leur dépôt au fond

des tubes. On procède ensuite une série de trois lavages des cercaires par centrifugation (4°C, 300G, 10min) dans du DPBS (+2% Antibiotiques). Elles sont par la suite remises en suspension dans une solution à 37°C (DMEM, 1% HEPES, 2%Ab) dans laquelle elles vont subir la transformation.

(3) L'étape de transformation correspond à l'étape cruciale pendant laquelle les cercaires vont perdre leur queue, simulant ainsi le passage dans l'hôte vertébré. À la différence du protocole décrit par VH Mann, qui préconise l'utilisation d'un système de seringues à émulsion, nous transformons les cercaires par une minute de vortex à vitesse maximale. Cette méthode donne des résultats plus reproductibles, car indépendants de la force du manipulateur.

(4) Les corps des cercaires, ainsi devenus schistosomules, sont ensuite séparés des queues par une centrifugation (450G, 10min, accélération et frein minimums) sur gradient Percoll : 1ml de solution, contenant les individus (préalablement concentrés par centrifugation), est déposé sur 10ml de gradient (Pour deux gradients : 12 ml Percoll, 2 ml 10× PBS, 0.5 ml 100 mM Hepes, 0.5 ml antibiotique (*i.e.*Pénicilline/streptomycine) et 5 ml d'eau stérile). Le culot de schistosomules (plus denses que les queues) est repris, puis lavé trois fois dans la solution de DMEM.

(5) Les schistosomules sont ensuite mis en culture dans du milieu Basch169 (Tableau 1*, Basch, 1981)*, à 37°C et 5% CO2.

<u>Remarque sur la densité des individus en culture :</u> Nous avons cultivé 200 individus par puits (sur des plaques de 96 puits) ce qui est très supérieur aux densités cultivées par l'équipe du Dr. Brindley : 250 à 500 individus (sur des plaques de 24 puits) ou 2000 à 12000 individus (sur des plaques de 6 puits). Des tests pour déterminer la densité optimale seraient pertinents : équilibre entre la consommation nutritive (et l'acidification du milieu) et les facteurs sécrétés par les individus. Nous avons noté un comportement « grégaire » des schistosomules ce qui nous laisse penser que les échanges chimiques entre eux peuvent être « stimulateurs ».

<u>Remarque sur le milieu de culture :</u> Le BME (ou Basal Medium Eagle) contient du rouge phénol (i.e. accesseur de l'acidité du milieu), or ce composant peut imiter l'action de certaines hormones stéroïdes. Hors, comme nous l'avons vu dans notre approche globale, il est probable que ce type d'hormone ait une action sur le développement du parasite (Arora 2013). *Ainsi à l'avenir il serait pertinent d'éviter l'utilisation de BME.*

<u>Remarque sur le sérum :</u> Basch notait l'influence de l'utilisation de différents lots de sérum, il convient ainsi, lors d'un protocole de mise au point de la culture, de conserver toujours le même lot de sérum. A l'inverse, un test préalable de différents lots peut permettre une optimisation du milieu de culture. Il n'a été relevé aucun avantage à désactiver ce sérum avant la mise en culture.

Tableau 1. Milieu Basch 169 (Basch 1981)

Composants	Concentration initiale	Concentration finale
Basal Medium Eagle	1X	-
Serum de Veau Foetal	1X	10%
Penicilline/Streptomycine	1X	2%
Schneider	1X	5%
Lactalbumine	100g/L	1g/L
Glucose	100g/L	1g/L
Hepes	1M	10mM
Insuline	800ug/ml	8ug/ml
MEM	100X	0,5X
Serotonine	1mM	10^{-6}M
Hydrocortisone	10mM	10^{-6}M
Triiodotyronine	2mM	2.10^{-7}M
Hypoxanthine	1mM	5.10^{-7}M

b. Maintien de la culture

(1) Le milieu est quotidiennement remplacé de moitié par du milieu frais.

(2) Au troisième jour, le milieu est supplémenté par des érythrocytes (*i.e.* globules rouges) de souris afin de nourrir les schistosomules. Comme évoqué en introduction il a été montré que l'ajout d'érythrocytes favorise le développement des schistosomules *in vitro* (Gobert 2010).

(3) Une fois par semaine, nous procédons à un lavage par gravitation : les schistosomules sont récoltés dans un tube, en présence de la solution de lavage au DMEM puis mis à l'étuve 30 minutes. Le surnageant est ensuite extrait en totalité, permettant ainsi de retirer les érythrocytes afin de les renouveler. Les schistosomules ainsi débarrassés de leurs déchets sont resuspendus dans du milieu Basch (adjuvé en érythrocytes frais), et remis en culture à 37°C et 5% de CO2.

c. Obtention des érythrocytes de souris

Les érythrocytes de souris sont obtenus par ponction de sang dans le ventricule droit de souris mâles. Le sang extrait est mis en présence de Dextran (50µl/ml de sang) afin d'éviter sa coagulation, puis centrifugé 15min à 3000 rpm pour séparer la fraction liquide (plasma) de la fraction cellulaire. 100uL du culot cellulaire (phase la plus inférieure contenant normalement les hématies) sont resuspendus et subissent une série de lavages par centrifugation dans 900µL de TBS (10mM Tris/HCl pH 7,5 + 150mM NaCl). Ils sont ensuite conservés à 10% dans du milieu RPMI (milieu souvent utilisé pour la culture de cellules humaines), à 4°C.

Afin de réguler l'apport en érythrocytes nous proposons de les quantifier grâce à une cellule de Mallassez (hémocytomètre). Les tubes préparés selon le protocole décrit ci-dessus présentaient une concentration de 1 million de globules rouges / mm^3. Ils sont dilués 20 fois dans le milieu de culture (10µl pour un puits de 200µl), la concentration finale avoisine donc 50000GR par mm^3, ce qui est très inférieur à la concentration du sang humain : 4 à 6 millions d'érythrocytes par mm^3. Le puits est néanmoins tapissé d'hématies et un apport supplémentaire s'est avéré inutile, voire délétère en terme de déchets cellulaires potentiellement contaminants.

<u>Remarque sur la préparation des érythrocytes :</u> L'équipe du Dr. Brindley propose une étape de séparation de la fraction cellulaire sur gradient de Ficoll permettant d'éviter la présence de globules blancs dans le milieu.

d. Evaluation du taux de mortalité de la culture

Le taux de mortalité de la culture peut être évalué selon des critères de morphologie (forme, opacité) et de mobilité. Si deux de ces trois critères sont anormaux alors on considère l'individu comme étant mort. En effet, un individu mort peut conserver une transparence normale (Figure 1A), ou une forme normale (Figure 1B), ou bien présenter encore des mouvements contractiles (Figure 1C). Quant à l'anormalité d'un seul de ces critères, elle peut correspondre à un mauvais état physiologique, mais peut également être insignifiante, ainsi, afin d'être le plus objectif possible, nous ne prendrons pas en compte ces individus-là.

Le taux de mortalité de la culture peut être également déterminé par marquage à l'iodure de propidium (utilisé au 1/400ème, 30min à 37°C). C'est un colorant vital, ne pénétrant que chez les individus morts et émettant alors une fluorescence rouge (Figure 2A et C flèche1). Le témoin positif de ce marquage est constitué par des schistosomules chauffés dix minutes à 65°C (Figure 2A). Les individus vivants quant à eux ne présentent pas de fluorescence significative (Figure 2B et C flèche2).

<u>Solutions alternatives :</u> Estimation de la viabilité de la culture au Fluoresceine diacetate qui fluoresce chez les individus vivants et qui est souvent utilisé en combinaison avec l'iodure de propidium que nous utilisons.

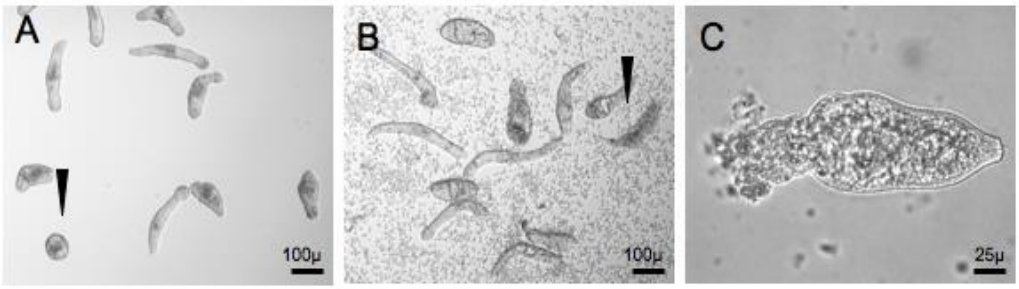


FIGURE 1. Critères morphologiques de mortalité
Forme anormale + Absence de mobilité (A), Opacité + Absence de mobilité (B), Forme + Opacité (C)

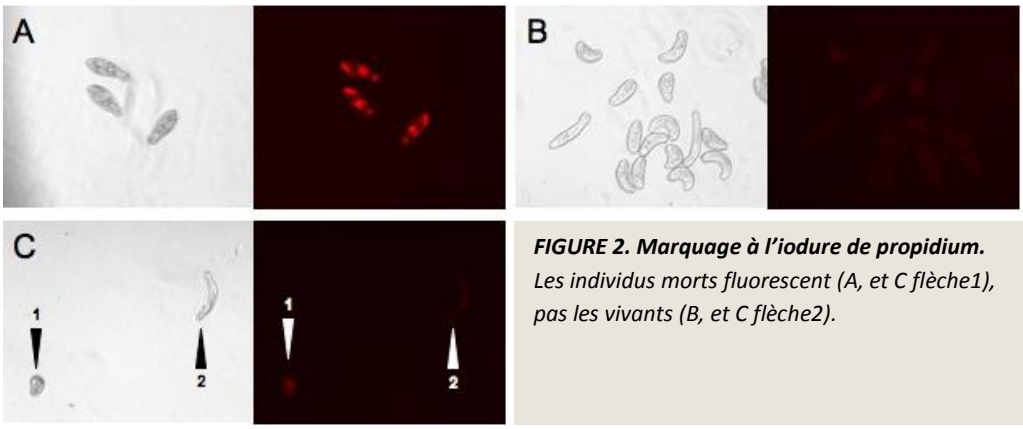


FIGURE 2. Marquage à l'iodure de propidium.
Les individus morts fluorescent (A, et C flèche1), pas les vivants (B, et C flèche2).

2. Choix du protocole de transformation cercarienne.

La première transformation morphologique du parasite à son entrée dans l'hôte vertébré a lieu lors du passage du stade cercaire au stade schistosomule : c'est la perte de la queue bifide. Cette étape cruciale est appelée « transformation cercarienne ». Cette transformation a normalement lieu lors de la traversée active de l'épiderme, et s'accompagne d'un remodèlement de la surface membranaire (Skelly and Shoemaker 2000), et d'un relargage du contenu des glandes pré- et post-acétabulaires (Brink et al. 1977). Il existe différentes stratégies de simulation de cette étape lors de la mise en culture *in vitro* mais il semblerait qu'elles aient peu d'influence sur le profil transcriptomique des premiers stades de schistosomules (Protasio et al. 2013).

C'est cette étape qui a fait l'objet de notre première mise au point : l'objectif de cette expérience était de déterminer la technique de transformation (seringue à émulsion ou vortex) la plus efficace (en termes de corps cercariens obtenus) et la moins stressante (en terme de viabilité des schistosomules). Nous avons déterminé que le **vortex** est la technique permettant d'obtenir le plus **grand nombre de corps cercariens** (Tableau 2). La culture faisant suite à ce mode de transformation est par ailleurs la **plus viable** (résultats non montrés).

Tableau 2. Comparaison du nombre d'individus obtenus par les deux méthodes de transformation.
La transformation à la seringue à émulsion présente une efficacité moindre de 30%.

	Vortex Duplicat 1	**Vortex** Duplicat 2	**Seringue** Duplicat 1	**Seringue** Duplicat 2
Corps cercariens (Schistosomules)	**302**	**359**	**257**	**197**
Queues	0	3	0	0
Cercaires entières	1	5	1	0

3. Exemple de caractérisation d'une culture *in vitro* de schistosomules.

a. Taux de mortalité.

Le taux de mortalité a été estimé quotidiennement sur trois semaines dans quatre puits contenant environ 200 individus, par évaluation des critères de mobilité et de morphologie décrit précédemment dans le protocole général. Cette technique d'évaluation a ensuite été confrontée au marquage à l'iodure de propidium sur la première semaine. La mortalité de la culture se situe aux alentours des 5% jusqu'au dixième jour, puis autours des 10% jusqu'au 17ème jour. Elle augmente ensuite quotidiennement jusqu'à la fin de la troisième semaine pour atteindre 25% (Figure 3). Les résultats des six premiers jours ont été confirmés par la technique à l'iodure de propidium (Figure 4).

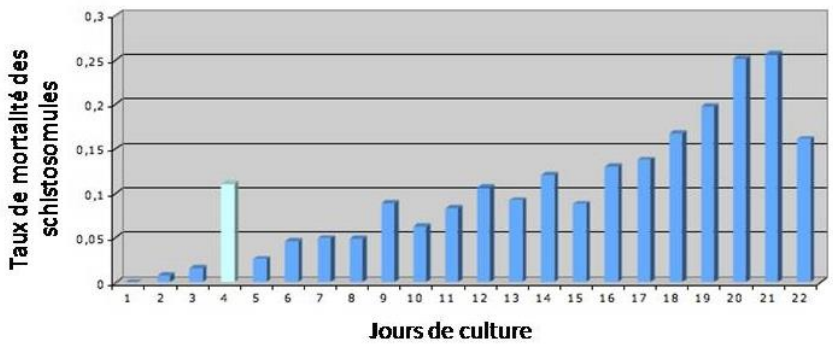


Figure 3. Estimation du taux de mortalité des schistosomules en fonction de caractères de mobilité et de morphologie. *(Le taux de mortalité élevé à J4, en bleu clair correpond certainement à une erreur expérimentale)*

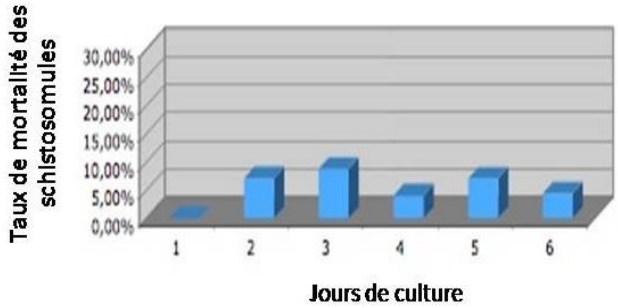


Figure 4. Estimation du taux de mortalité des schistosomules par marquage à l'iodure de propidium.

b. Taux de pigmentation

In vivo, la quantité de sang ingérée est spectaculaire (*i.e.* la femelle peut ingérer quatre fois son volume à l'âge adulte (Skelly et al. 2014). L'hémozoïne est un pigment noir, résultant de la digestion des érythrocytes. La présence de ce pigment révèle une activité métabolique efficace et peut donc être un témoin de viabilité de la culture. Lors de nos expériences de culture *in vitro*, nous avons noté l'apparition d'hémozoïne dès le dixième jour chez 3% des individus. La proportion d'individus pigmentés oscillait ensuite autour de 10% (Figure 5).

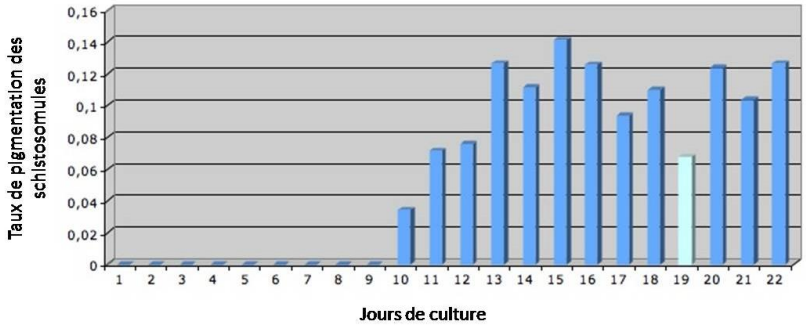


Figure 5. Apparition du pigment digestif chez les schistosomules en culture.
(Le taux de pigmentation diminué à J19, en bleu clair peut correspondre à une variation des conditions de culture comme une lyse des globules rouges)

Grâce à ce pigment, nous avons observé une bifurcation du tube digestif au niveau de la zone acétabulaire comparable à celle observée dans les stades s#1 des schistosomules *in vivo* (Figure 6). Nous avons obtenu en fait un phénotype correspondant au stade de développement θ décrit par Faust en 1934 (Faust and Hoffman 1934). Basch décrivait lui une évolution de sa culture vers les stades les plus avancés : d'une soudure du caecum (stade κ) à J11, jusqu'à l'accouplement à la sixième semaine (Figure 7).

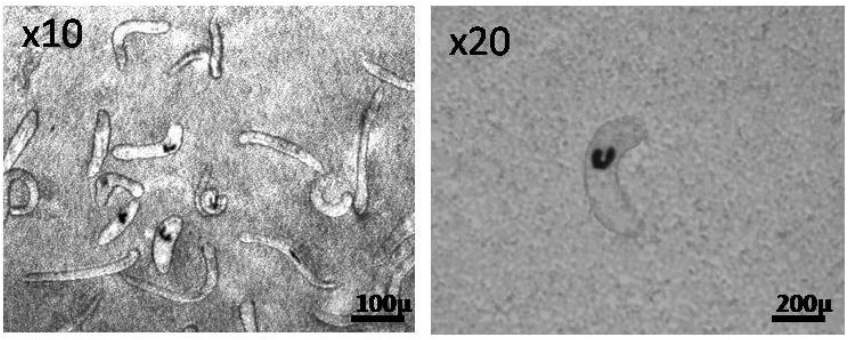


Figure 6. Pigment digestif chez les schistosomules en culture, dix jours après la transformation.

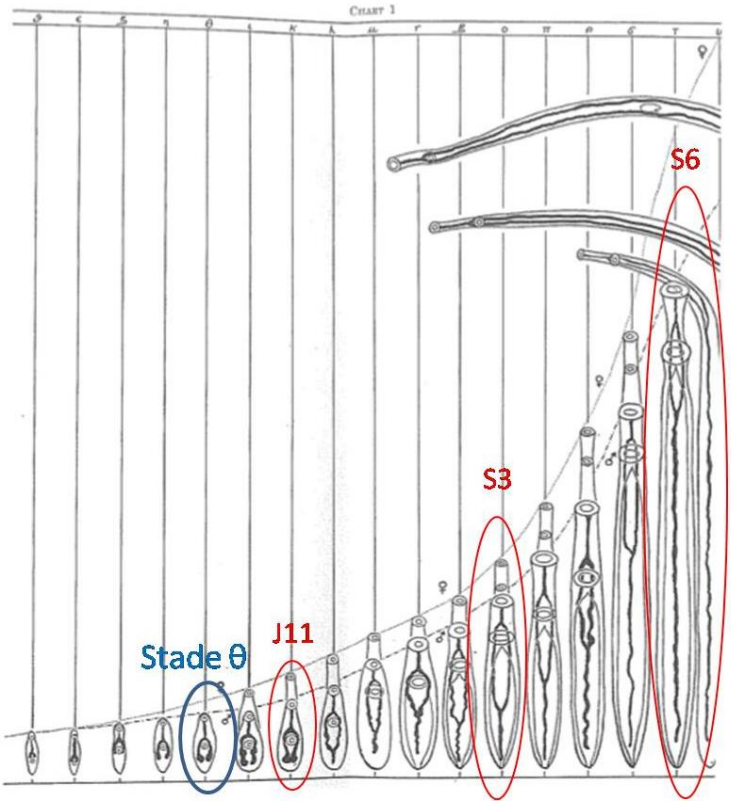


Figure 7. Les différents stades de développement schistosomules in vivo (Faust et al. 1934). *Les schistosomules observés en figure 4 (J10 post-transformation) correspondraient au stade Θ (cerclé de bleu). Basch aurait lui observé les différents stades cerclés de rouge : soudure du caecum au stade κ (J11), apparition du canal gynécophore (Semaine S3), accouplement (Semaine S6) (Basch et al. 1981).*

c. Mesures morphométriques

Le suivi morphométrique des schistosomules en culture montre un allongement conséquent (jusqu'à 60% de plus que la longueur initiale), accompagné d'un affinement des individus (de près de 50%). La diminution d'épaisseur étant plus conséquente que le gain de taille, nous observons en fait une diminution du volume des individus (Figure 8). Basch observait lui une croissance des individus, bien qu'ils présentent toujours une taille de 20 à 40% moindre que dans les infestations *in vivo* (Paul F. Basch 1981).

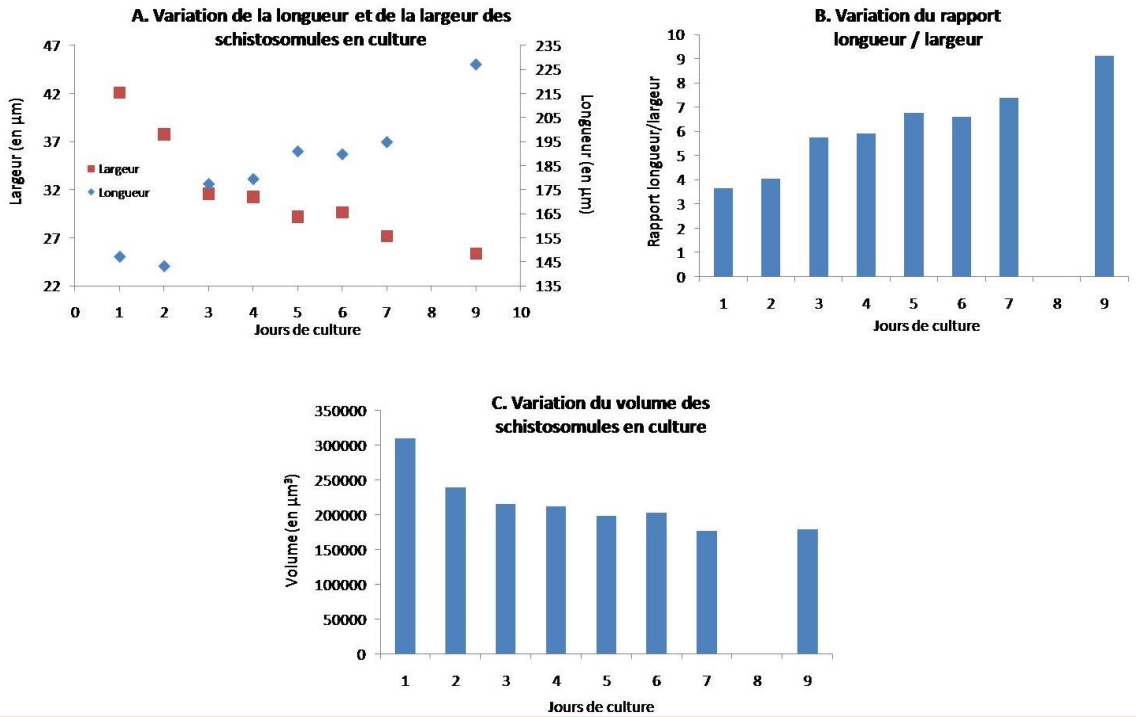


***Figure 8. Evolution morphométrique des schistosomules en culture**. On observe une augmentation de la longueur des individus (A, carrés bleus) et une diminution de leur largeur (A, carrés rouges). Cela se traduit par une augmentation du rapport longueur/largeur (B) et une diminution du volume total des individus (C).*

Synthèse et Perspectives

Nos travaux sur la mise en culture *in vitro* de schistosomules semblent montrer qu'une telle méthode, telle qu'elle est développée aujourd'hui n'est pas pertinente pour une étude à moyen terme des mécanismes du développement (absence de différenciation sexuelle et conservation d'un asynchronisme). Cependant, la viabilité des schistosomules et le développement de certaines activités métaboliques (*i.e.* digestion de l'hème) peuvent laisser penser que l'utilisation des premiers stades suivant la transformation cercarienne peut être pertinente. Par exemple, certains protocoles de validation fonctionnelle proposent une étape d'interférence à ARN *in vitro* suivie d'une réinjection dans l'hôte (Bhardwaj et al. 2011). Cette injection percutanée de schistosomules a par ailleurs été montrée comme étant très efficace en terme de survie des parasites (Vilar and Pinto 2005).

Tenant compte de l'importance des interactions hôtes-parasites et mâles-femelles dans le développement sexuel de *S. mansoni*, plusieurs pistes pourraient permettre d'améliorer cette culture sur le long terme :

(1) Nous pourrions envisager d'enrichir le milieu de culture de facteurs de l'hôte, notamment hépatiques puisque le foie est le lieu du développement des schistosomules *in vivo* (Lawson and Wilson 1980) et que nous avons détecté des récepteurs à ce type de facteur dans notre approche globale. Le milieu Basch est enrichi en différentes hormones, acides aminés ou protéines. Au vu de nos résultats de transcriptomique massive nous pourrions imaginer par exemple le supplémenter en cholestérol ou autre intermédiaire de la voie des stéroïdes. Une analyse plus fine de nos résultats pourrait aussi permettre d'adapter le milieu de culture au sexe des parasites.

(2) Bien que lors d'infestations monoclonales de souris les schistosomules se développent et présentent des phénotypes sexuels immatures mais distincts, il est possible que, dans les conditions stressantes de la culture *in vitro,* la présence mixte de facteurs mâles et femelles facilite leur développement. On peut envisager trois options : (i) des co-cultures (avec une proportion 50/50 de chaque sexe, mais cela interdirait l'étude sexe-spécifique des stades indifférenciés), (ii) échanger les milieux de deux cultures séparées, (iii) utiliser une membrane semi-perméable séparant mâles et femelles d'une même culture.

(3) Enfin, nous pouvons imaginer la détection précoce du mécanisme de différenciation, au niveau moléculaire, en élisant des marqueurs sexe spécifiques pertinents parmi les gènes détectés comme étant différentiellement exprimés entre les mâles et les femelles au stade schistosomule.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

Synthèse

Les schistosomes sont des trématodes à l'histoire évolutive originale. En effet, la **pression de sélection des interactions hôte-parasites a conduit ces parasites à adopter un mode de reproduction gonochorique tout à fait inédit au sein de ce phylum** (Combes 1991). Parmi eux, et dans le contexte de la biologie de la reproduction, *Schistosoma mansoni* est d'un intérêt particulier car il présente un **dimorphisme sexuel prononcé**, associé à un **appariement monogame souvent interprété comme un état intermédiaire entre l'hermaphrodisme et la polygynie** (Beltran and Boissier 2008). Ce caractère ancestral se retrouve également au niveau chromosomique, où il présente des **chromosomes sexuels homomorphes** (*i.e.* de taille équivalente) de type ZZ/ZW (*i.e.* hétérogamétie femelle). Ces gonosomes sont notamment caractérisés par leur grande taille (60Mb, dans un génome de 365Mb assemblé en 8 paires de chromosomes au total) résultant certainement d'un évènement initial de fusion de deux autosomes ancestraux (Tsai et al. 2013). Ils partagent 70% de leur séquence au niveau pseudo-autosomal. Il existe une région spécifique du chromosome Z (discontinue en trois parties) portant 782 gènes. Par contraste, **l'hétérochromosome W ne porte aucun gène qui lui est spécifique**. Il présente cependant un **large « bloc hétérochromatique », constitué presque en totalité de séquences répétées** et notamment de 36 familles de séquences satellites W-spécifiques. Ces séquences W-spécifiques ont fait l'objet d'un précédent travail au sein de notre laboratoire montrant un profil transcriptomique particulier : elles sont **fortement exprimées aux stades larvaires et leur transcription s'éteint ensuite au stade adulte**. Ce phénomène peut être corrélé à un changement de leur structure chromatinienne : **elles s'hétérochromatisent** (Lepesant et al. 2012). Ces remaniements structuraux et fonctionnels aux niveaux des chromosomes sexuels ont été proposés pour être des **moteurs de l'émergence des chromosomes sexuels à l'échelle de l'évolution de l'espèce, ainsi que pour être des acteurs pivots dans l'apparition du dimorphisme sexuel à l'échelle du cycle de vie du parasite** (Lepesant et al. 2012)**, ce que nous avons confirmé et complété dans la présente étude.** En effet, malgré son mode de détermination du sexe syngamique (*i.e.* apparaissant à la fécondation, puisqu'il repose sur l'existence de chromosomes sexuels), *Schistosoma mansoni* présente une **différenciation sexuelle tardive**, qui n'a lieu qu'une fois dans l'hôte définitif vertébré. Le parasite se développe dans les vaisseaux sanguins de cet hôte à sang-chaud, et d'un point de vue évolutif il est à présent admis que le **gonochorisme chez les schistosomes est une adaptation à cet habitat exigeant** (Basch 1990). D'un point de vue moléculaire, et au-delà des contraintes immunitaires et mécaniques à surmonter, de nombreux travaux montrent que ce **micro-environnement sanguin est en fait un élément incontournable du développement des schistosomes** (Hernandez et al. 2004).

La présente étude se situe donc à **l'interface de ces deux aspects, évolutif et moléculaire**. D'un point de vue évolutif, la position phylogénique et le gonochorisme atypique en font un modèle de choix pour s'intéresser à l'évolution des modes de reproduction et de détermination du sexe. D'un point de vue moléculaire, l'absence de gène spécifique de l'hétérochromosome, les remodèlements chromatiniens et le contexte d'interaction hôte-parasite permettent d'envisager une combinaison multifactorielle (génétique, épigénétique et environnementale) permettant l'apparition des phénotypes sexuels.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la question du déterminisme sexuel, et plus particulièrement à la recherche d'un gène déterminant. Les gènes *DMRT*s (*Double-sex and Male-abnormal-3 Related Transcription factors*) constituaient des candidats incontournables de par leur conservation à l'échelle de tout le règne animal dans des mécanismes de déterminisme et de différenciation sexuelle. Quatre gènes *DMRT*s ont pu être déterminés chez *S. mansoni* : ***Sm_dmd1* et *Sm_dmd2*, situés sur des autosomes, semblent être spécifiques du phylum des plathelminthes**, dont tous les autres taxas sont hermaphrodites. Les deux autres *DMRT*s sont pseudo-autosomaux (*i.e.* situés sur la partie recombinante des chromosomes sexuels) : ***Sm_dmd3* et *Sm_dmd4* sont conservés dans plusieurs taxas**, ce qui n'est pas étonnant si l'on considère l'origine pré-eumétazoaire des *DMRT*s (Wexler et al. 2014). Nous avons décrit le profil transcriptomique de trois de ces *DMRT*s (*Sm_dmd1*, *Sm_dmd2* et *Sm_dmd3*) sur cinq stades de développement situés entre les cercaires indifférenciées et les adultes dimorphiques. Tous semblent impliqués dans des **fonctions plutôt femelles au cours des stades de développement intermédiaires appelés schistosomules**. Le gène *Sm_dmd3*, homologue du *dmrt2* humain conservé des invertébrés aux vertébrés (Wexler et al. 2014) présente un **profil de transcription très transitoire qui en fait un candidat particulier au déterminisme sexuel.** Le gène *Sm_dmd2* conserve son biais d'expression femelle, ce qui en fait un **candidat intéressant à la différenciation et au maintien de l'identité sexuelle femelle.** Le troisième gène détecté, *Sm_dmd1*, présente un profil mâle au stade adulte. Ce « switch » peut-être expliqué par un rôle commun lors du développement puis **une implication dans le maintien de l'identité mâle comme c'est le cas chez la planaire hermaphrodite *S. mediterranea*** (Chong et al. 2013). L'implication des *DMRT*s dans d'autres fonctions que la reproduction a été décrite : il semblerait que ce soient des acteurs importants de la neurogenèse (Hong, Park, and Saint-Jeannet 2007). Nous pourrions ainsi imaginer que le gène *Sm_dmd3* soit plutôt impliqué dans les phénomènes de neurogénèse chez la femelle pendant les premiers stades développementaux (ce qui est cohérent avec l'analyse fonctionnelle globale que nous avons mené en parallèle). Il est intéressant ici de relever la **dualité de ce gène dans les fonctions neurales et reproductrices**. En effet, les fonctions sont connues pour être liées chez les vertébrés, notamment à travers l'axe gonadotrope, mais chez les invertébrés cela reste encore peu documenté. La présence de neuropeptides (Marks and Maule 2010; Mousley et al. 2010) et leur implication dans l'établissement de la lignée germinale chez les planaires (Collins et al. 2010) ne peuvent cependant que souligner l'intérêt de ces questions. Dans ce contexte, **certains gènes identifiés dans le cadre de notre approche globale, en lien avec différentes voies du système nerveux et notamment celle des neuropeptides** (non décrits dans ce travail)**, nécessiteraient une attention particulière lors d'études futures**.

Après avoir décrit les profils d'expression sexe-spécifiques des gènes *DMRT*s chez *Schistosoma mansoni*, nous avons proposé une expérience de **validation fonctionnelle** par interférence par ARNs. Cette première tentative est restée infructueuse mais il ne fait aucun doute que ce doit être **un des axes à développer dans la suite de ce projet**. D'un point de vue technique, **deux aspects sont à surmonter : l'artificialité du système de culture *in vitro* et la courte durée de vie des petits ARN-interférents, ce qui est incompatible avec un développement parasitaire *in vivo*.** A l'heure actuelle, le compromis/la stratégie qui nous semble la plus pertinente serait : une transformation mécanique des cercaires en schistosomules juvéniles, car cette étape semble donner des individus viables (partie 4 de notre étude) et proche du système *vivo* (Protasio et al. 2013) ; suivie d'une expérience d'interférence par ARNs. La plupart des études actuelles sont réalisées par des techniques de dsRNAs ou siRNAs (Bhardwaj et al. 2011; Krautz-Peterson et al. 2007), peu adaptées dans le cadre du

développement étant donnée leur efficacité transitoire. Il existe néanmoins des méthodes de transgénèse prometteuses (Hagen et al. 2015; Rinaldi et al. 2012; Alrefaei et al. 2011), mais elles restent encore difficiles à mettre en œuvre. Nous proposons donc deux alternatives: (i) l'utilisation de ***morpholinos*, une technique d'interférence par ARNs très utilisée dans les problématique de développement** depuis sa description dans les années 2000 (Heasman et al. 2000; Heasman 2002), et qui présente l'avantage d'avoir une action « longue durée » ; (ii) presque « évidemment », la mise en oeuvre de la nouvelle méthode **CRISPR/Cas** (Jinek et al. 2012). Plusieurs équipes de notre communauté relèvent actuellement ce défi technique et nous suivons ces évolutions avec une attention toute particulière. Enfin, cette étape cruciale de l'extinction du gène candidat serait suivie de la réinjection dans l'hôte définitif vertébré par voie percutanée, qui permet un développement des parasites dans des conditions *in vivo* optimales (Vilar and Pinto 2005). Nous considèrerons ici le développement des méthodes de culture *in vitro* comme un enjeu un peu « à part », en effet **dans le contexte du développement parasitaire il nous semble peu opportun de nous abstenir des interactions hôte-parasites.** Elle peut cependant revêtir un intérêt particulier dans l'étude de facteurs précis (issus de l'hôte vertébré par exemple) pouvant avoir une action sur le développement parasitaire, ce que nous proposons dans la quatrième partie de nos travaux.

En parallèle de ces études ciblées et de ces défis techniques, nous avons réalisé **une approche transcriptomique inédite chez *Schistosoma mansoni***, qui consiste en la comparaison des **transcriptomes mâles et femelles sur plusieurs stades de développement : le stade cercaire libre et indifférencié, trois stades schistosomules (s#1, s#2 et s#3) intra-vertébré représentant différentes étapes du développement, le stade adulte présentant des mâles et des femelles très dimorphiques.** Parmi les trois stades schistosomules, les deux premiers (s#1 et s#2) sont indifférenciés : s#1 correspond aux individus non encore développés venant d'atteindre le foie. D'un point de vue évolutif, cette absence de différenciation après la phase pulmonaire n'est pas surprenante si on compare cette migration au passage dans le 2nd hôte invertébré des cycles hétéroxènes classique des trématodes (Combes 1991). Le stade s#2 quant à lui correspond aux premières étapes de développement hépatique (Lawson and Wilson 1980). Enfin le stade S#3 est marqué par une différenciation sexuelle somatique de tous les individus, et une différenciation gonadique à différents stades comme décrit dans une précédente étude du développement des organes reproducteurs (Biolchini et al. 2006). Notre méthode morphométrique de tri ne nous permettait pas de contourner cet asynchronisme et c'est certainement pour cela que les réplicats de ce stade de développement présentaient une hétérogénéité ne permettant pas de les inclure dans notre approche globale, que nous avons finalement menée sur les stades cercaires, schistosomules s#2 et adultes. Dans cette étude, nous avons identifié de **nouveaux candidats au déterminisme sexuel.** Le gène associé aux mâles schistosomules ***MagoNashi*** (Smp_103470) a particulièrement retenu notre attention car il est impliqué dans la gamétogenèse de certains organismes modèles et son extinction expérimentale (RNAi) chez une autre espèce de schistosome, *S. japonicum*, entraîne des malformations testiculaires (Zhao et al. 2008). Nous avons établi un réseau des interactions de ce gène et avons souligné une **co-expression de nombreux partenaires potentiels pendant le stade schistosomule mâle**, majoritairement impliqués dans des fonctions d'épissage. Parmi eux nous avons détecté deux gènes *tranformer-2*, dont les hétérologues occupent un rôle pivot dans les cascades de différenciation des organismes modèles *D. melanogaster* et *C. elegans*. Des études futures seront ici nécessaires à la fois pour confirmer la solidité des interactions supposées, et pour identifier potentiellement d'autres partenaires. L'objectif de tels travaux serait à terme de reconstruire la

cascade moléculaire impliquée dans la différenciation sexuelle mâle. Notre analyse fonctionnelle globale nous a également permis de souligner une **plus grande réceptivité des mâles vis-à-vis des facteurs de leur hôte (*e.g.* facteurs de croissance et endocriniens).** Cela pourrait expliquer la meilleure efficacité du développement mâle rapportée dans notre premier travail et au-delà, le biais mâle de *sex-ratio* chez les adultes (Beltran and Boissier 2010). Cette efficacité développementale peut également (et non exclusivement) être le résultat **d'une stratégie transcriptomique tout à fait originale à l'échelle d'un organisme entier** : au stade cercaire, les mâles semblent mettre en place des mécanismes chromatiniens permettant une **pause transcriptomique immédiatement levée à l'entrée dans le vertébré et permettant le déclanchement rapide du développement**. Cette stratégie a fait l'objet d'une très récente publication de notre laboratoire, que nous précisons ici en montrant la spécificité mâle de ce phénomène (Roquis et al. 2015). Ces mécanismes sont **semblables à ceux utilisés par les cellules souches pour maintenir leur pluripotence** (Roquis et al. 2015). Pour les mâles, investir dans leur développement est particulièrement stratégique, si on considère que leur taille est ensuite liée à un meilleur succès reproducteur (Steinauer 2009). L'ensemble des observations faites dans le cadre de cette analyse globale ont ainsi permis de construire un scénario corrélant des mécanismes moléculaires et les traits de vie de cette espèce entre les stades cercaires et adultes.

Nous nous sommes enfin intéressés à un autre aspect important des bases moléculaires de la reproduction chez *S. mansoni* : le **mécanisme de compensation de dose génique.** Nous avons montré, par la **combinaison d'une approche transcriptomique et épigénomique** (étude des modifications d'histones) que le mécanisme de compensation de dose chez *Schistosoma mansoni* présente un caractère **dynamique au cours du cycle de vie du parasite**. Au stade cercaire, une structure très ouverte de la chromatine au niveau des régions Z-spécifiques permet leur surexpression et la mise en place d'une **compensation de dose complète**. Au stade adulte, on observe une hétérochromatisation de ces mêmes régions, conduisant à une diminution de la transcription des gènes qui s'y trouvent et à un statut incomplet de la compensation de dose, tel qu'il avait précédemment été décrit (Vicoso and Bachtrog 2011). Notre étude est ainsi la première à décrire des remaniements de chromatine impliqués dans le phénomène de compensation de dose chez *S. mansoni.* La mise en perspective de ces résultats permet de les intégrer au modèle d'évolution des chromosomes sexuels proposé dans la précédente étude de Lepesant *et al*. (Lepesant et al. 2012) : les ARNs non-codants W-spécifiques auraient une action en *cis* (sur le W) et en *trans* (sur le Z) afin de réguler la structure chromatinienne de ces chromosomes. **La compensation de dose complète pourrait ainsi être associée à l'absence de dimorphisme sexuel durant les stades larvaires et la compensation incomplète pourrait être corrélée à l'apparition et au maintien de phénotypes sexuels différents entre les mâles et les femelles adultes**. Dans le but de tester cette hypothèse, nous envisageons d'analyser le statut de la compensation de dose à d'autres stades larvaires indifférenciés : il sera possible de tester cette hypothèse sur le stade intra-molluscal (l'émission de cercaires permet d'identifier le sexe des parasites). Toutefois, cette hypothèse ne pourra pas être mise à l'épreuve sur le stade *miracidia*, dû à l'impossibilité de déterminer le sexe sur ces stades, et au manque de technique suffisamment performante pour mener ces analyses sur un seul individu. Nos résultats soulignent ici un aspect important, de plus en plus évoqué grâce à l'élargissement des études des systèmes de déterminisme sexuel aux organismes non-modèles (Bachtrog et al. 2014): **la compensation de dose ne serait pas une simple conséquence évolutive de la différenciation des chromosomes sexuels, mais peut jouer un rôle central dans le déterminisme sexuel.** Les

mécanismes chromatiniens spécifiques aux chromosomes sexuels chez *S. mansoni* pourrait ainsi permettre une **spécialisation fonctionnelle (et notamment une masculinisation du chromosome Z) au moment du développement autorisant l'apparition d'un dimorphisme sexuel prononcé, malgré le caractère ancestral non-différencié de ses gonosomes**. Nous pourrions alors parler de **pseudo-dimorphisme chromosomique**. Car en effet, nous aurions pu être intrigués par la non corrélation chez notre modèle du dimorphisme sexuel (phénotypique) avec un dimorphisme chromosomique tel que c'est habituellement décrit (Bachtrog et al. 2014).

Il semblerait qu'il soit possible à plusieurs niveaux de notre étude de **corréler les mécanismes moléculaires ayant participé à l'évolution des chromosomes sexuels et du gonochorisme chez *S. mansoni,* aux mécanismes sous-jacents à la mise en place du dimorphisme sexuel à l'échelle du cycle parasitaire.** A notre sens, cela en fait un modèle de choix en biologie de la reproduction. La compréhension de mécanismes moléculaires à l'échelle du cycle pourrait ainsi permettre la reconstruction de l'histoire évolutive du gonochorisme. Et pourquoi pas même l'inverse : comme nous l'avons vu, *S. mansoni* est une espèce monogame, un mode d'appariement pouvant être qualifié de pseudo-hermaphrodisme (Beltran and Boissier 2008a). L'importance cette association s'illustre par un besoin « urgent » des individus à s'accoupler et lors d'infestation unisexuée il est très fréquent d'observer des accouplements entre mâles. Une étude morphologique du ver mâle insinué dans le canal gynécophore de l'autre a montré une féminisation de son phénotype, qui est non seulement moins musculeux mais surtout présente une atrophie des lobes testiculaires. On peut donc supposer qu'en plus des facteurs de croissance et nutritifs que le mâle fourni à la femelle (déjà très documentés), il ait par ailleurs une **action directe sur sa féminisation**. Nous rejoindrions ici les **mécanismes moléculaires de l'hermaphrodisme protandre** où le développement de l'appareil reproducteur mâle précède, et permet, le développement de l'appareil femelle. Ce mécanisme est décrit chez la planaire qui rappelons-le présente le même profil développemental d'expression du gène *Sm_dmd1* que *S. mansoni* (Chong et al. 2013). Ainsi, **le pseudo-hermaphrodisme chez cette espèce semblerait s'étendre du système d'appariement aux mécanismes moléculaires du développement.** De futurs travaux seront nécessaires afin d'élucider les acteurs moléculaires intervenant dans ce phénomène, permettant ainsi de compléter notre scenario développemental. Une étude récente propose déjà les récepteurs Venus kinase ovariens comme des cibles potentielles d'hormones mâles (Dissous 2015) et notre approche transcriptomique dégage de nombreuses voies hormonales associées aux mâles adultes.

Les travaux présentés ici ont permis d'affiner les connaissances concernant les acteurs moléculaires impliqués dans l'apparition du dimorphisme sexuel chez *Schistosoma mansoni,* nous allons maintenant vous présenter différentes perspectives s'inscrivant dans la continuation de cette étude.

Perspectives

Les gènes à empreinte parentale chez *Schistosoma mansoni.*

Ce travail a été effectué dans le cadre du stage de Master 2 de Julien Kincaid-Smith : « Maternally and paternally imprinted genes in female and male schistosome parasites », sous la direction d'Eve Toulza. Il fera prochainement l'objet d'une publication.

En parallèle des travaux que nous avons présentés ici, nous avons généré des données de transcriptomique sur des adultes mâles et femelles hybrides (et hybrides miroirs) issus d'un croisement entre deux isolats géographiques différents de *S. mansoni* (Guadeloupe : souche SmGH2 et Brésil : souche SmBRE). Un précédent travail de notre laboratoire avait identifié des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) spécifiques de chacune de ces souches (Clément et al. 2013).
Ici, nous proposons d'étudier les gènes à empreinte parentale (*i.e.* maternelle ou paternelle) chez cette espèce: Nous avons comparé les transcriptomes de mâles et de femelles adultes. Les croisements inverses (*i.e.* hybrides miroirs) ont permis de différencier les gènes à empreinte parentale des gènes à effet de souche. Ceci nous a permis de **mettre en évidence pour la première fois des gènes à expression mono-allélique chez un parasite métazoaire**. Chez les **mâles, six gènes à empreinte** ont été identifiés : deux expriment l'allèle paternel et quatre expriment l'allèle maternel. Chez les **femelles, 98 gènes à empreinte parentale** ont été identifiés : 93 expriment l'allèle paternel et cinq expriment l'allèle maternel. L'analyse fonctionnelle reste à ce jour à finaliser mais les premiers résultats montrent que certains gènes identifiés sont potentiellement impliqués dans les différences phénotypiques observées entre les sexes. Nous complèterons cette analyse par l'étude des structures chromatiniennes des gènes identifiés comme étant « soumis à empreinte » (Les données de ChIP présentées dans ce manuscrit sont issues de ces mêmes hybrides).
Parallèlement, cette approche peut également permettre de prédire la position de certains *scaffolds* dont la localisation chromosomique est inconnue à l'heure actuelle : par exemple, une expression de l'allèle paternel de tout un *scaffold* chez la femelle pourrait prédire d'un locus Z-spécifique. Cela permettrait de **mieux caractériser le contenu des chromosomes sexuels, un enjeu central de l'étude du déterminisme sexuel chez *S. mansoni*, comme chez les autres espèces qu'elles soient modèles ou non-modèles.**

D'autres horizons…

Les différentes perspectives développées ici feront l'objet de mon projet de post-doctorat, débutant au mois de février 2016, au sein du groupe de Beatriz Vicoso (Institue of Science and Technology-IST, Vienne, Autriche).

Identification de gènes W-spécifiques (possiblement déterminants).

Nous l'avons vu, pour l'instant aucun gène spécifique du chromosome W (et donc présent uniquement chez les femelles) n'a pu être identifié (Lepesant et al. 2012). Or, si on considère le schéma « classique » d'évolution des chromosomes sexuels (Charlesworth et al. 2005) l'évènement initiateur de la différenciation des chromosomes sexuels pourrait être l'apparition d'un déterminant

femelle sur l'hétérochromosome W. **Il est donc intéressant, si l'on cherche le déterminant sexuel d'une espèce, de décrypter au mieux le contenu de ce chromosome W**. C'est ce que nous proposons de faire chez *S. mansoni*.

Comme pour la plupart des autres modèles, la connaissance du contenu de l'hétérochromosome est souvent limitée car l'accumulation de séquences répétées, rendant l'assemblage des séquences de ce chromosome difficile (fragmentation et génération de nombreux petits *scaffolds*). De nouvelles méthodes d'identification ont été développées chez d'autres modèles. Etant donnée la difficulté technique des études transcriptomiques (*i.e.* étape d'extraction des ARNs nécessitant un grand nombre d'individus) sur notre modèle, nous proposons ici une stratégie basée sur des analyses génomiques : **un assemblage du génome du sexe hétérogamétique serait réalisé, et utilisé comme référence pour l'alignement *des k-mers* issus d'un *short-read sequencing* du sexe homogamétique. Les régions qui ne seraient pas « couvertes » seraient alors identifées comme W-spécifiques** (Carvalho and Clark 2013). Cette méthode pourrait être appliquée à *S. mansoni* dans un premier temps puis élargie aux autres espèces de schistosomes dans une optique d'étude de génomique comparative. Chez *S. haematobium,* comme chez *S. mansoni*, les chromosomes sont très peu différenciés (Grossman et al. 1981) et ainsi les rares gènes W-spécifiques devraient être importants pour la détermination sexuelle. A l'inverse, les chromosomes très différenciés de *S. japonicum* devraient présenter plus de gènes W-spécifiques. **Ce gradient de différenciation des gonosomes, ou cytogénétique (Lawton et al. 2011) chez les différentes espèces de schistosomes en font un modèle de choix pour l'étude de l'évolution des chromosomes sexuels.**

Génomique comparative des régions pseudoautosomales et spécifiques des gonosomes de différentes espèces, problématique de l'évolution rapide du chromosome Z (*i.e. faster-Z evolution*).

Dans le cadre d'une étude de génomique comparative, nous pourrions proposer d'étudier les gènes homologues portés par les chromosomes sexuels des différentes espèces pour reconstituer leur historique (*i.e.* méthode de soustraction ou de couverture génomique pour déterminer les régions qui sont spécifiques à chaque espèce ainsi que les régions conservées). Cela a été fait chez les serpents, d'autres espèces hétérogamétiques femelles au profil gonosomique ancestral (Vicoso et al. 2013). Chez ces espèces il a par exemple été montré une **évolution plus rapide des gènes Z-spécifiques par rapport aux gènes pseudoautosomaux**, à cause de l'hémizygotie Z des femelles. On parle dans ce cas de ***faster-Z evolution*** (Meisel and Connallon 2013). Deux copies du Z étant portées par le mâle, on parle également de ***male-driven evolution*** **: on observe un *sex-ratio* biaisé mâle du taux de mutations** (Li, et al. 2002). Concernant la *faster-Z evolution* chez d'autres espèces hétérogamétiques femelles : les oiseaux ne présentent pas cette évolution rapide du chromosome Z (Mank et al. 2010) et les lépidoptères parfois (Sackton et al. 2014). Cette étude, menée chez le modèle schistosome, permettrait de compléter l'histoire évolutive de ce phénomène au sein des espèces à déterminisme ZZ/ZW.

Le statut du phénomène de *faster-Z evolution* chez les schistosomes pourrait nous renseigner sur les conséquences du biais mâle de *sex-ratio* et du système d'appariement monogame.

Depuis que les mâles ont deux Z (homogamétie ZZ) et les femelles en ont un (hétérogamétie ZW), la taille de population des chromosomes Z est de 2/3 par rapport à la taille de population des

autosomes. Cependant, **si les mâles ont une plus grande variance de succès reproducteur que les femelles, la taille de population des Z au long terme (*i.e.* taille effective de population Z) sera moindre que 2/3** = NeZ/NeA (Laporte and Charlesworth 2002). Ce ratio peut être évalué par comparaison de la densité des SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) entre les autosomes et les gonosomes. Un tel calcul pourra nous donner des indications sur les conséquences de la biologie reproductive des schistosomes: **le biais mâle de *sex-ratio* conduit-il à un phénomène de sélection sexuelle, ou la monogamie la réduit elle ?** (Wright et al. 2015). Notre laboratoire a déjà généré des données pouvant être utilisées pour cette étude : SNPs deux isolats géographiques *de Schistosoma mansoni* (Clément et al. 2013).

Quel rôle pour le chromosome Z dans la spéciation chez les schistosomes ?

Après avoir étudié les conséquences de l'évolution sur la différenciation des chromosomes sexuels, nous pourrions analyser en retour le **rôle de ces gonosomes dans l'évolution des espèces de schistosomes, et plus précisément, dans les phénomènes de spéciation.** Ce phénomène a déjà été étudié chez des systèmes hétérogamétiques mâles XX/XY (Johnson and Lachance 2012) et hétérogamétiques femelles ZZ/ZW : les oiseaux (Storchová et al. 2010; Dhami et al. 2015). Nous l'avons vu, la co-occurence de mâles et de femelles de deux espèces différentes de schistosomes au sein d'un même hôte définitif peuvent conduire à des phénomènes d'hybridation si les espèces ne sont pas trop lointaines phylogéniquement (Jourdane et al. 1995). Il s'agirait ici d'estimer **le taux d'introgression du chromosome Z et des autosomes chez de tels individus hybrides, et d'analyser le flux de gènes entre les deux espèces parentales au niveau du Z** (on s'attend à ce qu'il soit réduit). Par ailleurs, la comparaison de l'expression des gènes entre les parents et les hybrides permettrait de constater **si les hybrides ont une interruption de la compensation de dose, ce qui limiterait les flux de gènes au niveau de ce chromosome**. L'importance des gènes non-compensés chez les hybrides a été étudiée dans d'autres modèles (Wei et al. 2014; Good et al. 2010; Campbell et al. 2013). Ce projet nécessiterait des hybrides naturels entre deux espèces de schistosomes du terrain. Un échantillonnage de tels individus est actuellement en cours dans le cadre de la thèse de J. Kincaid-Smith (Sous la direction de J. Boissier et E. Toulza) au sein de notre laboratoire.

Dynamique des gonosomes : translocation de gènes Z (*i.e. "Out of the Z"* gene movement) et réversion des chromosomes sexuels.

Malgré la conservation des systèmes chromosomiques du déterminisme sexuel (qu'ils soient hétérogamétiques mâles ou femelles) et leur apparente stabilité, le **contenu des chromosomes sexuels est sans cesse soumis à de nouvelles évolutions** et des **transitions entre les systèmes peuvent être observées.**

Concernant les translocations de gènes, de nombreux mouvements de gènes du X vers d'autres régions du génome ont été décrits à la fois chez la drosophile (Betrán et al. 2002) et chez les mammifères (Potrzebowski et al. 2008). Malgré quelques travaux menés chez les espèces ZZ/ZW, ce mécanisme reste relativement inconnu dans ce système (Toups et al.2011): ver à soie (Wang et al. 2012), oiseaux (Ellegren 2011). Compte-tenu du gradient de différenciation des chromosomes sexuels chez les schistosomes, et donc de la proportion variable de locus pseudo-autosomaux, on peut envisager **d'analyser si la différenciation de ces chromosomes s'accompagne de plus de mouvements « *out of the Z* ».**

Nous l'avons vu en introduction, il peut parfois y avoir des transitions entre les systèmes de déterminisme chromosomiques du sexe, ou encore des **réversions de gonosomes redevenant**

autosomes (Vicoso and Bachtrog 2013). En 1981, Grossman et Cain (Grossman and Cain 1981) et Grossman *et al.* (Grossman et al. 1981) rapportaient successivement l'existence de **paires de chromosomes hétéromorphiques chez deux trématodes hermaphrodites** : *Megalodiscus temperatus* qui est un *Paramphistomatidae*, et chez un *Spirorchidae* (*i.e.* espèces sœurs des schistosomes). L'absence de données moléculaires et cytologiques récentes sur ces espèces ne nous permet pas actuellement de confirmer l'existence de tels hétérochromosomes. Néanmoins si ces observations étaient vérifiées par des analyses plus récentes, nous pourrions nous poser les questions suivantes : d'un point de vue évolutif, ces autosomes hétéromorphiques chez des espèces hermaphrodites, **résultent-ils d'une réversion d'anciens chromosomes sexuels** ? Autrement dit, les ***Spirorchidae* étaient-ils anciennement gonochoriques** ? D'un autre point de vue, plus mécanistique, **peut-on imaginer que ces hétérochromosomes soient en fait un support moléculaire aux fonctions mâles et femelles d'un même individu hermaphrodite** ?

L'ensemble de ce travail bibliographique et expérimental, ainsi que les perspectives qu'il ouvre, semblent montrer que les schistosomes, et leur biologie reproductive originale tant du point de vue évolutif que moléculaire, peuvent aujourd'hui être considérés comme ***un modèle stratégique dans l'étude de l'évolution des systèmes de déterminisme sexuel.***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abascal, Federico, Rafael Zardoya, and David Posada. 2005. “ProtTest: Selection of Best-Fit Models of Protein Evolution.” *Bioinformatics* 21 (9): 2104–5.

Ahier, Arnaud, Philippe Rondard, Nadège Gouignard, Naji Khayath, Siluo Huang, Jacques Trolet, Daniel J. Donoghue, Monique Gauthier, Jean-Philippe Pin, and Colette Dissous. 2009. “A New Family of Receptor Tyrosine Kinases with a Venus Flytrap Binding Domain in Insects and Other Invertebrates Activated by Aminoacids.” *PLoS One* 4 (5): e5651.

Ahmed, Sophia, J. Mark Cock, Eugenie Pessia, Remy Luthringer, Alexandre Cormier, Marine Robuchon, Lieven Sterck, et al. 2014. “A Haploid System of Sex Determination in the Brown Alga Ectocarpus Sp.” *Current Biology* 24 (17): 1945–57. doi:10.1016/j.cub.2014.07.042.

Alexandre, Henri. 2001. “A History of Mammalian Embryological Research.” *International Journal of Developmental Biology* 45 (3): 457–68.

Alrefaei, Yousef Noori, Tunika Ida Okatcha, Danielle Elaine Skinner, and Paul James Brindley. 2011. “Progress with Schistosome Transgenesis.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (7): 785–93.

Althammer, Sonja, Juan González-Vallinas, Cecilia Ballaré, Miguel Beato, and Eduardo Eyras. 2011. “Pyicos: A Versatile Toolkit for the Analysis of High-Throughput Sequencing Data.” *Bioinformatics* 27 (24): 3333–40.

Ambroise-Thomas, P., and P. Andrews. 1976. “Development of Fluorescent Antibodies Directed against Larval Stages, Eggs, and Adults of Schistosoma Mansoni in Mice Harbouring Unisexual or Bisexual Infections.” *Tropenmedizin Und Parasitologie* 27 (4): 483–88.

Anders, Simon, and Wolfgang Huber. 2010. “Differential Expression Analysis for Sequence Count Data.” *Genome Biol* 11 (10): R106.

Anders, Simon, Paul Theodor Pyl, and Wolfgang Huber. 2014. “HTSeq–A Python Framework to Work with High-Throughput Sequencing Data.” *Bioinformatics*, btu638.

Andrade, Luiza Freire de, Marina de Moraes Mourão, Juliana Assis Geraldo, Fernanda Sales Coelho, Larissa Lopes Silva, Renata Heisler Neves, Angela Volpini, et al. 2014. “Regulation of Schistosoma Mansoni Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (6): e2949. doi:10.1371/journal.pntd.0002949.

Arora, Meenakshi. 2013. “Milieu de Culture: Une Revue.” Translated by Galet Colette. *Materials and Methods* fr3 (January). doi:10.13070/mm.fr.3.175.

Atallah, Joel, Gerard Vurens, Setong Mavong, Alexa Mutti, Don Hoang, and Artyom Kopp. 2014. “Sex-Specific Repression of Dachshund Is Required for Drosophila Sex Comb Development.” *Developmental Biology* 386 (2): 440–47. doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.017.

Atkinson, Kristine H., and Burr G. Atkinson. 1980. “Biochemical Basis for the Continuous Copulation of Female Schistosoma Mansoni.” *Nature* 283, 478 - 479; doi:10.1038/283478a0

Bachtrog, Doris. 2013. “Y-Chromosome Evolution: Emerging Insights into Processes of Y-Chromosome Degeneration.” *Nature Reviews Genetics* 14 (2): 113–24. doi:10.1038/nrg3366.

Bachtrog, Doris, Judith E. Mank, Catherine L. Peichel, Mark Kirkpatrick, Sarah P. Otto, Tia-Lynn Ashman, Matthew W. Hahn, et al. 2014. “Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It?” *PLoS Biology* 12 (7): e1001899. doi:10.1371/journal.pbio.1001899.

Baki, C. A., and J.-A. Grimaud. 1985. “Unisexual Murine Schistosomiasis: Portal Hepatitis in Subacute Infections.” *Experientia* 41 (11): 1423–26.

Barbosa, M. A., J. Pellegrino, P. M. Z. Coelho, and I. B. M. Sampaio. 1978a. “Quantitative Aspects of the Migration and Evolutive Asynchronism of Schistosoma Mansoni in Mice.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 121–32.

Barrett, S. C. H. 2010. “Darwin’s Legacy: The Forms, Function and Sexual Diversity of Flowers.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1539): 351–68. doi:10.1098/rstb.2009.0212.

Basch, Paul F. 1981. “Cultivation of Schistosoma Mansoni in Vitro. I. Establishment of Cultures from Cercariae and Development until Pairing.” *The Journal of Parasitology*, 179–85.

Basch, P. F. 1990. “Why Do Schistosomes Have Separate Sexes?” *Parasitology Today* 6 (5): 160–63.

Basch, P. F., and Natalicia Basch. 1984. “Intergeneric Reproductive Stimulation and Parthenogenesis in Schistosoma Mansoni.” *Parasitology* 89 (02): 369–76. doi:10.1017/S0031182000001372.

Bayne, C. J., and C. G. Grevelding. 2003. “Cloning of Schistosoma Mansoni Sporocysts in Vitro and Detection of Genetic Heterogeneity among Individuals within Clones.” *Journal of Parasitology* 89 (5): 1056–60.

Beckmann, Svenja, Christin Buro, Colette Dissous, Jörg Hirzmann, and Christoph G. Grevelding. 2010. “The Syk Kinase SmTK4 of Schistosoma Mansoni Is Involved in the Regulation of Spermatogenesis and Oogenesis.” Edited by Edward J. Pearce. *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000769. doi:10.1371/journal.ppat.1000769.

Beckmann, Svenja, Thomas Quack, Colette Dissous, Katia Cailliau, Gabriele Lang, and Christoph G. Grevelding. 2012. “Discovery of Platyhelminth-Specific α/β-Integrin Families and Evidence for Their Role in Reproduction in Schistosoma Mansoni.” Edited by Geoffrey N. Gobert. *PLoS ONE* 7 (12): e52519. doi:10.1371/journal.pone.0052519.

Beltran, S., and J. Boissier. 2008. “Schistosome Monogamy: Who, How, and Why?” *Trends in Parasitology* 24 (9): 386–91.

Beltran, Sophie, and Jérôme Boissier. 2008. “Are Schistosomes Socially and Genetically Monogamous?” *Parasitology Research* 104 (2): 481–83. doi:10.1007/s00436-008-1225-8.

Beltran, Sophie, and Jérôme Boissier. 2010. “Male-Biased Sex Ratio: Why and What Consequences for the Genus Schistosoma?” *Trends in Parasitology* 26 (2): 63–69.

Beltran, Sophie, Frank Cézilly, and Jérôme Boissier. 2008. “Genetic Dissimilarity between Mates, but Not Male Heterozygosity, Influences Divorce in Schistosomes.” *PLoS ONE* 3 (10): e3328. doi:10.1371/journal.pone.0003328.

Beltran, Sophie, Frank Cézilly, and Jérôme Boissier. 2009. “Adult Sex Ratio Affects Divorce Rate in the Monogamous Endoparasite Schistosoma Mansoni.” *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63 (9): 1363–68. doi:10.1007/s00265-009-0757-y.

Berriman, Matthew, Brian J. Haas, Philip T. LoVerde, R. Alan Wilson, Gary P. Dillon, Gustavo C. Cerqueira, Susan T. Mashiyama, et al. 2009. “The Genome of the Blood Fluke Schistosoma Mansoni.” *Nature* 460 (7253): 352–58. doi:10.1038/nature08160.

Betrán, Esther, Kevin Thornton, and Manyuan Long. 2002. “Retroposed New Genes Out of the X in Drosophila.” *Genome Research* 12 (12): 1854–59. doi:10.1101/gr.604902.

Beukeboom, Leo W., and Nicolas Perrin. 2014. *The Evolution of Sex Determination*. Oxford University Press.

Beye, Martin, Martin Hasselmann, M. Kim Fondrk, Robert E. Page, and Stig W. Omholt. 2003. “The Gene Csd Is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein.” *Cell* 114 (4): 419–29.

Bhardwaj, Rita, Greice Krautz-Peterson, and Patrick J. Skelly. 2011. “Using RNA Interference in Schistosoma Mansoni.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 764: 223–39. doi:10.1007/978-1-61779-188-8_15.

Bilharz, T. M. 1852. “Fernere Beobachtungun Uber Das Pfortader Des Menschen Bewohnende Distomum Haematobium Und Sein Verhaltniss Zu Gewissen Pathologishen Bildungen Aus Brieflichen Mitheilungen an Professor v. Sielbold Vom 29 Marz 1852.” *Zeitschrift Fur Wissenschaftliche Zoologie Leipzig* 4: 72–76.

Billiard, Sylvain, Manuela López-Villavicencio, Benjamin Devier, Michael E. Hood, Cécile Fairhead, and Tatiana Giraud. 2011. “Having Sex, Yes, but with Whom? Inferences from Fungi on the Evolution of Anisogamy and Mating Types.” *Biological Reviews* 86 (2): 421–42. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00153.x.

Biolchini, Carla de Lamare, Renata Heisler Neves, Maarten Hulstijn, Delir Corrêa Gomes, and José Roberto Machado-Silva. 2006. “Development of Schistosoma Mansoni Worms in Mice Analyzed by Bright Field and Confocal Microscopy.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 261–65.

Bisoni, Laura, Laura Batlle-Morera, Adrian P. Bird, Miho Suzuki, and Heather A. McQueen. 2005. “Female-Specific Hyperacetylation of Histone H4 in the Chicken Z Chromosome.” *Chromosome Research* 13 (2): 205–14.

Blankenberg, Daniel, Gregory Von Kuster, Nathaniel Coraor, Guruprasad Ananda, Ross Lazarus, Mary Mangan, Anton Nekrutenko, and James Taylor. 2010. “Galaxy: A Web-based Genome Analysis Tool for Experimentalists.” *Current Protocols in Molecular Biology*, 19.10. 1–19.10. 21.

Boissier, Jérôme, Hélène Moné, Guillaume Mitta, M. Dolores Bargues, David Molyneux, and Santiago Mas-Coma. 2015. “Schistosomiasis Reaches Europe.” *The Lancet. Infectious Diseases* 15 (7): 757–58. doi:10.1016/S1473-3099(15)00084-5.

Boissier, J., J. Jarkovsky, S. Morand, and H. Moné. 2004. “A Model to Explain the Origin of a Parasite Sex-Specific Population Structure.” *Theoretical Population Biology* 66 (3): 269–76. doi:10.1016/j.tpb.2004.06.008.

Boissier, J., and H. Mone. 2000. “Experimental Observations on the Sex Ratio of Adult Schistosoma Mansoni, with Comments on the Natural Male Bias.” *Parasitology* 121 (04): 379–83.

Boissier, J., S. Morand, and H. Moné. 1999. “A Review of Performance and Pathogenicity of Male and Female Schistosoma Mansoni during the Life-Cycle.” *Parasitology* 119 (05): 447–54.

Boswell, ROBERT E., MARY E. Prout, and JESSICA C. Steichen. 1991. “Mutations in a Newly Identified Drosophila Melanogaster Gene, Mago Nashi, Disrupt Germ Cell Formation and Result in the Formation of Mirror-Image Symmetrical Double Abdomen Embryos.” *Development* 113 (1): 373–84.

Brant, Sara V., and Eric S. Loker. 2005. “Can Specialized Pathogens Colonize Distantly Related Hosts? Schistosome Evolution as a Case Study.” *PLoS Pathogens* 1 (3): e38. doi:10.1371/journal.ppat.0010038.

Briggs, M. H. 1972. “Metabolism of Steroid Hormones by Schistosomes.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 280 (3): 481–85.

Brink, Linda H., Diane J. McLaren, and S. R. Smithers. 1977. “Schistosoma Mansoni: A Comparative Study of Artificially Transformed Schistosomula and Schistomula Recoverd after Cercarial Penetration of Isolated Skin.” *Parasitology* 74 (01): 73–86.

Buffon, Georges-Louis Leclerc, and Guéneau de Montbeillard. 1770. *Histoire Naturelle Des Oiseaux*. Imprimerie royale.

Buro, Christin, Katia C. Oliveira, Zhigang Lu, Silke Leutner, Svenja Beckmann, Colette Dissous, Katia Cailliau, Sergio Verjovski-Almeida, and Christoph G. Grevelding. 2013. “Transcriptome Analyses of Inhibitor-Treated Schistosome Females Provide Evidence for Cooperating Src-Kinase and TGFβ Receptor Pathways Controlling Mitosis and Eggshell Formation.” Edited by David L. Williams. *PLoS Pathogens* 9 (6): e1003448. doi:10.1371/journal.ppat.1003448.

Burt, Austin. 2000. “Perspective: Sex, Recombination, and the Efficacy of Selection—was Weismann Right?” *Evolution* 54 (2): 337–51.

Butterfield, N. J. 2000. “Bangiomorpha Pubescens N. Gen., N. Sp.: Implications for the Evolution of Sex, Multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic Radiation of Eukaryotes.” *Paleobiology* 26 (3): 386–404. doi:10.1666/0094-8373(2000)026<0386:BPNGNS>2.0.CO;2.

Caetano, L.C., F.G.O. Gennaro, K. Coelho, F.M Araújo, R.A. Vila, A. Araújo, A. de Melo Bernardo, C.R. Marcondes, S.M. Chuva de Sousa Lopes, and E.S. Ramos. 2014. “Differential Expression of the MHM Region and of Sex-Determining-Related Genes during Gonadal Development in Chicken Embryos.” *Genetics and Molecular Research* 13 (1): 838–49. doi:10.4238/2014.February.13.2.

Caffrey CR. 2015. "Schistosomiasis and its treatment." *Future Med Chem.*7(6):675–6.

Campbell, Polly, Jeffrey M. Good, and Michael W. Nachman. 2013. “Meiotic Sex Chromosome Inactivation Is Disrupted in Sterile Hybrid Male House Mice.” *Genetics* 193 (3): 819–28. doi:10.1534/genetics.112.148635.

Capella-Gutiérrez, Salvador, José M. Silla-Martínez, and Toni Gabaldón. 2009. "trimAl: A Tool for Automated Alignment Trimming in Large-Scale Phylogenetic Analyses." *Bioinformatics* 25 (15): 1972–73.

Carvalho, Antonio Bernardo, and Andrew G. Clark. 2013. "Efficient Identification of Y Chromosome Sequences in the Human and Drosophila Genomes." *Genome Research* 23 (11): 1894–1907. doi:10.1101/gr.156034.113.

Chalmers, Iain W., Andrew J. McArdle, Richard MR Coulson, Marissa A. Wagner, Ralf Schmid, Hirohisa Hirai, and Karl F. Hoffmann. 2008. "Developmentally Regulated Expression, Alternative Splicing and Distinct Sub-Groupings in Members of the Schistosoma Mansoni Venom Allergen-like (SmVAL) Gene Family." *BMC Genomics* 9 (1): 89.

Charlesworth, Brian. 1996. "The Evolution of Chromosomal Sex Determination and Dosage Compensation." *Current Biology* 6 (2): 149–62.

Charlesworth, D., B. Charlesworth, and G. Marais. 2005. "Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes." *Heredity* 95 (2): 118–28.

Charnier, M. 1966. "Action of Temperature on the Sex Ratio in the Agama Agama (Agamidae, Lacertilia) Embryo." *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie et de Ses Filiales* 160 (3): 620.

Chen, Songlin, Guojie Zhang, Changwei Shao, Quanfei Huang, Geng Liu, Pei Zhang, Wentao Song, et al. 2014. "Whole-Genome Sequence of a Flatfish Provides Insights into ZW Sex Chromosome Evolution and Adaptation to a Benthic Lifestyle." *Nature Genetics* 46 (3): 253–60. doi:10.1038/ng.2890.

Chitsulo, L., P. Loverde, and D. Engels. 2004. "Schistosomiasis." *Nature Reviews. Microbiology* 2 (1): 12–13. doi:10.1038/nrmicro801.

Chong, Tracy, James J. Collins, John L. Brubacher, David Zarkower, and Phillip A. Newmark. 2013. "A Sex-Specific Transcription Factor Controls Male Identity in a Simultaneous Hermaphrodite." *Nature Communications* 4 (May): 1814. doi:10.1038/ncomms2811.

Cioli, D., P. M. Knopf, and A. W. Senft. 1977. "A Study of Schistosoma Mansoni Transferred into Permissive and Nonpermissive Hosts." *International Journal for Parasitology* 7 (4): 293–98.

Cioli, Donato, Livia Pica-Mattoccia, Annalisa Basso, and Alessandra Guidi. 2014. "Schistosomiasis Control: Praziquantel Forever?" *Molecular and Biochemical Parasitology* 195 (1): 23–29. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.06.002.

Civard-Racinais, Alexandrine, and Pierre-Henry Gouyon. 2009. *Aux Origines de La Sexualité*. Fayard.

Clément, Julie A. J., Eve Toulza, Mathieu Gautier, Hugues Parrinello, David Roquis, Jérôme Boissier, Anne Rognon, et al. 2013. "Private Selective Sweeps Identified from next-Generation Pool-Sequencing Reveal Convergent Pathways under Selection in Two Inbred Schistosoma Mansoni Strains." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (12): e2591. doi:10.1371/journal.pntd.0002591.

Clough, Ellen R. 1981. "Morphology of Reproductive Organs and Oogenesis in Bisexual and Unisexual Transplants of Mature Schistosoma Mansoni Females." *The Journal of Parasitology*, 535–39.

Collins, James J., Xiaowen Hou, Elena V. Romanova, Bramwell G. Lambrus, Claire M. Miller, Amir Saberi, Jonathan V. Sweedler, and Phillip A. Newmark. 2010. "Genome-Wide Analyses Reveal a Role for Peptide Hormones in Planarian Germline Development." Edited by Volker Hartenstein. *PLoS Biology* 8 (10): e1000509. doi:10.1371/journal.pbio.1000509.

Combes, C. 1991. "The Schistosome Scandal." *Acta Oecologica* 12 (1): 165–73.

Combes, C., L. Després, D. Establet, A. Fournier, J. Jourdane, H. Mone, S. Morand, and A. Theron. 1991. "Schistosomatidae (Trematoda): Some Views on Their Origin and Evolution." *Res Rev Parasitol* 51: 25–28.

Cordaux, Richard, Didier Bouchon, and Pierre Grève. 2011. "The Impact of Endosymbionts on the Evolution of Host Sex-Determination Mechanisms." *Trends in Genetics* 27 (8): 332–41. doi:10.1016/j.tig.2011.05.002.

Cornford, E. M., A. M. Fitzpatrick, T. L. Quirk, C. P. Diep, and E. M. Landaw. 1988. “Tegumental Glucose Permeability in Male and Female Schistosoma Mansoni.” *The Journal of Parasitology*, 116–28.

Cort, William W. 1921. “The Development of the Japanese Blood-Fluke, Schistosoma Japonicum Katsurada, in Its Final Host.” *American Journal of Epidemiology* 1 (1): 1–38.

Cosseau, Céline, Abdelhalim Azzi, Kristina Smith, Michael Freitag, Guillaume Mitta, and Christoph Grunau. 2009. “Native Chromatin Immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of Schistosoma Mansoni: Critical Experimental Parameters.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 166 (1): 70–76.

Crews, David, Mark Grassman, and Jonathan Lindzey. 1986. “Behavioral Facilitation of Reproduction in Sexual and Unisexual Whiptail Lizards.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (24): 9547–50.

Criscione, Charles D., Claudia LL Valentim, Hirohisa Hirai, Philip T. LoVerde, and Timothy JC Anderson. 2009. “Genomic Linkage Map of the Human Blood Fluke Schistosoma Mansoni.” *Genome Biology* 10 (6): R71.

Curwen, Rachel S., Peter D. Ashton, Shobana Sundaralingam, and R. Alan Wilson. 2006. “Identification of Novel Proteases and Immunomodulators in the Secretions of Schistosome Cercariae That Facilitate Host Entry.” *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (5): 835–44.

Deakin, Janine E., Timothy A. Hore, Edda Koina, and Jennifer A. Marshall Graves. 2008. “The Status of Dosage Compensation in the Multiple X Chromosomes of the Platypus.” Edited by Jeannie T. Lee. *PLoS Genetics* 4 (7): e1000140. doi:10.1371/journal.pgen.1000140.

DeMarco, R., W. Mathieson, S. J. Manuel, G. P. Dillon, R. S. Curwen, P. D. Ashton, A. C. Ivens, M. Berriman, S. Verjovski-Almeida, and R. A. Wilson. 2010. “Protein Variation in Blood-Dwelling Schistosome Worms Generated by Differential Splicing of Micro-Exon Gene Transcripts.” *Genome Research* 20 (8): 1112–21. doi:10.1101/gr.100099.109.

De Mendonça, Ricardo L, Didier Bouton, Benjamin Bertin, Hector Escriva, Christophe Noël, Jean-Marc Vanacker, Jocelyne Cornette, Vincent Laudet, and Raymond J. Pierce. 2002. “A Functionally Conserved Member of the FTZ-F1 Nuclear Receptor Family from Schistosoma Mansoni: Characterization of S. Mansoni FTZ-F1.” *European Journal of Biochemistry* 269 (22): 5700–5711. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03287.x.

De Mendonça, Ricardo L., Hector Escrivá, Didier Bouton, Vincent Laudet, and Raymond J. Pierce. 2000. “Hormones and Nuclear Receptors in Schistosome Development.” *Parasitology Today* 16 (6): 233–40.

De Mendonca, Ricardo L., Hector Escriva, Didier Bouton, Dominique Zelus, Jean-Marc Vanacker, Edith Bonnelye, Jocelyne Cornette, Raymond J. Pierce, and Vincent Laudet. 2000. “Structural and Functional Divergence of a Nuclear Receptor of the RXR Family from the Trematode Parasite Schistosoma Mansoni.” *European Journal of Biochemistry* 267 (11): 3208–19.

De Souza Gomes, Matheus, Mohan Kumar Muniyappa, Sávio Gonçalves Carvalho, Renata Guerra-Sá, and Charles Spillane. 2011. “Genome-Wide Identification of Novel microRNAs and Their Target Genes in the Human Parasite Schistosoma Mansoni.” *Genomics* 98 (2): 96–111.

Despres, Laurence, and Sandrine Maurice. 1995. “The Evolution of Dimorphism and Separate Sexes in Schistosomes.” *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 262 (1364): 175–80.

De Visser, JAGM, A. Ter Maat, and C. Zonneveld. 1994. “Energy Budgets and Reproductive Allocation in the Simultaneous Hermaphrodite Pond Snail, Lymnaea Stagnalis (L.): A Trade-off between Male and Female Function.” *American Naturalist*, 861–67.

Dhami, Kirandeep K., Leo Joseph, David A. Roshier, and Jeffrey L. Peters. 2015. “Recent Speciation and Elevated Z-Chromosome Differentiation between Sexually Monochromatic and Dichromatic Species of Australian Teals.” *Journal of Avian Biology*, September, n/a – n/a. doi:10.1111/jav.00693.

Dias, Brian George, and David Crews. 2008. "Regulation of Pseudosexual Behavior in the Parthenogenetic Whiptail Lizard, *Cnemidophorus Uniparens*." *Endocrinology* 149 (9): 4622–31. doi:10.1210/en.2008-0214.

Dissous, Colette. 2015. "Venus Kinase Receptors at the Crossroads of Insulin Signaling: Their Role in Reproduction for Helminths and Insects." *Frontiers in Endocrinology* 6: 118. doi:10.3389/fendo.2015.00118.

Dissous, Colette, Christoph G. Grevelding, and Thavy Long. 2011. "Schistosoma Mansoni Polo-like Kinases and Their Function in Control of Mitosis and Parasite Reproduction." *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 83 (2): 627–35.

Dissous, Colette, Marion Morel, and Mathieu Vanderstraete. 2014. "Venus Kinase Receptors: Prospects in Signaling and Biological Functions of These Invertebrate Kinases." *Frontiers in Endocrinology* 5.

Doenhoff, Michael J., Donato Cioli, and Jürg Utzinger. 2008. "Praziquantel: Mechanisms of Action, Resistance and New Derivatives for Schistosomiasis." *Current Opinion in Infectious Diseases* 21 (6): 659–67.

Dorsey, Charles H., Carolyn E. Cousin, Fred A. Lewis, and Margaret A. Stirewalt. 2002. "Ultrastructure of the Schistosoma Mansoni Cercaria." *Micron* 33 (3): 279–323.

Dumont, M., H. Mone, G. Mouahid, M. A. Idris, M. Shaban, and J. Boissier. 2007. "Influence of Pattern of Exposure, Parasite Genetic Diversity and Sex on the Degree of Protection against Reinfection with Schistosoma Mansoni." *Parasitology Research* 101 (2): 247–52.

Duvall, Rodney H, and William B DeWitt. 1967. "An Improved Perfusion Technique for Recovering Adult Schistosomes from Laboratory Animals." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16 (4): 483–86.

Eggers, Stefanie, and Andrew Sinclair. 2012. "Mammalian Sex Determination—insights from Humans and Mice." *Chromosome Research* 20 (1): 215–38. doi:10.1007/s10577-012-9274-3.

Eigen, Manfred, and Ruthild Winkler-Oswatitsch. 1981. "Transfer-RNA, an Early Gene?" *Naturwissenschaften* 68 (6): 282–92.

Ellegren, Hans. 2011. "Emergence of Male-Biased Genes on the Chicken Z-Chromosome: Sex-Chromosome Contrasts between Male and Female Heterogametic Systems." *Genome Research* 21 (12): 2082–86. doi:10.1101/gr.119065.110.

Ellegren, Hans, Lina Hultin-Rosenberg, Björn Brunström, Lennart Dencker, Kim Kultima, and Birger Scholz. 2007. "Faced with Inequality: Chicken Do Not Have a General Dosage Compensation of Sex-Linked Genes." *BMC Biology* 5 (1): 40.

Eloi-Santos, Silvana, Nancy J. Olsen, Rodrigo Correa-Oliveira, and Daniel G. Colley. 1992. "Schistosoma Mansoni: Mortality, Pathophysiology, and Susceptibility Differences in Male and Female Mice." *Experimental Parasitology* 75 (2): 168–75.

Eppley, S. M., and L. K. Jesson. 2008. "Moving to Mate: The Evolution of Separate and Combined Sexes in Multicellular Organisms." *Journal of Evolutionary Biology* 21 (3): 727–36.

Erasmus, David A. 1973. "A Comparative Study of the Reproductive System of Mature, Immature and 'unisexual'female Schistosoma Mansoni." *Parasitology* 67 (02): 165–83.

Ercan, Sevinc, Paul G. Giresi, Christina M. Whittle, Xinmin Zhang, Roland D. Green, and Jason D. Lieb. 2007. "X Chromosome Repression by Localization of the C. Elegans Dosage Compensation Machinery to Sites of Transcription Initiation." *Nature Genetics* 39 (3): 403–8.

Erdman, S. E., and K. C. Burtis. 1993. "The Drosophila Doublesex Proteins Share a Novel Zinc Finger Related DNA Binding Domain." *The EMBO Journal* 12 (2): 527–35.

Escobedo, Galileo, Craig W. Roberts, Julio C. Carrero, and Jorge Morales-Montor. 2005. "Parasite Regulation by Host Hormones: An Old Mechanism of Host Exploitation?" *Trends in Parasitology* 21 (12): 588–93. doi:10.1016/j.pt.2005.09.013.

Escriva, Héctor, Stéphanie Bertrand, and Vincent Laudet. 2004. "The Evolution of the Nuclear Receptor Superfamily." *Essays in Biochemistry* 40: 11–26.

Ezaz, Tariq, Rami Stiglec, Frederic Veyrunes, and Jennifer A. Marshall Graves. 2006. "Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems." *Current Biology* 16 (17): R736–43. doi:10.1016/j.cub.2006.08.021.

Fagegaltier, Delphine, and Bruce S. Baker. 2004. "X Chromosome Sites Autonomously Recruit the Dosage Compensation Complex in Drosophila Males." *PLoS Biol* 2 (11): e341.

Faust, E. C., and W. A. Hoffman. 1934. "Studies on Schistosomiasis Mansoni in Puerto Rico. III. Biological Studies. 1. The Extra-Mammalian Phases of the Life Cycle." *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 10: 1–47.

Feng, Xin, Robert Grossman, and Lincoln Stein. 2011. "PeakRanger: A Cloud-Enabled Peak Caller for ChIP-Seq Data." *BMC Bioinformatics* 12 (1): 139.

Ferris, Patrick, Bradley JSC Olson, Peter L. De Hoff, Stephen Douglass, David Casero, Simon Prochnik, Sa Geng, Rhitu Rai, Jane Grimwood, and Jeremy Schmutz. 2010. "Evolution of an Expanded Sex-Determining Locus in Volvox." *Science* 328 (5976): 351–54.

Figueroa, Rosa Isabel, Isabel Bravo, Santiago Fraga, Esther Garcés, and Gisela Llaveria. 2009. "The Life History and Cell Cycle of Kryptoperidinium Foliaceum, A Dinoflagellate with Two Eukaryotic Nuclei." *Protist* 160 (2): 285–300. doi:10.1016/j.protis.2008.12.003.

Fitzpatrick, Jennifer M., and Karl F. Hoffmann. 2006. "Dioecious Schistosoma Mansoni Express Divergent Gene Repertoires Regulated by Pairing." *International Journal for Parasitology* 36 (10-11): 1081–89. doi:10.1016/j.ijpara.2006.06.007.

Fitzpatrick, Jennifer M., David A. Johnston, Gary W. Williams, Debbie J. Williams, Tom C. Freeman, David W. Dunne, and Karl F. Hoffmann. 2005. "An Oligonucleotide Microarray for Transcriptome Analysis of Schistosoma Mansoni and Its Application/use to Investigate Gender-Associated Gene Expression." *Molecular and Biochemical Parasitology* 141 (1): 1–13. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.01.007.

Fitzpatrick, Jennifer M., Anna V. Protasio, Andrew J. McArdle, Gary A. Williams, David A. Johnston, and Karl F. Hoffmann. 2008. "Use of Genomic DNA as an Indirect Reference for Identifying Gender-Associated Transcripts in Morphologically Identical, but Chromosomally Distinct, Schistosoma Mansoni Cercariae." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 (10): e323.

Fitzpatrick, J. M., Y. Hirai, H. Hirai, and K. F. Hoffmann. 2007. "Schistosome Egg Production Is Dependent upon the Activities of Two Developmentally Regulated Tyrosinases." *The FASEB Journal* 21 (3): 823–35. doi:10.1096/fj.06-7314com.

Flot, Jean-François, Boris Hespeels, Xiang Li, Benjamin Noel, Irina Arkhipova, Etienne G. J. Danchin, Andreas Hejnol, et al. 2013. "Genomic Evidence for Ameiotic Evolution in the Bdelloid Rotifer Adineta Vaga." *Nature* 500 (7463): 453–57. doi:10.1038/nature12326.

Freitas, Tori C., Euihye Jung, and Edward J. Pearce. 2007. "TGF-β Signaling Controls Embryo Development in the Parasitic Flatworm Schistosoma Mansoni."

Fridolfsson, Anna-Karin, Hans Cheng, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins, Hsiao-Ching Liu, Terje Raudsepp, Trevor Woodage, Bhanu Chowdhary, Joy Halverson, and Hans Ellegren. 1998. "Evolution of the Avian Sex Chromosomes from an Ancestral Pair of Autosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (14): 8147–52.

Fulford, AJC, AE Butterworth, JH Ouma, and RF Sturrock. 1995. "A Statistical Approach to Schistosome Population Dynamics and Estimation of the Life-Span of Schistosoma Mansoni in Man." *Parasitology* 110 (03): 307–16.

Garcia-Vallvé, Santiago, Anton Romeu, and Jaume Palau. 2000. "Horizontal Gene Transfer in Bacterial and Archaeal Complete Genomes." *Genome Research* 10 (11): 1719–25.

Gehring, Walter. 1999. *La Drosophile Aux Yeux Rouges: Gènes et Développement*. Odile Jacob.

Georgiev, Plamen, Sarantis Chlamydas, and Asifa Akhtar. 2011. "Drosophila Dosage Compensation: Males Are from Mars, Females Are from Venus." *Fly* 5 (2): 147–54.

Ghiselin, Michael T. 1969. "The Evolution of Hermaphroditism among Animals." *Quarterly Review of Biology*, 189–208.

Ghiselin, Michael T. 1974. "Economy of Nature and the Evolution of Sex."

Gilbert, C., and R. Cordaux. 2013. “Horizontal Transfer and Evolution of Prokaryote Transposable Elements in Eukaryotes.” *Genome Biology and Evolution* 5 (5): 822–32. doi:10.1093/gbe/evt057.

GirAud, Tatiana, and Pierre-Henri Gouyon. n.d. “Évolution Du Sexe, évolution Des Sexes.”

Gobert, Geoffrey N. 2010. “Applications for Profiling the Schistosome Transcriptome.” *Trends in Parasitology* 26 (9): 434–39. doi:10.1016/j.pt.2010.04.009.

Gobert, Geoffrey N., Mai H. Tran, Luke Moertel, Jason Mulvenna, Malcolm K. Jones, Donald P. McManus, and Alex Loukas. 2010. “Transcriptional Changes in Schistosoma Mansoni during Early Schistosomula Development and in the Presence of Erythrocytes.” Edited by Elodie Ghedin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2): e600. doi:10.1371/journal.pntd.0000600.

Goecks, Jeremy, Anton Nekrutenko, and James Taylor. 2010. “Galaxy: A Comprehensive Approach for Supporting Accessible, Reproducible, and Transparent Computational Research in the Life Sciences.” *Genome Biol* 11 (8): R86.

Good, Jeffrey M., Thomas Giger, Matthew D. Dean, and Michael W. Nachman. 2010. “Widespread Over-Expression of the X Chromosome in Sterile F1 Hybrid Mice.” *PLoS Genet* 6 (9): e1001148. doi:10.1371/journal.pgen.1001148.

Gouyon, P. H. 1999. “Sex: A Pluralist Approach Includes Species selection.(One Step beyond and It’s Good.).” *Journal of Evolutionary Biology* 12: 1029–30.

Graves, JA Marshall, and Swathi Shetty. 2001. “Sex from W to Z: Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Sex Determining Genes.” *Journal of Experimental Zoology* 290 (5): 449–62.

Grossman, Abraham I., Robert B. Short, and George D. Cain. 1981. “Karyotype Evolution and Sex Chromosome Differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae).” *Chromosoma* 84 (3): 413–30.

Grossman, A. I., and G. D. Cain. 1981. “Karyotypes and Chromosome Morphologies of Megalodiscus Temperatus and Philophthalmus Gralli.” *Journal of Helminthology* 55 (01): 71–78.

Grossman, AI, R McKenzie, and GD Cain. 1980. “Sex Heterochromatin in Schistosoma Mansoni.” *Journal of Parasitology* 66 (2): 368–70.

Guerrier-Takada, Cecilia, Katheleen Gardiner, Terry Marsh, Norman Pace, and Sidney Altman. 1983. “The RNA Moiety of Ribonuclease P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme.” *Cell* 35 (3, Part 2): 849–57. doi:10.1016/0092-8674(83)90117-4.

Guichaoua, M.-R., C. Geoffroy-Siraudin, V. Tassistro, R. Ghalamoun-Slaimi, J. Perrin, and C. Metzler-Guillemain. 2009. “Chromosomes sexuels et méiose.” *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37 (11-12): 895–900. doi:10.1016/j.gyobfe.2009.09.004.

Guo, Yiqing, Xiangmei Chen, and Ronald E. Ellis. 2013. “Evolutionary Change within a Bipotential Switch Shaped the Sperm/Oocyte Decision in Hermaphroditic Nematodes.” Edited by Andrew D. Chisholm. *PLoS Genetics* 9 (10): e1003850. doi:10.1371/journal.pgen.1003850.

Gupta, B. C., and Paul F. Basch. 1987. “The Role of Schistosoma Mansoni Males in Feeding and Development of Female Worms.” *The Journal of Parasitology*, 481–86.

Gwynne, Darryl T. 1991. “Sexual Competition among Females: What Causes Courtship-Role Reversal?” *Trends in Ecology & Evolution* 6 (4): 118–21. doi:10.1016/0169-5347(91)90089-G.

Haag, Eric S. 2007. “Why Two Sexes? Sex Determination in Multicellular Organisms and Protistan Mating Types.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18 (3): 348–49. doi:10.1016/j.semcdb.2007.05.009.

Haag, Eric S., and Alana V. Doty. 2005. “Sex Determination across Evolution: Connecting the Dots.” *PLoS Biology* 3 (1): e21. doi:10.1371/journal.pbio.0030021.

Hagen, Jana, Jean-Pierre Y. Scheerlinck, and Robin B. Gasser. 2015. “Knocking down Schistosomes – Promise for Lentiviral Transduction in Parasites.” *Trends in Parasitology*, April. doi:10.1016/j.pt.2015.03.009.

Hahnel, Steffen, Thomas Quack, Sophia J. Parker-Manuel, Zhigang Lu, Mathieu Vanderstraete, Marion Morel, Colette Dissous, Katia Cailliau, and Christoph G. Grevelding. 2014. “Gonad

RNA-Specific qRT-PCR Analyses Identify Genes with Potential Functions in Schistosome Reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs." *Frontiers in Genetics* 5 (June). doi:10.3389/fgene.2014.00170.

Hamilton, William D. 1980. "Sex versus Non-Sex versus Parasite." *Oikos*, 282–90.

Hamilton, William D., and Marlene Zuk. 1982. "Heritable True Fitness and Bright Birds: A Role for Parasites?" *Science* 218 (4570): 384–87.

Handley, Lori-Jayne Lawson, Helene Ceplitis, and Hans Ellegren. 2004. "Evolutionary Strata on the Chicken Z Chromosome: Implications for Sex Chromosome Evolution." *Genetics* 167 (1): 367–76.

Hannah-Alava, Aloha, and Curt Stern. 1957. "The Sexcombs in Males and Intersexes of Drosophila Melanogaster." *Journal of Experimental Zoology* 134 (3): 533–56.

Haseeb, M. A., Bernard Fried, and L. K. Eveland. 1989. "Schistosoma Mansoni: Female-Dependent Lipid Secretion in Males and Corresponding Changes in Lipase Activity." *International Journal for Parasitology* 19 (7): 705–9.

Hawking, Frank. 1975. "Circadian and Other Rhythms of Parasites." *Advances in Parasitology* 13: 123–82.

Heasman, Janet. 2002. "Morpholino Oligos: Making Sense of Antisense?" *Developmental Biology* 243 (2): 209–14. doi:10.1006/dbio.2001.0565.

Heasman, J., M. Kofron, and C. Wylie. 2000. "Beta-Catenin Signaling Activity Dissected in the Early Xenopus Embryo: A Novel Antisense Approach." *Developmental Biology* 222 (1): 124–34. doi:10.1006/dbio.2000.9720.

Hebenstreit, Daniel, Miaoqing Fang, Muxin Gu, Varodom Charoensawan, Alexander van Oudenaarden, and Sarah A. Teichmann. 2011. "RNA Sequencing Reveals Two Major Classes of Gene Expression Levels in Metazoan Cells." *Molecular Systems Biology* 7 (1): 497.

Hediger, M., C. Henggeler, N. Meier, R. Perez, G. Saccone, and D. Bopp. 2010. "Molecular Characterization of the Key Switch F Provides a Basis for Understanding the Rapid Divergence of the Sex-Determining Pathway in the Housefly." *Genetics* 184 (1): 155–70. doi:10.1534/genetics.109.109249.

Hernandez, David C, K.C Lim, James H McKerrow, and Stephen J Davies. 2004. "Schistosoma Mansoni: Sex-Specific Modulation of Parasite Growth by Host Immune Signals." *Experimental Parasitology* 106 (1-2): 59–61. doi:10.1016/j.exppara.2004.01.003.

Herpin, Amaury, and Manfred Schartl. 2011. "Dmrt1 Genes at the Crossroads: A Widespread and Central Class of Sexual Development Factors in Fish." *Febs Journal* 278 (7): 1010–19.

Hildreth, Philip E. 1965. "Doublesex, a Recessive Gene That Tranforms Both Males and Females of Drosophila into Intersexes." *Genetics* 51 (4): 659–78.

Hoffmann, Karl F, Thomas A Wynn, and David W Dunne. 2002. "Cytokine-Mediated Host Responses during Schistosome Infections; Walking the Fine Line between Immunological Control and Immunopathology." *Advances in Parasitology* 52: 265–307.

Hong, Chang-Soo, Byung-Yong Park, and Jean-Pierre Saint-Jeannet. 2007. "The Function of Dmrt Genes in Vertebrate Development: It Is Not Just about Sex." *Developmental Biology* 310 (1): 1–9. doi:10.1016/j.ydbio.2007.07.035.

Huang, Xiao, Chang-Soo Hong, Michael O'Donnell, and Jean-Pierre Saint-Jeannet. 2005. "The Doublesex-Related Gene, XDmrt4, Is Required for Neurogenesis in the Olfactory System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32): 11349–54. doi:10.1073/pnas.0505106102.

Hulstijn, M., L. A. Barros, R. H. Neves, E. G. Moura, D. C. Gomes, and J. R. Machado-Silva. 2006. "Hermaphrodites and Supernumerary Testicular Lobes in Schistosoma Mansoni (Trematoda: Schistosomatidae) Analyzed by Brightfield and Confocal Microscopy." *Journal of Parasitology* 92 (3): 496–500.

Itoh, Yuichiro, Esther Melamed, Xia Yang, Kathy Kampf, Susanna Wang, Nadir Yehya, Atila Van Nas, Kirstin Replogle, Mark R. Band, and David F. Clayton. 2007. “Dosage Compensation Is Less Effective in Birds than in Mammals.” *Journal of Biology* 6 (1): 2.

Jablonka, Eva, and Marion J. Lamb. 1988. “Meiotic Pairing Constraints and the Activity of Sex Chromosomes.” *Journal of Theoretical Biology* 133 (1): 23–36. doi:10.1016/S0022-5193(88)80022-5.

Janssens, Fr A. 1909. *La Théorie de La Chiasmatypie...*

Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. doi:10.1126/science.1225829.

Johnson, Norman A., and Joseph Lachance. 2012. “The Genetics of Sex Chromosomes: Evolution and Implications for Hybrid Incompatibility.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1256 (1): E1–22. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06748.x.

Jourdane, J., D. Imbert-Establet, and LA Tchuem Tchuenté. 1995. “Parthenogenesis in Schistosomatidae.” *Parasitology Today* 11 (11): 427–30.

Kapp K, Knobloch J, Schü\s sler P, Sroka S, Lammers R, Kunz W, et al. 2004. "The Schistosoma mansoni Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization." *Mol Biochem Parasitol.* 138(2):171–82.

Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei-ichi Kuma, and Takashi Miyata. 2002. “MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform.” *Nucleic Acids Research* 30 (14): 3059–66.

Kato, Yasuhiko, Kaoru Kobayashi, Shigeto Oda, John K. Colbourn, Norihisa Tatarazako, Hajime Watanabe, and Taisen Iguchi. 2008. “Molecular Cloning and Sexually Dimorphic Expression of DM-Domain Genes in Daphnia Magna.” *Genomics* 91 (1): 94–101. doi:10.1016/j.ygeno.2007.09.002.

Kato, Yasuhiko, Kaoru Kobayashi, Hajime Watanabe, and Taisen Iguchi. 2011. “Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean Daphnia Magna: Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-Determining Pathway.” *PLoS Genetics* 7 (3): e1001345. doi:10.1371/journal.pgen.1001345.

Keeling, Patrick J., and Jeffrey D. Palmer. 2008. “Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Evolution.” *Nature Reviews Genetics* 9 (8): 605–18. doi:10.1038/nrg2386.

Khalil, L. F. 2002. “Family Schistosomatidae Stiles and Hassall, 1898.” *Keys to the Trematoda* 1: 419–32.

Khalil, Sami B, and Noshy S Mansour. 1995. “Worm Development in Hamsters Infected with Unisex and Cross-Mated Schistosoma Mansoni and Schistosoma Haematobium.” *The Journal of Parasitology*, 8–11.

Khayath, Naji, Jerome Vicogne, Arnaud Ahier, Amena BenYounes, Christian Konrad, Jacques Trolet, Eric Viscogliosi, Klaus Brehm, and Colette Dissous. 2007. “Diversification of the Insulin Receptor Family in the Helminth Parasite Schistosoma Mansoni.” *Febs Journal* 274 (3): 659–76.

Kim, Bo-Mi, Chang-Bum Jeong, Il-Chan Kim, Joung Han Yim, Yong Sung Lee, Jae-Sung Rhee, and Jae-Seong Lee. 2014. “Identification of Three Doublesex Genes in the Monogonont Rotifer Brachionus Koreanus and Their Transcriptional Responses to Environmental Stressor-Triggered Population Growth Retardation.” *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 174 (August): 36–44. doi:10.1016/j.cbpb.2014.05.003.

Kimura, Ryutaro, Chie Murata, Yoko Kuroki, and Asato Kuroiwa. 2014. “Mutations in the Testis-Specific Enhancer of SOX9 in the SRY Independent Sex-Determining Mechanism in the Genus Tokudaia.” Edited by Gerrit J. Bouma. *PLoS ONE* 9 (9): e108779. doi:10.1371/journal.pone.0108779.

Knobloch, Jürgen, Svenja Beckmann, Cora Burmeister, Thomas Quack, and Christoph G. Grevelding. 2007. "Tyrosine Kinase and Cooperative TGFβ Signaling in the Reproductive Organs of Schistosoma Mansoni." *Experimental Parasitology* 117 (3): 318–36. doi:10.1016/j.exppara.2007.04.006.

Koebernick, Katja, and Tomas Pieler. 2002. "Gli-type Zinc Finger Proteins as Bipotential Transducers of Hedgehog Signaling." *Differentiation* 70 (2-3): 69–76.

Koerich, Leonardo B., Xiaoyun Wang, Andrew G. Clark, and Antonio Bernardo Carvalho. 2008. "Low Conservation of Gene Content in the Drosophila Y Chromosome." *Nature* 456 (7224): 949–51. doi:10.1038/nature07463.

Koopman, Peter, John Gubbay, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, and Robin Lovell-Badge. 1991. "Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry." *Nature* 351 (6322): 117–21. doi:10.1038/351117a0.

Koopman, Peter, Andrea Münsterberg, Blanche Capel, Nigel Vivian, and Robin Lovell-Badge. 1990. "Expression of a Candidate Sex-Determining Gene during Mouse Testis Differentiation." *Nature* 348 (6300): 450–52.

Kopp, Artyom. 2012. "Dmrt Genes in the Development and Evolution of Sexual Dimorphism." *Trends in Genetics* 28 (4): 175–84. doi:10.1016/j.tig.2012.02.002.

Krautz-Peterson, Greice, Magdalena Radwanska, David Ndegwa, Charles B. Shoemaker, and Patrick J. Skelly. 2007. "Optimizing Gene Suppression in Schistosomes Using RNA Interference." *Molecular and Biochemical Parasitology* 153 (2): 194–202. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.03.006.

Kruger, Kelly, Paula J Grabowski, Arthur J Zaug, Julie Sands, Daniel E Gottschling, and Thomas R Cech. 1982. "Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena." *Cell* 31 (1): 147–57.

Kunz, W. 2001. "Schistosome Male-Female Interaction: Induction of Germ-Cell Differentiation." *Trends in Parasitology* 17 (5): 227–31.

Lahn, Bruce T., and David C. Page. 1999. "Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome." *Science* 286 (5441): 964–67.

Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods* 9 (4): 357–59.

Laporte, Valérie, and Brian Charlesworth. 2002. "Effective Population Size and Population Subdivision in Demographically Structured Populations." *Genetics* 162 (1): 501–19.

Laudet, Vincent, and Hinrich Gronemeyer. 2001. *The Nuclear Receptor Factsbook*. Gulf Professional Publishing.

Lawton, Scott P., Hirohisa Hirai, Joe E. Ironside, David A. Johnston, and David Rollinson. 2011. "Genomes and Geography: Genomic Insights into the Evolution and Phylogeography of the Genus Schistosoma." *Parasit Vectors* 4 (4): 131.

Leeuwenhoek, A. van. 1677. "Letter of October 9, 1676 to the Royal Society." *Philos Trans R Soc Lond B* 12: 821–31.

Leiper, Robert Thomson. 1915. "Report on the Results of the Bilharzia Mission in Egypt, 1915." *Journal of the Royal Army Medical Corps* 25 (1; 2).

Lepesant, Julie Mireille Joé, Julie Mireille, Joé Lepesant, Christoph Grunau, and Céline Cosseau. 2011. "Towards an Understanding of the Epigenetics of Schistosomes: A Comparative Epigenomic Study." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (7): 823–30.

Lepesant, Julie MJ, Céline Cosseau, Jérome Boissier, Michael Freitag, Julien Portela, Déborah Climent, Cécile Perrin, Adhemar Zerlotini, and Christoph Grunau. 2012. "Chromatin Structural Changes around Satellite Repeats on the Female Sex Chromosome in Schistosoma Mansoni and Their Possible Role in Sex Chromosome Emergence." *Genome Biology* 13 (2): R14.

Lepesant, Julie Mj, Celine Cosseau, Jerome Boissier, Michael Freitag, Julien Portela, Deborah Climent, Cecile Perrin, Adhemar Zerlotini, and Christoph Grunau. 2012. "Chromatin Structure Changes

around Satellite Repeats on the Schistosoma Mansoni Female Sex Chromosome Suggest a Possible Mechanism for Sex Chromosome Emergence." *Genome Biology* 13 (2): R14.

Lepesant, Julie M.J., David Roquis, Rémi Emans, Céline Cosseau, Nathalie Arancibia, Guillaume Mitta, and Christoph Grunau. 2012. "Combination of de Novo Assembly of Massive Sequencing Reads with Classical Repeat Prediction Improves Identification of Repetitive Sequences in Schistosoma Mansoni." *Experimental Parasitology* 130 (4): 470–74. doi:10.1016/j.exppara.2012.02.010.

Leutert, R. 1975. "Sex-Determination in Bonellia." In *Intersexuality in the Animal Kingdom*, edited by Professor Dr Rudolf Reinboth, 84–90. Springer Berlin Heidelberg.

Leutner, Silke, Katia C. Oliveira, Björn Rotter, Svenja Beckmann, Christin Buro, Steffen Hahnel, Joao P. Kitajima, Sergio Verjovski-Almeida, Peter Winter, and Christoph G. Grevelding. 2013. "Combinatory Microarray and SuperSAGE Analyses Identify Pairing-Dependently Transcribed Genes in Schistosoma Mansoni Males, Including Follistatin." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (11). doi:10.1371/journal.pntd.0002532.

Liew, Woei Chang, Richard Bartfai, Zijie Lim, Rajini Sreenivasan, Kellee R. Siegfried, and Laszlo Orban. 2012. "Polygenic Sex Determination System in Zebrafish." Edited by Berta Alsina. *PLoS ONE* 7 (4): e34397. doi:10.1371/journal.pone.0034397.

Lively, Curtis M. 1987. "Evidence from a New Zealand Snail for the Maintenance of Sex by Parasitism." *Nature* 328 (6130): 519–21.

Li, Weiqing, Robert Boswell, and William B. Wood. 2000. "Mag-1, a Homolog of Drosophila Mago Nashi, Regulates Hermaphrodite Germ-Line Sex Determination in Caenorhabditis Elegans." *Developmental Biology* 218 (2): 172–82.

Li, Wen-Hsiung, Soojin Yi, and Kateryna Makova. 2002. "Male-Driven Evolution." *Current Opinion in Genetics & Development* 12 (6): 650–56.

Lodé, Thierry. 2011. *Biodiversité Amoureuse (La): Sexe et évolution*. Odile Jacob.

Logan-Klumpler, F. J., N. De Silva, U. Boehme, M. B. Rogers, G. Velarde, J. A. McQuillan, T. Carver, et al. 2012. "GeneDB--an Annotation Database for Pathogens." *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D98–108. doi:10.1093/nar/gkr1032.

Loker, Eric S., and Sara V. Brant. 2006. "Diversification, Dioecy and Dimorphism in Schistosomes." *TRENDS in Parasitology* 22 (11): 521–28.

Long, Thavy, Katia Cailliau, Svenja Beckmann, Edith Browaeys, Jacques Trolet, Christoph G. Grevelding, and Colette Dissous. 2010. "Schistosoma Mansoni Polo-like Kinase 1: A Mitotic Kinase with Key Functions in Parasite Reproduction☆." *International Journal for Parasitology* 40 (9): 1075–86. doi:10.1016/j.ijpara.2010.03.002.

Long, Thavy, Mathieu Vanderstraete, Katia Cailliau, Marion Morel, Arlette Lescuyer, Nadege Gouignard, Christoph G. Grevelding, Edith Browaeys, and Colette Dissous. 2012. "SmSak, the Second Polo-Like Kinase of the Helminth Parasite Schistosoma Mansoni: Conserved and Unexpected Roles in Meiosis." Edited by Jason Mulvenna. *PLoS ONE* 7 (6): e40045. doi:10.1371/journal.pone.0040045.

LoVerde, Philip T, Luiza F Andrade, and Guilherme Oliveira. 2009. "Signal Transduction Regulates Schistosome Reproductive Biology." *Current Opinion in Microbiology* 12 (4): 422–28. doi:10.1016/j.mib.2009.06.005.

LoVerde, Philip T., Ahmed Osman, and Andrew Hinck. 2007. "Schistosoma Mansoni: TGF-β Signaling Pathways." *Experimental Parasitology* 117 (3): 304–17.

Lucchesi, John C., William G. Kelly, and Barbara Panning. 2005. "Chromatin Remodeling in Dosage Compensation." *Annu. Rev. Genet.* 39: 615–51.

Lyon, Mary F. 2000. "LINE-1 Elements and X Chromosome Inactivation: A Function for 'junk' DNA?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12): 6248–49.

Mank, Judith E. 2009. "The W, X, Y and Z of Sex-Chromosome Dosage Compensation." *Trends in Genetics* 25 (5): 226–33. doi:10.1016/j.tig.2009.03.005.

Mank, Judith E., Kiwoong Nam, and Hans Ellegren. 2010. “Faster-Z Evolution Is Predominantly Due to Genetic Drift.” *Molecular Biology and Evolution* 27 (3): 661–70. doi:10.1093/molbev/msp282.

Mann, Victoria H., Maria E. Morales, Gabriel Rinaldi, and Paul J. Brindley. 2010. “Culture for Genetic Manipulation of Developmental Stages of Schistosoma Mansoni.” *Parasitology* 137 (3): 451–62. doi:10.1017/S0031182009991211.

Manolakou, Panagiota, Giagkos Lavranos, and Roxani Angelopoulou. 2006. “Molecular Patterns of Sex Determination in the Animal Kingdom: A Comparative Study of the Biology of Reproduction.” *Reprod Biol Endocrinol* 4: 59.

Marco, Antonio, Ana Kozomara, Jerome H. L. Hui, Aidan M. Emery, David Rollinson, Sam Griffiths-Jones, and Matthew Ronshaugen. 2013a. “Sex-Biased Expression of MicroRNAs in Schistosoma Mansoni.” Edited by Malcolm K. Jones. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (9): e2402. doi:10.1371/journal.pntd.0002402.

Marks, Nikki J., and Aaron G. Maule. 2010. “Neuropeptides in Helminths: Occurrence and Distribution.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 692: 49–77.

Matson, Clinton K., and David Zarkower. 2012. “Sex and the Singular DM Domain: Insights into Sexual Regulation, Evolution and Plasticity.” *Nature Reviews Genetics*, February. doi:10.1038/nrg3161.

Matsubara, Kazumi, Hiroshi Tarui, Michihisa Toriba, Kazuhiko Yamada, Chizuko Nishida-Umehara, Kiyokazu Agata, and Yoichi Matsuda. 2006. “Evidence for Different Origin of Sex Chromosomes in Snakes, Birds, and Mammals and Step-Wise Differentiation of Snake Sex Chromosomes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (48): 18190–95.

Matsumoto, Yuiko, Alvin Buemio, Randy Chu, Mozhgon Vafaee, and David Crews. 2013. “Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (cyp19a1) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles.” Edited by Toshi Shioda. *PLoS ONE* 8 (6): e63599. doi:10.1371/journal.pone.0063599.

Maynard Smith, John. 1978. “The Evolution of Sex.”

McClung, Clarence Erwin. 1902. “The Accessory Chromosome—sex Determinant?” *The Biological Bulletin* 3 (1-2): 43–84.

Meisel, Richard P., and Tim Connallon. 2013. “The Faster-X Effect: Integrating Theory and Data.” *Trends in Genetics* 29 (9): 537–44. doi:10.1016/j.tig.2013.05.009.

Micklem, David R., Ramanuj Dasgupta, Heather Elliott, Fanni Gergely, Catherine Davidson, Andrea Brand, Acaimo González-Reyes, and Daniel St Johnston. 1997. “The Mago Nashi Gene Is Required for the Polarisation of the Oocyte and the Formation of Perpendicular Axes in Drosophila.” *Current Biology* 7 (7): 468–78.

Miller, Steven W., David C. Hayward, Thomas A. Bunch, David J. Miller, Eldon E. Ball, Vivian J. Bardwell, David Zarkower, and Danny L. Brower. 2003. “A DM Domain Protein from a Coral, Acropora Millepora, Homologous to Proteins Important for Sex Determination.” *Evolution & Development* 5 (3): 251–58.

Milligan, John N., and Emmitt R. Jolly. 2011. “Cercarial Transformation and in Vitro Cultivation of Schistosoma Mansoni Schistosomules.” *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 54.

Minard, P., D. A. Dean, R. H. Jacobson, W. E. Vannier, and K. D. Murrell. 1978. “Immunization of Mice with Cobalt-60 Irradiated Schistosoma Mansoni Cercariae.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (1 Pt 1): 76–86.

Mittwoch, Ursula. 2005. “Sex Determination in Mythology and History.” *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 49 (1): 7–13.

Mone, Helene, and Jerôme Boissier. 2004. “Sexual Biology of Schistosomes.” *Advances in Parasitology* 57: 89–189.

Morand, S., and C. D. M. Müller-Graf. 2000. “Muscles or Testes? Comparative Evidence for Sexual Competition among Dioecious Blood Parasites (Schistosomatidae) of Vertebrates.” *Parasitology* 120 (01): 45–56.

Morel, Marion, Mathieu Vanderstraete, Steffen Hahnel, Christoph G. Grevelding, and Colette Dissous. 2014. “Receptor Tyrosine Kinases and Schistosome Reproduction: New Targets for Chemotherapy.” *Frontiers in Genetics* 5 (July). doi:10.3389/fgene.2014.00238.

Moritz, C., H. McCallum, S. Donnellan, and J. D. Roberts. 1991. “Parasite Loads in Parthenogenetic and Sexual Lizards (Heteronotia Binoei): Support for the Red Queen Hypothesis.” *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 244 (1310): 145–49.

Mota-Santos, T. A., C. A. Tavares, G. Gazzinelli, and J. Pellegrino. 1977. “Immunosuppression Mediated by Adult Worms in Chronic Schistosomiasis Mansoni.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26 (4): 727–31.

Mousley, Angela, Ekaterina Novozhilova, Michael J. Kimber, and Tim A. Day. 2010. “Neuropeptide Physiology in Helminths.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 692: 78–97.

Muller, Hermann Joseph. 1932. “Some Genetic Aspects of Sex.” *American Naturalist*, 118–38.

Muller, Hermann Joseph. 1964. “The Relation of Recombination to Mutational Advance.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1 (1): 2–9.

Naimi, Amine, Anne-Sophie Martinez, Marie-Laure Specq, Abdellah Mrac, Blandine Diss, Michel Mathieu, and Pascal Sourdaine. 2009. “Identification and Expression of a Factor of the DM Family in the Oyster Crassostrea Gigas.” *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 152 (2): 189–96. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.019.

Nakazawa, Masatoshi, Marcelo R. Fantappie, George L. Freeman, Silvana Eloi-Santos, Nancy J. Olsen, W. J. Kovacs, W. Evan Secor, and Daniel G. Colley. 1997. “Schistosoma Mansoni: Susceptibility Differences between Male and Female Mice Can Be Mediated by Testosterone during Early Infection.” *Experimental Parasitology* 85 (3): 233–40.

Nash, Theodore E, EA Ottesen, and ANDA W Cheever. 1978. “Antibody Response to a Polysaccharide Antigen Present in the Schistosome Gut. II. Modulation of Antibody Response.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (5): 944–50.

Navarro-Martín, Laia, Jordi Viñas, Laia Ribas, Noelia Díaz, Arantxa Gutiérrez, Luciano Di Croce, and Francesc Piferrer. 2011. “DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass.” Edited by Emma Whitelaw. *PLoS Genetics* 7 (12): e1002447. doi:10.1371/journal.pgen.1002447.

Nawaratna, Sujeevi S. K., Donald P. McManus, Luke Moertel, Geoffrey N. Gobert, and Malcolm K. Jones. 2011. “Gene Atlasing of Digestive and Reproductive Tissues in Schistosoma Mansoni.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (4). doi:10.1371/journal.pntd.0001043.

Neves, Renata Heisler, Michele Costa-Silva, Elaine Machado Martinez, Carla de Lamare Biolchini, Henrique Leonel Lenzi, Delir Corrêa Gomes, and José Roberto Machado-Silva. 2003. “Reproductive System Abnormalities in Schistosoma Mansoni Adult Worms Isolated from Nectomys Squamipes (Muridae: Sigmodontinae): Brightfield and Confocal Laser Scanning Microscopy Analysis.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (3): 361–66.

Neves, Renata Heisler, Carla de Lamare Biolchini, José Roberto Machado-Silva, Jorge José Carvalho, Thiago Braga Branquinho, Henrique Leonel Lenzi, Maarten Hulstijn, and Delir Corrêa Gomes. 2005. “A New Description of the Reproductive System of Schistosoma Mansoni (Trematoda: Schistosomatidae) Analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy.” *Parasitology Research* 95 (1): 43–49. doi:10.1007/s00436-004-1241-2.

Newmark, Phillip A., and Robert E. Boswell. 1994. “The Mago Nashi Locus Encodes an Essential Product Required for Germ Plasm Assembly in Drosophila.” *Development* 120 (5): 1303–13.

Nunn, J. F., and E. Tapp. 2000. “Tropical Diseases in Ancient Egypt.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94 (2): 147–53.

Ogata, M., Y. Hasegawa, H. Ohtani, M. Mineyama, and I. Miura. 2008. “The ZZ/ZW Sex-Determining Mechanism Originated Twice and Independently during Evolution of the Frog, Rana Rugosa.” *Heredity* 100 (1): 92–99. doi:10.1038/sj.hdy.6801068.

Oliveira, Katia C., Mariana L. P. Carvalho, Thiago M. Venancio, Patricia A. Miyasato, Toshie Kawano, Ricardo DeMarco, and Sergio Verjovski-Almeida. 2009. "Identification of the Schistosoma Mansoni TNF-Alpha Receptor Gene and the Effect of Human TNF-Alpha on the Parasite Gene Expression Profile." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (12): e556. doi:10.1371/journal.pntd.0000556.

Oliveira, Katia C., Mariana L. P. Carvalho, Sergio Verjovski-Almeida, and Philip T. LoVerde. 2012. "Effect of Human TGF-β on the Gene Expression Profile of Schistosoma Mansoni Adult Worms." *Molecular and Biochemical Parasitology* 183 (2): 132–39. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.02.008.

Ono, Makoto, and Vincent R. Harley. 2013. "Disorders of Sex Development: New Genes, New Concepts." *Nature Reviews. Endocrinology* 9 (2): 79–91. doi:10.1038/nrendo.2012.235.

Osman, Ahmed, Edward G. Niles, Sergio Verjovski-Almeida, and Philip T. LoVerde. 2006. "Schistosoma Mansoni TGF-β Receptor II: Role in Host Ligand-Induced Regulation of a Schistosome Target Gene."

Ospina-Alvarez, Natalia, and Francesc Piferrer. 2008. "Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change." *PLoS One* 3 (7): e2837–e2837.

Otubanjo, O. A. 1981. "Schistosoma Mansoni: The Sustentacular Cells of the Testes." *Parasitology* 82 (01): 125–30.

Paladino, Frank V, Michael P O'Connor, and James R Spotila. 1990. "Metabolism of Leatherback Turtles, Gigantothermy, and Thermoregulation of Dinosaurs." *Nature* 344 (6269): 858–60.

Pan, Chia-Tung. 1965. "Studies on the Host-Parasite Relationship between Schistosoma Mansoni and the Snail Australorbis Glabratus." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14 (6): 931–76.

Pane, Attilio, Marco Salvemini, Pasquale Delli Bovi, Catello Polito, and Giuseppe Saccone. 2002. "The Transformer Gene in Ceratitis Capitata Provides a Genetic Basis for Selecting and Remembering the Sexual Fate." *Development* 129 (15): 3715–25.

Panic, Gordana, Mireille Vargas, Ivan Scandale, and Jennifer Keiser. 2015. "Activity Profile of an FDA-Approved Compound Library against Schistosoma Mansoni." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (7): e0003962. doi:10.1371/journal.pntd.0003962.

Parker, G. A., and J. Lehtonen. 2014. "Gamete Evolution and Sperm Numbers: Sperm Competition versus Sperm Limitation." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281 (1791): 20140836–20140836. doi:10.1098/rspb.2014.0836.

Parker, Geoff A., R. R. Baker, and V. G. F. Smith. 1972. "The Origin and Evolution of Gamete Dimorphism and the Male-Female Phenomenon." *Journal of Theoretical Biology* 36 (3): 529–53.

Parker-Manuel, Sophia J., Alasdair C. Ivens, Gary P. Dillon, and R. Alan Wilson. 2011. "Gene Expression Patterns in Larval Schistosoma Mansoni Associated with Infection of the Mammalian Host." Edited by John Pius Dalton. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (8): e1274. doi:10.1371/journal.pntd.0001274.

Payer, Bernhard, and Jeannie T. Lee. 2008. "X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance." *Annual Review of Genetics* 42: 733–72.

Pereira, A. S. A., N. L. Cavalcanti, G. A. F. Nascimento, J. L. G. Nascimento-Silva, R. J. R. Padilha, L. F. W. Viegas, L. C. Alves, J. L. Lima-Filho, and M. E. C. Chaves. 2013. "Morphological and Morphometric Study of Cercariae and Adult Worms of Schistosoma Mansoni (SLM Strain) Isolated from Infected Mice." *Parasitology Research* 112 (3): 1087–96. doi:10.1007/s00436-012-3235-9.

Perrin, Nicolas. 2012. "What Uses Are Mating Types? The 'developmental Switch' Model." *Evolution* 66 (4): 947–56.

Picard, Marion Anne-Lise, Céline Cosseau, Gabriel Mouahid, David Duval, Christoph Grunau, Ève Toulza, Jean-François Allienne, and Jérôme Boissier. 2015. "The Roles of Dmrt (Double

sex/Male-Abnormal-3 Related Transcription Factor) Genes in Sex Determination and Differentiation Mechanisms: Ubiquity and Diversity across the Animal Kingdom." *Comptes Rendus Biologies*, June. doi:10.1016/j.crvi.2015.04.010.

Pieau, C. 1971. "Sur La Proportion Sexuelle Chez Les Embryons de Deux Chéloniens (Testudo Graeca L. et Emys Orbicularis L.) Issus D'oeufs Incubés Artificiellement." *CR Acad. Sci. Paris* 272 (D): 3071–74.

Pieau, C. 1972. "Effects of temperature on development of gonads in embryos of 2 chelonians, emys-orbicular sl and testudo-graeca l." *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l academie des sciences serie d* 274 (5): 719

Piferrer, Francesc. 2013. "Epigenetics of Sex Determination and Gonadogenesis: Epigenetics and Sex Determination." *Developmental Dynamics* 242 (4): 360–70. doi:10.1002/dvdy.23924.

Platt, Thomas R., David Blair, J. Purdie, and L. Melville. 1991. "Griphobilharzia Amoena N. Gen., N. sp.(Digenea: Schistosomatidae), a Parasite of the Freshwater Crocodile Crocodylus Johnstoni (Reptilia: Crocodylia) from Australia, with the Erection of a New Subfamily, Griphobilharziinae." *The Journal of Parasitology*, 65–68.

Platt, Thomas R., and Daniel R. Brooks. 1997. "Evolution of the Schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): The Origin of Dioecy and Colonization of the Venous System." *The Journal of Parasitology*, 1035–44.

Popiel, I. 1986. "The Reproductive Biology of Schistosomes." *Parasitology Today* 2 (1): 10–15.

Portela, Julien, Christoph Grunau, Celine Cosseau, Sophie Beltran, Christelle Dantec, Hugues Parrinello, and Jerome Boissier. 2010. "Whole-Genome in-Silico Subtractive Hybridization (WISH)-Using Massive Sequencing for the Identification of Unique and Repetitive Sex-Specific Sequences: The Example of Schistosoma Mansoni." *BMC Genomics* 11 (1): 387.

Portmann, Adolf, and others. 1967. "Animal Forms and Patterns."

Potrzebowski, Lukasz, Nicolas Vinckenbosch, Ana Claudia Marques, Frédéric Chalmel, Bernard Jégou, and Henrik Kaessmann. 2008. "Chromosomal Gene Movements Reflect the Recent Origin and Biology of Therian Sex Chromosomes." *PLoS Biol* 6 (4): e80. doi:10.1371/journal.pbio.0060080.

Poulin, Robert, and Thomas H. Cribb. 2002. "Trematode Life Cycles: Short Is Sweet?" *Trends in Parasitology* 18 (4): 176–83. doi:10.1016/S1471-4922(02)02262-6.

Presgraves, Daven C., Emily Severance, and Gerald S. Willrinson. 1997. "Sex Chromosome Meiotic Drive in Stalk-Eyed Flies." *Genetics* 147 (3): 1169–80.

Protasio, Anna V., David W. Dunne, and Matthew Berriman. 2013. "Comparative Study of Transcriptome Profiles of Mechanical- and Skin-Transformed Schistosoma Mansoni Schistosomula." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (3). doi:10.1371/journal.pntd.0002091.

Protasio, Anna V., Isheng J. Tsai, Anne Babbage, Sarah Nichol, Martin Hunt, Martin A. Aslett, Nishadi De Silva, et al. 2012. "A Systematically Improved High Quality Genome and Transcriptome of the Human Blood Fluke Schistosoma Mansoni." Edited by Karl F. Hoffmann. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (1): e1455. doi:10.1371/journal.pntd.0001455.

Prugnolle, Franck, Thierry De Meeûs, Patrick Durand, C. Sire, and A. Théron. 2002. "Sex-specific Genetic Structure in Schistosoma Mansoni: Evolutionary and Epidemiological Implications." *Molecular Ecology* 11 (7): 1231–38.

Quinlan, Aaron R., Michael J. Boland, Mitchell L. Leibowitz, Svetlana Shumilina, Sidney M. Pehrson, Kristin K. Baldwin, and Ira M. Hall. 2011. "Genome Sequencing of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Retroelement Stability and Infrequent DNA Rearrangement during Reprogramming." *Cell Stem Cell* 9 (4): 366–73.

Raymond, C. S., C. E. Shamu, M. M. Shen, K. J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin, and D. Zarkower. 1998. "Evidence for Evolutionary Conservation of Sex-Determining Genes." *Nature* 391 (6668): 691–95. doi:10.1038/35618.

Read, A. F., and S. Nee. 1990. "Male Schistosomes: More than Just Muscle." *Parasitol Today* 6 (9): 297.

Rinaldi, Gabriel, Sabine E. Eckert, Isheng J. Tsai, Sutas Suttiprapa, Kristine J. Kines, José F. Tort, Victoria H. Mann, Daniel J. Turner, Matthew Berriman, and Paul J. Brindley. 2012. "Germline Transgenesis and Insertional Mutagenesis in Schistosoma Mansoni Mediated by Murine Leukemia Virus." *PLoS Pathogens* 8 (7): e1002820. doi:10.1371/journal.ppat.1002820.

Robinett, Carmen C., Alexander G. Vaughan, Jon-Michael Knapp, and Bruce S. Baker. 2010. "Sex and the Single Cell. II. There Is a Time and Place for Sex." *PLoS Biol* 8 (5): e1000365. doi:10.1371/journal.pbio.1000365.

Roeszler, Kelly N., Catherine Itman, Andrew H. Sinclair, and Craig A. Smith. 2012. "The Long Non-Coding RNA, MHM, Plays a Role in Chicken Embryonic Development, Including Gonadogenesis." *Developmental Biology* 366 (2): 317–26. doi:10.1016/j.ydbio.2012.03.025.

Ronquist, Fredrik, Maxim Teslenko, Paul van der Mark, Daniel L. Ayres, Aaron Darling, Sebastian Höhna, Bret Larget, Liang Liu, Marc A. Suchard, and John P. Huelsenbeck. 2012. "MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space." *Systematic Biology* 61 (3): 539–42.

Roquis, David, Julie MJ Lepesant, Marion AL Picard, Michael Freitag, Hugues Parrinello, Marco Groth, Rémi Emans, Céline Cosseau, and Christoph Grunau. 2015. "The Epigenome of Schistosoma Mansoni Provides Insight about How Cercariae Poise Transcription until Infection." *PLoS Negl Trop Dis* 9 (8): e0003853.

Ross, Jennifer M., Andrea K. Kalis, Mark W. Murphy, and David Zarkower. 2005. "The DM Domain Protein MAB-3 Promotes Sex-Specific Neurogenesis in C. Elegans by Regulating bHLH Proteins." *Developmental Cell* 8 (6): 881–92. doi:10.1016/j.devcel.2005.03.017.

Roulin, Anne C., Jarkko Routtu, Matthew D. Hall, Tim Janicke, Isabelle Colson, Christoph R. Haag, and Dieter Ebert. 2013. "Local Adaptation of Sex Induction in a Facultative Sexual Crustacean: Insights from QTL Mapping and Natural Populations of *Daphnia Magna*." *Molecular Ecology* 22 (13): 3567–79. doi:10.1111/mec.12308.

Rowntree, Susan, and C. James. 1977. "Single Sex Cercariae of Schistosoma Mansoni, a Comparison of Male and Female Infectivity." *Journal of Helminthology* 51 (01): 69–70.

Ruth Lawson, J, and RA Wilson. 1980. "Metabolic Changes Associated with the Migration of the Schistosomulum of Schistosoma Mansoni in the Mammal Host." *Parasitology* 81 (02): 325–36.

Sackton, Timothy B., Russell B. Corbett-Detig, Javaregowda Nagaraju, R. Lakshmi Vaishna, Kallare P. Arunkumar, and Daniel L. Hartl. 2014. "Positive Selection Drives Faster-Z Evolution in Silkmoths." *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 68 (8): 2331–42. doi:10.1111/evo.12449.

Saulnier, Amandine, Marc Keruzore, Sarah De Clercq, Isabelle Bar, Virginie Moers, Dario Magnani, Tessa Walcher, et al. 2013. "The Doublesex Homolog Dmrt5 Is Required for the Development of the Caudomedial Cerebral Cortex in Mammals." *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 23 (11): 2552–67. doi:10.1093/cercor/bhs234.

Saunders, Paul A., Julie Perez, Massilva Rahmoun, Ophélie Ronce, Pierre-André Crochet, and Frédéric Veyrunes. 2014. "XY Females Do Better than the XX in the African Pygmy Mouse, Mus Minutoides." *Evolution* 68 (7): 2119–27.

Shao, C., Q. Li, S. Chen, P. Zhang, J. Lian, Q. Hu, B. Sun, et al. 2014. "Epigenetic Modification and Inheritance in Sexual Reversal of Fish." *Genome Research* 24 (4): 604–15. doi:10.1101/gr.162172.113.

Shen, Michael M., and Jonathan Hodgkin. 1988. "Mab-3, a Gene Required for Sex-Specific Yolk Protein Expression and a Male-Specific Lineage in C. Elegans." *Cell* 54 (7): 1019–31. doi:10.1016/0092-8674(88)90117-1.

Shibata, Kazuyuki, Minoru Takase, and Masahisa Nakamura. 2002. "The Dmrt1 Expression in Sex-Reversed Gonads of Amphibians." *General and Comparative Endocrinology* 127 (3): 232–41.

Short, R. B. 1983. "Presidential Address: Sex and the Single Schistosome." *Journal of Parasitology*.

Short, Robert B. 1952. “Uniparental Miracidia of Schistosomatium Douthitti and Their Progeny (Tremaoda, Schistosomatidae).” *American Midland Naturalist*, 55–68.

Short, Robert B., and Margaret Y. Menzel. 1959. “Chromosomes in Parthenogenetic Miracidia and Embryonic Cercariae of Schistosomatium Douthitti.” *Experimental Parasitology* 8 (3): 249–64.

Shukla, J. N., and J. Nagaraju. 2010. “Doublesex: A Conserved Downstream Gene Controlled by Diverse Upstream Regulators.” *Journal of Genetics* 89 (3): 341–56.

Siegel, David A., and James W. Tracy. 1988. “Effect of Pairing in Vitro on the Glutathione Level of Male Schistosoma Mansoni.” *The Journal of Parasitology*, 524–31.

Silvestro, Daniele, and Ingo Michalak. 2012. “raxmlGUI: A Graphical Front-End for RAxML.” *Organisms Diversity & Evolution* 12 (4): 335–37.

Simões, Mariana C., Jonathan Lee, Appolinaire Djikeng, Gustavo C. Cerqueira, Adhemar Zerlotini, Rosiane A. da Silva-Pereira, Andrew R. Dalby, Philip LoVerde, Najib M. El-Sayed, and Guilherme Oliveira. 2011. “Identification of Schistosoma Mansoni microRNAs.” *BMC Genomics* 12 (1): 47.

Skelly, Patrick J. 2008. “Sex and the Single Schistosome.” *Natural History* 117 (5): 22–27.

Skelly, Patrick J., Akram A. Da’dara, Xiao-Hong Li, William Castro-Borges, and R. Alan Wilson. 2014. “Schistosome Feeding and Regurgitation.” Edited by Chetan E. Chitnis. *PLoS Pathogens* 10 (8): e1004246. doi:10.1371/journal.ppat.1004246.

Skelly, Patrick J., and Charles B. Shoemaker. 2000. “Induction Cues for Tegument Formation during the Transformation of Schistosoma Mansoni Cercariae.” *International Journal for Parasitology* 30 (5): 625–31.

Smith, Craig A., Kelly N. Roeszler, Thomas Ohnesorg, David M. Cummins, Peter G. Farlie, Timothy J. Doran, and Andrew H. Sinclair. 2009. “The Avian Z-Linked Gene DMRT1 Is Required for Male Sex Determination in the Chicken.” *Nature* 461 (7261): 267–71. doi:10.1038/nature08298.

Spotila, James R, and Edward A Standora. 1985. “Environmental Constraints on the Thermal Energetics of Sea Turtles.” *Copeia*, 694–702.

Steinauer, Michelle L. 2009. “The Sex Lives of Parasites: Investigating the Mating System and Mechanisms of Sexual Selection of the Human Pathogen Schistosoma Mansoni.” *International Journal for Parasitology* 39 (10): 1157–63. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.019.

Steinemann, Sigrid, and Manfred Steinemann. 2005. “Y Chromosomes: Born to Be Destroyed.” *BioEssays* 27 (10): 1076–83. doi:10.1002/bies.20288.

Stelkens, Rike B., and Claus Wedekind. 2010. “Environmental Sex Reversal, Trojan Sex Genes, and Sex Ratio Adjustment: Conditions and Population Consequences: ENVIRONMENTAL SEX REVERSAL AND TROJAN SEX GENES.” *Molecular Ecology* 19 (4): 627–46. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04526.x.

Stevens, Nettie Maria. 1905. *Studies in Spermatogenesis...: With Especial Reference to the“ Accessory Chromosome.”* Vol. 36. Carnegie Institution of Washington.

Storchová, Radka, Jiří Reif, and Michael W. Nachman. 2010. “Female Heterogamety and Speciation: Reduced Introgression of the Z Chromosome Between Two Species of Nightingales.” *Evolution* 64 (2): 456–71. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00841.x.

Sun, Jun, Suwen Wang, Chen Li, Yijiu Ren, and Jinqiang Wang. 2014. “Novel Expression Profiles of microRNAs Suggest That Specific miRNAs Regulate Gene Expression for the Sexual Maturation of Female Schistosoma Japonicum after Pairing.” *Parasit. Vectors* 7: 177.

Tachibana, Makoto. 2015. “Epigenetic Regulation of Mammalian Sex Determination.” *The Journal of Medical Investigation* 62 (1.2): 19–23.

Tao, Yun, John P. Masly, Luciana Araripe, Yeyan Ke, and Daniel L. Hartl. 2007. “A Sex-Ratio Meiotic Drive System in Drosophila Simulans. I: An Autosomal Suppressor.” *PLoS Biol* 5 (11): e292.

Tchuenté, LA Tchuem, VR Southgate, C Combes, and J Jourdane. 1996. “Mating Behaviour in Schistosomes: Are Paired Worms Always Faithful?” *Parasitology Today* 12 (6): 231–36.

Teranishi, Mika, Yukiko Shimada, Tetsuya Hori, Osamu Nakabayashi, Tateki Kikuchi, Tracy Macleod, Robert Pym, Bruce Sheldon, Irina Solovei, and Herbert Macgregor. 2001. “Transcripts of the

MHM Region on the Chicken Z Chromosome Accumulate as Non-Coding RNA in the Nucleus of Female Cells Adjacent to the DMRT1 Locus." *Chromosome Research* 9 (2): 147–65.

Théron, André. 2015. "Chronobiology of Trematode Cercarial Emergence: From Data Recovery to Epidemiological, Ecological and Evolutionary Implications." *Advances in Parasitology* 88 (April): 123–64. doi:10.1016/bs.apar.2015.02.003.

Tomlinson, J. 1966. "The Advantages of Hermaphroditism and Parthenogenesis." *Journal of Theoretical Biology* 11 (1): 54–58. doi:10.1016/0022-5193(66)90038-5.

Toups, Melissa A., James B. Pease, and Matthew W. Hahn. 2011. "No Excess Gene Movement Is Detected off the Avian or Lepidopteran Z Chromosome." *Genome Biology and Evolution* 3: 1381–90. doi:10.1093/gbe/evr109.

Tran, Mai H., Mark S. Pearson, Jeffrey M. Bethony, Danielle J. Smyth, Malcolm K. Jones, Mary Duke, Tegan A. Don, Donald P. McManus, Rodrigo Correa-Oliveira, and Alex Loukas. 2006. "Tetraspanins on the Surface of Schistosoma Mansoni Are Protective Antigens against Schistosomiasis." *Nature Medicine* 12 (7): 835–40.

Trapnell, Cole, Brian A. Williams, Geo Pertea, Ali Mortazavi, Gordon Kwan, Marijke J. Van Baren, Steven L. Salzberg, Barbara J. Wold, and Lior Pachter. 2010. "Transcript Assembly and Quantification by RNA-Seq Reveals Unannotated Transcripts and Isoform Switching during Cell Differentiation." *Nature Biotechnology* 28 (5): 511–15.

Traylor-Knowles, Nikki G., Eric G. Kane, Vanna Sombatsaphay, John R. Finnerty, and Adam M. Reitzel. 2015. "Sex-Specific and Developmental Expression of Dmrt Genes in the Starlet Sea Anemone, Nematostella Vectensis." *EvoDevo* 6 (1): 13. doi:10.1186/s13227-015-0013-7.

Tsai, Isheng J., Magdalena Zarowiecki, Nancy Holroyd, Alejandro Garciarrubio, Alejandro Sanchez-Flores, Karen L. Brooks, Alan Tracey, et al. 2013. "The Genomes of Four Tapeworm Species Reveal Adaptations to Parasitism." *Nature* 496 (7443): 57–63. doi:10.1038/nature12031.

Vanderstraete, Mathieu, Nadège Gouignard, Katia Cailliau, Marion Morel, Steffen Hahnel, Silke Leutner, Svenja Beckmann, Christoph G. Grevelding, and Colette Dissous. 2014. "Venus Kinase Receptors Control Reproduction in the Platyhelminth Parasite Schistosoma Mansoni." *PLoS Pathogens* 10 (5). doi:10.1371/journal.ppat.1004138.

Van Valen, Leigh. 1973. "A New Evolutionary Law." *Evolutionary Theory* 1: 1–30.

Veitia, Reiner A. 2005. "Gene Dosage Balance: Deletions, Duplications and Dominance." *Trends in Genetics* 21 (1): 33–35.

Veyrunes, F., P. Chevret, J. Catalan, R. Castiglia, J. Watson, G. Dobigny, T. J. Robinson, and J. Britton-Davidian. 2010. "A Novel Sex Determination System in a Close Relative of the House Mouse." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277 (1684): 1049–56. doi:10.1098/rspb.2009.1925.

Veyrunes, F., P. D. Waters, P. Miethke, W. Rens, D. McMillan, A. E. Alsop, F. Grutzner, et al. 2008. "Bird-like Sex Chromosomes of Platypus Imply Recent Origin of Mammal Sex Chromosomes." *Genome Research* 18 (6): 965–73. doi:10.1101/gr.7101908.

Vicogne, J., K. Cailliau, D. Tulasne, E. Browaeys, Y. T. Yan, V. Fafeur, J. P. Vilain, D. Legrand, J. Trolet, and C. Dissous. 2004. "Conservation of Epidermal Growth Factor Receptor Function in the Human Parasitic Helminth Schistosoma Mansoni." *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37407–14. doi:10.1074/jbc.M313738200.

Vicogne, Jerome, Katia Cailliau, David Tulasne, Edith Browaeys, Yu Tao Yan, Veronique Fafeur, Jean Pierre Vilain, Dominique Legrand, Jacques Trolet, and Colette Dissous. 2004. "Conservation of Epidermal Growth Factor Receptor Function in the Human Parasitic Helminth Schistosoma Mansoni." *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37407–14.

Vicogne, Jérôme, Jean-Philippe Pin, Vinca Lardans, Monique Capron, Christophe Noël, and Colette Dissous. 2003. "An Unusual Receptor Tyrosine Kinase of Schistosoma Mansoni Contains a Venus Flytrap Module." *Molecular and Biochemical Parasitology* 126 (1): 51–62.

Vicoso, Beatriz, and Doris Bachtrog. 2011. “Lack of Global Dosage Compensation in Schistosoma Mansoni, a Female-Heterogametic Parasite.” *Genome Biology and Evolution* 3: 230–35. doi:10.1093/gbe/evr010.

Vicoso, Beatriz, and Doris Bachtrog. 2013. “Reversal of an Ancient Sex Chromosome to an Autosome in Drosophila.” *Nature* 499 (7458): 332–35. doi:10.1038/nature12235.

Vicoso, Beatriz, and Doris Bachtrog.2015. “Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera.” *PLoS Biol* 13(4): e1002078. doi:10.1371/journal.pbio.1002078

Vicoso, Beatriz, J. J. Emerson, Yulia Zektser, Shivani Mahajan, and Doris Bachtrog. 2013. “Comparative Sex Chromosome Genomics in Snakes: Differentiation, Evolutionary Strata, and Lack of Global Dosage Compensation.” Edited by Nick H. Barton. *PLoS Biology* 11 (8): e1001643. doi:10.1371/journal.pbio.1001643.

Vicoso, B., V. B. Kaiser, and D. Bachtrog. 2013. “Sex-Biased Gene Expression at Homomorphic Sex Chromosomes in Emus and Its Implication for Sex Chromosome Evolution.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (16): 6453–58. doi:10.1073/pnas.1217027110.

Vilar, M. M., and R. M. Pinto. 2005. “Reappraisal of Experimental Infections with Cercariae and Schistosomula of a Brazilian Strain of Schistosoma Mansoni in Mice.” *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasleira De Biologia* 65 (4): 729–33. doi:/S1519-69842005000400020.

Volff, Jean-Nicolas, David Zarkower, Vivian J. Bardwell, and Manfred Schartl. 2003. “Evolutionary Dynamics of the DM Domain Gene Family in Metazoans.” *Journal of Molecular Evolution* 57 (1): S241–49. doi:10.1007/s00239-003-0033-0.

Volff, J.-N., I. Nanda, M. Schmid, and M. Schartl. 2007. “Governing Sex Determination in Fish: Regulatory Putsches and Ephemeral Dictators.” *Sexual Development* 1 (2): 85–99. doi:10.1159/000100030.

Von Baer, Carl Ernst. 1827. *De Ovi Mammalium et Hominis Genesi Epistolam (etc.)*. Leop. Voss.

Waisberg, M., F. P. Lobo, G. C. Cerqueira, L. K. J. Passos, O. S. Carvalho, N. M. El-Sayed, and G. R. Franco. 2008. “Schistosoma Mansoni: Microarray Analysis of Gene Expression Induced by Host Sex.” *Experimental Parasitology* 120 (4): 357–63. doi:10.1016/j.exppara.2008.09.005.

Wang, Bo, James J. Collins, and Phillip A. Newmark. 2013. “Functional Genomic Characterization of Neoblast-like Stem Cells in Larval Schistosoma Mansoni.” *Elife* 2: e00768.

Wang, Jun, Manyuan Long, and Maria D. Vibranovski. 2012. “Retrogenes Moved Out of the Z Chromosome in the Silkworm.” *Journal of Molecular Evolution* 74 (3-4): 113–26. doi:10.1007/s00239-012-9499-y.

Warner, Daniel A., Tobias Uller, and Richard Shine. 2013. “Transgenerational Sex Determination: The Embryonic Environment Experienced by a Male Affects Offspring Sex Ratio.” *Scientific Reports* 3 (September). doi:10.1038/srep02709.

Warner, Robert R. 1988. “Sex Change and the Size-Advantage Model.” *Trends in Ecology & Evolution* 3 (6): 133–36.

Wei, Kevin H.-C., Andrew G. Clark, and Daniel A. Barbash. 2014. “Limited Gene Misregulation Is Exacerbated by Allele-Specific up-Regulation in Lethal Hybrids between Drosophila Melanogaster and D. Simulans.” *Molecular Biology and Evolution*, April, msu127. doi:10.1093/molbev/msu127.

Weismann, August. 1889. “The Significance of Sexual Reproduction in the Theory of Natural Selection.” *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems* 1: 255–332.

Wells, Michael B., Martha J. Snyder, Laura M. Custer, and Gyorgyi Csankovszki. 2012. “Caenorhabditis Elegans Dosage Compensation Regulates Histone H4 Chromatin State on X Chromosomes.” *Molecular and Cellular Biology* 32 (9): 1710–19.

Wexler, Judith R., David C. Plachetzki, and Artyom Kopp. 2014. “Pan-Metazoan Phylogeny of the DMRT Gene Family: A Framework for Functional Studies.” *Development Genes and Evolution* 224 (3): 175–81. doi:10.1007/s00427-014-0473-0.

Wilkins, Adam S. 1995. “Moving up the Hierarchy: A Hypothesis on the Evolution of a Genetic Sex Determination Pathway.” *Bioessays* 17 (1): 71–77.

Williams, David L., Ahmed A. Sayed, Jeremiah Bernier, Shanda R. Birkeland, Michael J. Cipriano, Alexandria R. Papa, Andrew G. McArthur, Andrew Taft, Jon J. Vermeire, and Timothy P. Yoshino. 2007. "Profiling Schistosoma Mansoni Development Using Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)." *Experimental Parasitology* 117 (3): 246–58. doi:10.1016/j.exppara.2007.05.001.

Wilson, Edmund B. 1905. "Studies on Chromosomes. I. The Behavior of the Idiochromosomes in Hemiptera." *Journal of Experimental Zoology* 2 (3): 371–405.

Wilson, RA. 2009. "The Saga of Schistosome Migration and Attrition." *Parasitology* 136 (12): 1581–92.

Wilson, RA, Patricia S Coulson, and B Dixon. 1986. "Migration of the Schistosomula of Schistosoma Mansoni in Mice Vaccinated with Radiation-Attenuated Cercariae, and Normal Mice: An Attempt to Identify the Timing and Site of Parasite Death." *Parasitology* 92 (01): 101–16.

Wolff, Jennifer Ross, and David Zarkower. 2008. "Somatic Sexual Differentiation in Caenorhabditis Elegans." *Current Topics in Developmental Biology* 83: 1–39. doi:10.1016/S0070-2153(08)00401-8.

Wright, Alison E., Peter W. Harrison, Fabian Zimmer, Stephen H. Montgomery, Marie A. Pointer, and Judith E. Mank. 2015. "Variation in Promiscuity and Sexual Selection Drives Avian Rate of Faster-Z Evolution." *Molecular Ecology* 24 (6): 1218–35. doi:10.1111/mec.13113.

Wu Ct, null, and J. R. Morris. 2001. "Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532): 1103–5. doi:10.1126/science.293.5532.1103.

Wu, Wenjie, Edward G. Niles, Najib El-Sayed, Matthew Berriman, and Philip T. LoVerde. 2006. "Schistosoma Mansoni (Platyhelminthes, Trematoda) Nuclear Receptors: Sixteen New Members and a Novel Subfamily." *Gene* 366 (2): 303–15.

Wu, Wenjie, Tak, E. Y., & LoVerde, P. T. 2008. "Schistosoma mansoni: SmE78, a nuclear receptor orthologue of Drosophila ecdysone-induced protein 78." *Experimental parasitology*, 119(2), 313-318.

Yoshimoto, Shin, Ema Okada, Hirohito Umemoto, Kei Tamura, Yoshinobu Uno, Chizuko Nishida-Umehara, Yoichi Matsuda, Nobuhiko Takamatsu, Tadayoshi Shiba, and Michihiko Ito. 2008. "A W-Linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in Xenopus Laevis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (7): 2469–74.

Yoshino, Timothy P., Martha Brown, Xiao-Jun Wu, Colin J. Jackson, Ramon Ocadiz-Ruiz, Iain W. Chalmers, Marlen Kolb, Cornelis H. Hokke, and Karl F. Hoffmann. 2014. "Excreted/secreted Schistosoma Mansoni Venom Allergen-like 9 (SmVAL9) Modulates Host Extracellular Matrix Remodelling Gene Expression." *International Journal for Parasitology* 44 (8): 551–63.

Yoshizaki, Goro, Masaki Ichikawa, Makoto Hayashi, Yoshiko Iwasaki, Misako Miwa, Shinya Shikina, and Tomoyuki Okutsu. 2010. "Sexual Plasticity of Ovarian Germ Cells in Rainbow Trout." *Development (Cambridge, England)* 137 (8): 1227–30. doi:10.1242/dev.044982.

Yoshizawa, Akio, Yoshinari Nakahara, Toshiaki Izawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, and Yutaka Kikuchi. 2011. "Zebrafish Dmrta2 Regulates Neurogenesis in the Telencephalon." *Genes to Cells* 16 (11): 1097–1109. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01555.x.

You, Hong, Geoffrey N. Gobert, Malcolm K. Jones, Wenbao Zhang, and Donald P. McManus. 2011. "Signalling Pathways and the Host-parasite Relationship: Putative Targets for Control Interventions against Schistosomiasis." *Bioessays* 33 (3): 203–14.

You, Hong, Wenbao Zhang, Luke Moertel, Donald P. McManus, and Geoffrey N. Gobert. 2009. "Transcriptional Profiles of Adult Male and Female Schistosoma Japonicum in Response to Insulin Reveal Increased Expression of Genes Involved in Growth and Development." *International Journal for Parasitology* 39 (14): 1551–59.

Yu, Jun, Hao Wu, Yang Wen, Yujuan Liu, Tao Zhou, Bixian Ni, Yuan Lin, et al. 2015. "Identification of Seven Genes Essential for Male Fertility through a Genome-Wide Association Study of Non-

Obstructive Azoospermia and RNA Interference-Mediated Large-Scale Functional Screening in Drosophila." *Human Molecular Genetics* 24 (5): 1493–1503. doi:10.1093/hmg/ddu557.

Yusa, Y., M. Yoshikawa, J. Kitaura, M. Kawane, Y. Ozaki, S. Yamato, and J. T. Hoeg. 2012. "Adaptive Evolution of Sexual Systems in Pedunculate Barnacles." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1730): 959–66. doi:10.1098/rspb.2011.1554.

Zarkower, David. 2013. "DMRT Genes in Vertebrate Gametogenesis." In *Current Topics in Developmental Biology*, 102:327–56. Elsevier.

Zhang, Yang, Shen Zhang, Zhixin Liu, Lihong Zhang, and Weimin Zhang. 2013. "Epigenetic Modifications During Sex Change Repress Gonadotropin Stimulation of *Cyp19a1a* in a Teleost Ricefield Eel (*Monopterus Albus*)." *Endocrinology* 154 (8): 2881–90. doi:10.1210/en.2012-2220.

Zhao, D., D. McBride, S. Nandi, H. A. McQueen, M. J. McGrew, P. M. Hocking, P. D. Lewis, H. M. Sang, and M. Clinton. 2010. "Somatic Sex Identity Is Cell Autonomous in the Chicken." *Nature* 464 (7286): 237–42. doi:10.1038/nature08852.

Zhao, Zhi-rong, Li Lei, Miao Liu, Shao-chun Zhu, Cui-ping Ren, Xiao-nan Wang, and Ji-jia Shen. 2008. "Schistosoma Japonicum: Inhibition of Mago Nashi Gene Expression by shRNA-Mediated RNA Interference." *Experimental Parasitology* 119 (3): 379–84. doi:10.1016/j.exppara.2008.03.015.

Zha, Xingfu, Qingyou Xia, Jun Duan, Chunyun Wang, Ningjia He, and Zhonghuai Xiang. 2009. "Dosage Analysis of Z Chromosome Genes Using Microarray in Silkworm, Bombyx Mori." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (5): 315–21.

Zhu, L., J. Wilken, N. B. Phillips, U. Narendra, G. Chan, S. M. Stratton, S. B. Kent, and M. A. Weiss. 2000. "Sexual Dimorphism in Diverse Metazoans Is Regulated by a Novel Class of Intertwined Zinc Fingers." *Genes & Development* 14 (14): 1750–64.

ANNEXE 1 – *Supplementary files*

Supplementary file 1: PCR and qPCR primers.

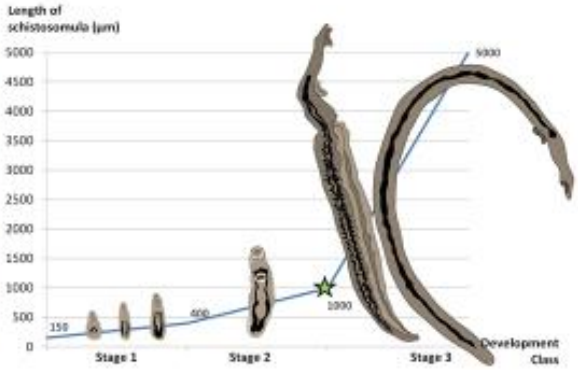
PCRs for sex genotyping of cercariae			
Targets	**Forward primers**	**Reverse primers**	**Expected product sizes (bp)**
Rhodopsin (autosomal)	GACGGCCACACTAAAG	AGTAAAATGGTCACTGCTAT	191
Scaffold_002739 (W-specific)	TGTTTCGAATTTCACACTTAC	CATTCACAGTTTGGCGAACA	391

Housekeeping genes (Wang et al. 2013)				
Targets	**Forward primers**	**Reverse primers**	**Expected product sizes (bp)**	**Efficiency**
Smp_093230	GAAGGCTTGGAAGGATTCTG	CAACTGCCAACTCTCGGATA	137	2
Smp_197220	ACGTACCTTCGTGGGACTTT	TCGTCCAGTCCAAGGTGATA	138	2
Smp_089880	TACGGTTTCTCTTCCCAACC	CATGGACCTGCTGCATTTAC	73	1,99

qPCRs for RNAseq validation				
Targets	**Primers (F=Forward, R=Reverse)**	**Primer sequences**	**Expected product sizes (bp)**	**Efficiency**
Smp_094140	Smp_094140_1F	CCCATCATATCACGTTTCG	122	2,03
	Smp_094140_1R	GTATCTTCTGAACCATGTCTCC		
Smp_124230	Smp_124230_1F	AGAGTTAGATAAACTGTTACAAGGT	115	1,84
	Smp_124230_1R	CTGACAAGTTACGGCTAAAGTATGA		
Smp_040020	Smp_040020_1F	GAAATTACCATTTGCACGTTTAGT	133	1,888
	Smp_040020_1R	TAAATGAACAATAAATGCTTCAGCAG		
Smp_147450	Smp_147450_1F	GGGTACAGGATCATTTGGTC	133	1,938
	Smp_147450_1R	CCTCTTCTCATTAAGCGTG		
Smp_167810	Smp_167810_1F	CTTCAGCGATTGCCGGA	112	1,846
	Smp_167810_1R	AAGGACTTGCTTACAGATTCAAA		
Smp_158190	Smp_158190_1F	AATAATTTCTGGTTCAATTCTTACCAT	110	1,803
	Smp_158190_1R	TCGCATCACTGAACATATCCTT		
Smp_079920	Smp_079920_1F	GCGCTCTTCGGCCAATA	120	1,995
	Smp_079920_1R	CAGAACGACACCAATCAG		
Smp_145230	Smp_145230_1F	ATCTGGTGGAGGGAGAC	141	1,921
	Smp_145230_1R	GTATCCGATGATGTATTATTAGGACT		
Smp_170750	Smp_170750_1F	CACCGGAACAATTAGAGATACTT	112	1,969
	Smp_170750_1R	TGTATTCGGGATTCTGGTATTAAC		
Smp_045470	Smp_045470_1F	TAATCGTGGATCTACTGCACA	131	1,907
	Smp_045470_1R	ACAGTCGAATATCATCTGCT		
Smp_176360	Smp_176360_1F	CTAAGTCAAGAAGAAGGTGAATACTAC	110	2,02
	Smp_176360_1R	TTACGTTCAGCTAACATTACCTC		
Smp_144180	Smp_144180_1F	TTTGTCAGACGCTATTCGG	122	2,01
	Smp_144180_1R	ATGATACTAATATAGCAAGAGGGC		
Smp_090890	Smp_090890_1F	CGTAAGACGAAGCTCACA	116	1,909
	Smp_090890_1R	CATGACCAAATCCGCCC		
Smp_126310	Smp_126310_1F	AGATGCTCAAGAAGCTCG	121	1,976
	Smp_126310_1R	TAGTTGAATCAATGCTTGGGT		
Smp_085290	Smp_085290_1F	AAGACCTCGAATCGCAACATA	126	1,953
	Smp_085290_1R	TCTGCAACTGTTCCCGT		
Smp_153930	Smp_153930_1F	GCCATTTACACCAATGCG	115	2,03
	Smp_153930_1R	ATCAATCCCGAATTCCCTT		
Smp_127030	Smp_127030_1F	GTCCATTATCAGAGTGTCCG	150	1,864
	Smp_127030_1R	ACTGAGAATACTGTATAGTATGTGATTTAG		
Smp_061510	Smp_061510_1F	TGGTGGTACATTACATTCAGGT	123	1,886
	Smp_061510_1R	GCAATAATTCTTGGAGCTATTCG		
Smp_082620	Smp_082620_1F	GTTGTGCTATTCGTAATGTATGG	150	2,1
	Smp_082620_1R	TGCTAGTTCAATAGGCACTG		

Smp_030000	Smp_030000_1F	GAAGGTAGAATGGTTATGGCTGA	116	1,926
	Smp_030000_1R	TAGGCTCGAATAGCATGTCC		
Smp_175090	Smp_175090_1F	ACTAAGTATCCAGAATCAGAACG	123	1,886
	Smp_175090_1R	CAAAGTAGCATACAGAGGGAC		
Smp_002600	Smp_002600_1F	GCTGTACTATCACTGACGAATTAT	117	1,772
	Smp_002600_1R	TGTTACCATCTCCATGCAAG		
Smp_020270	Smp_020270_1F	GTGAACAACAAGATTATCTGGGT	136	1,878
	Smp_020270_1R	GGTTCCTCTTCAATCAGCC		
Smp_022400	Smp_022400_1F	TCATAATTGCGATGTCGGC	155	1,76
	Smp_022400_1R	TGAGTAGTCCAACAGAATAGTACC		
Smp_031720	Smp_031720_1F	TGGAAATTATGTCAGGAAGAGG	142	1,922
	Smp_031720_1R	GACGTTCGACGAGCATAC		
Smp_033020	Smp_033020_1F	TAGCTTCAGACCCTCGTG	115	1,9
	Smp_033020_1R	CCCAGTAAATTAGACTCTTCGTTAT		
Smp_089860	Smp_089860_1F	CTTCTTTCTCTGTGTTCGCT	103	1,843
	Smp_089860_1R	CCTGCAATACAAACTGGTTATCA		
Smp_171710	Smp_171710_1F	ATCGTCACTAAGACTTTCGG	157	1,809
	Smp_171710_1R	CACTTAACACAGATTCGCTAC		
Smp_023530	Smp_023530_1F	GGAATTTCACGAATCAAAGTGT	133	1,81
	Smp_023530_1R	GGAGTCGATCTTCAGGGT		
Smp_155060	Smp_155060_1F	TTCATTTAGTTACTGCGCTTGC	120	2,02
	Smp_155060_1R	CTTCAAAGCTAGATTCTGGGC		
XLOC_012827	XLOC_012827_1F	TTGTCGAACGTCAAGGTC	119	2,09
	XLOC_012827_1R	CTTTGCGAAACTTCGCC		
Smp_142180	Smp_142180_1F	GCTACGTTGCATCTTACACTA	119	1,904
	Smp_142180_1R	TTAACTTGCTCTTCGACCAAT		
Smp_005210	Smp_005210_1F	AGCTGCATATAAGTCCGAG	114	1,879
	Smp_005210_1R	GAACACTAGGACAGTGAGG		
Smp_027300	Smp_027300_1F	TTTATTGAATCTTACGGTTCGACG	136	1,904
	Smp_027300_1R	GTAAATATAGTGGTAGCGACCC		
Smp_068950	Smp_068950_1F	TTTCTCTTCAAAGCGAAGTAGATAG	120	1,94
	Smp_068950_1R	GTACAATCCGTTCAAGGCAT		
Smp_131000	Smp_131000_1F	CACATATAACAGTTGTTAATTCGGG	145	1,987
	Smp_131000_1R	GCAATGACAACGCCATAC		
Smp_052910	Smp_052910_1F	ATATCCAAGATGCCGTCG	126	1,86
	Smp_052910_1R	TTGCTCCTCCAACCCTAAA		
Smp_063040	Smp_063040_1F	TGTTAGAAGCTGGCGGA	162	1,829
	Smp_063040_1R	AATCACGTTGTAATCTATCGGT		
Smp_067980	Smp_067980_1F	TACTTTCAATTTGTTCATTATTGACGG	133	1,908
	Smp_067980_1R	ATAGCATATTTCTGTGTCCACT		
Smp_166110	Smp_166110_1F	TTCATCAAGGACGAGCTG	151	2,26
	Smp_166110_1R	CTTGCCTTGCTTCACTACTAA		
Smp_095130	Smp_095130_1F	TAAATGATTGTGTGGAGTCAAGC	113	2
	Smp_095130_1R	AGGAGAGGTTAGTGAGGTC		
Smp_026560	Smp_026560_1F	TTAGGTACAGTCATGCGCT	165	1,864
	Smp_026560_1R	TCTAATCTCTTCTTCACTGTCTGTAT		
Smp_065610	Smp_065610_1F	TTGTAATGCTGCCGCTATC	127	1,797
	Smp_065610_1R	GTGAATTTGACGAGCAATAACTT		

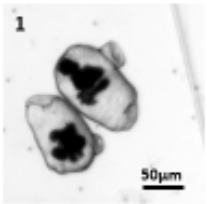
Supplementary file 2: Sorting criteria of *in vivo* schistosomulum stages.

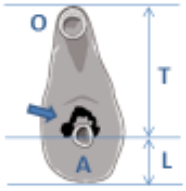


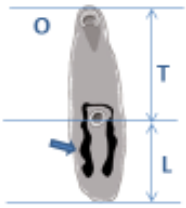
A. Developmental asynchrony of male schistosomula, recovered 28 days post-infection.

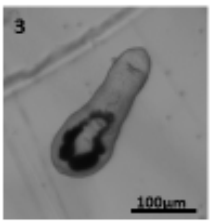
B. Schistogram: morphological growth of schistosome parasites. Sizes are signaled for information only. Sorting criteria are based on caecum shape, acetabulum location and gynaecophoric canal appearance in males *(slides 2 & 3)*.

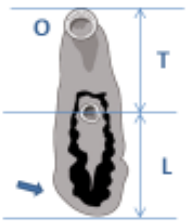
S2 - 1/3

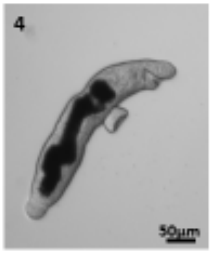


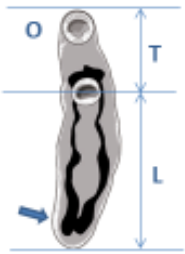










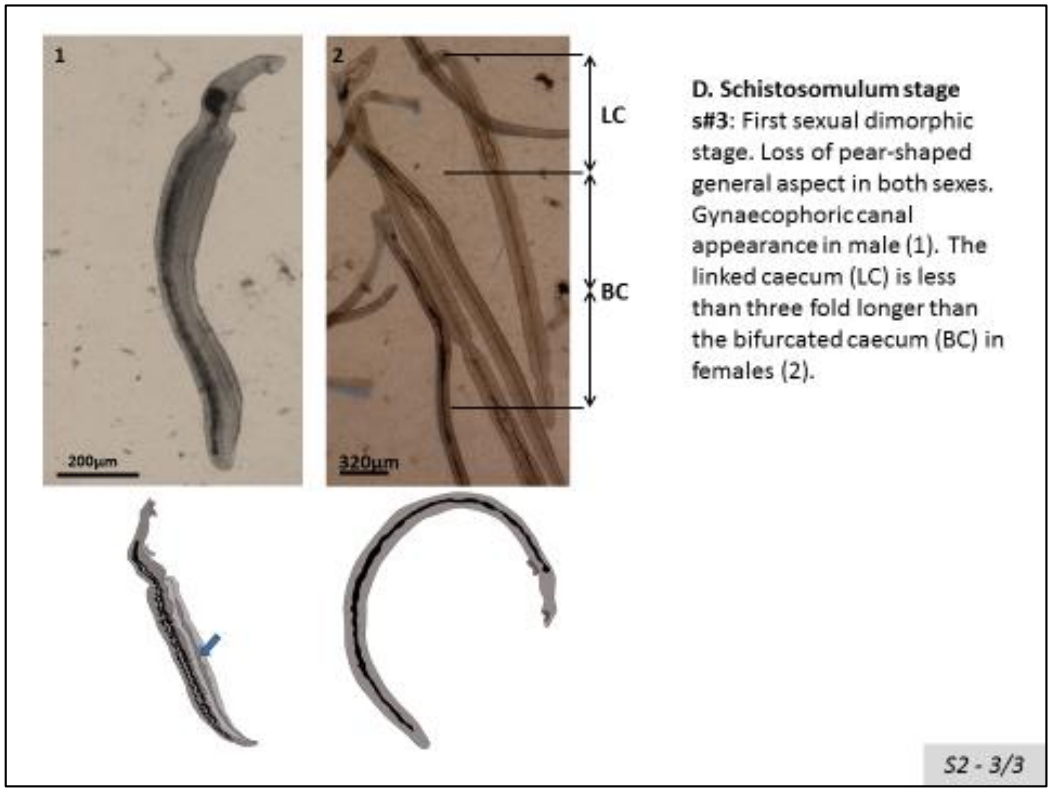


C. Description of schistosomulum stages

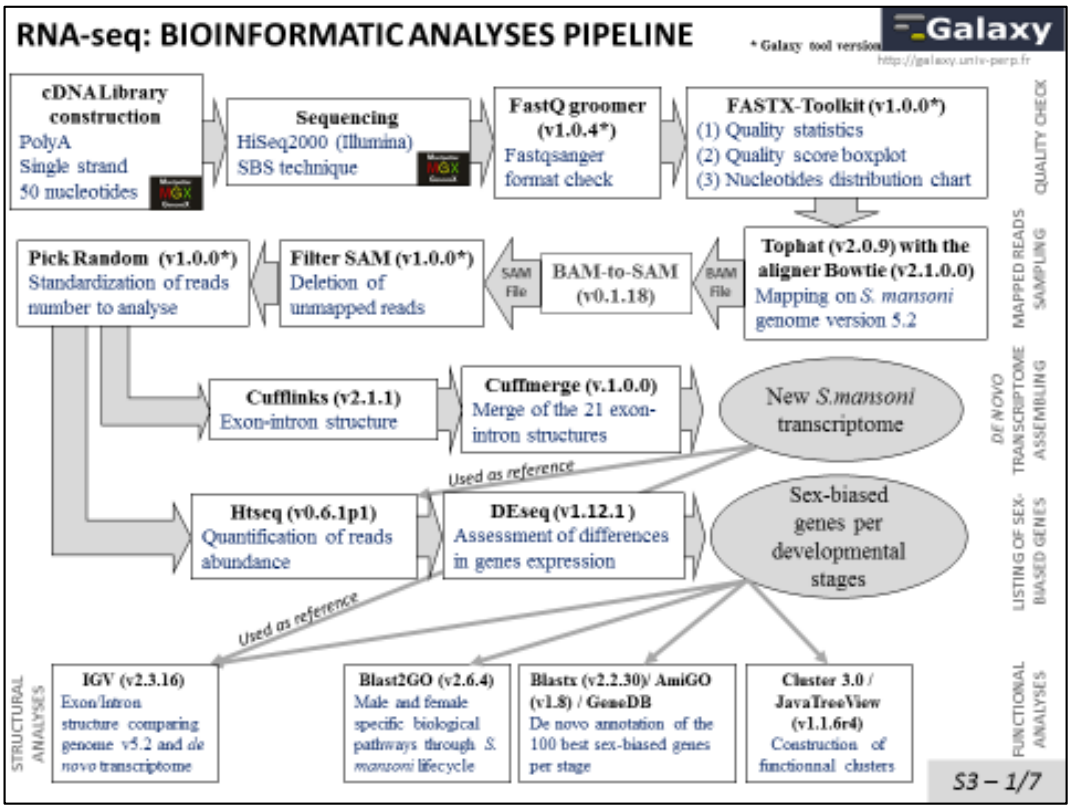
Schistosomulum stage s#1 (1, 2 & 3): Pear-shaped general aspect with the top part from the oral sucker (O) to the acetabulum (T) is taller than the lower part (L) of the body (1 & 2) or of the same size (3). Black pigmented caecum is non-fused (1 & 2) or fused (3). If it is not fused it surrounds the acetabulum and is horseshoe-shaped (2) or not (1).

Schistosomulum stage s#2 (4): Allometric growth defined by an extended pear-shape with the top part from the oral sucker to the acetabulum (T) is smaller than the lower part (L) of the body. Black pigmented caecum is fused.

S2 - 2/3



Supplementary file 3: Bioinformatic workflow and quality of the metrics.

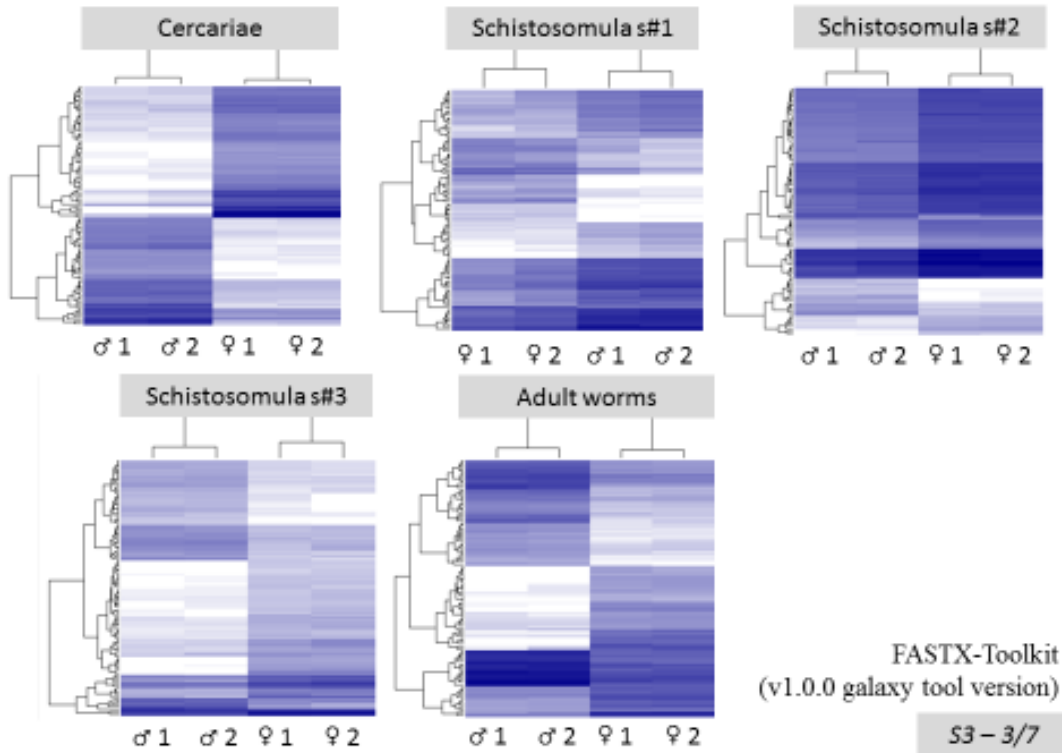


RNA-seq: QUALITY OF THE METRICS

Sample			Quality of the metrics						
Sex	Developmental stage	Replicate	Sequenced reads	Groomed reads	Mapped reads	Percentage of mapped reads	Multiple alignment	Percentage of multiple alignment	Mapped reads taking into account multiple alignments
Male	Cercariae	1	55 155 173	55 155 173	52 571 075	95,3%	8 032 851	15,3%	92 979 773
Male	Cercariae	2	59 917 253	59 917 253	56 787 599	94,8%	9 170 093	16,1%	97 872 639
Male	Schistosomula stage 1	1	49 459 102	49 459 102	42 946 812	86,8%	6 414 528	14,9%	70 667 324
Male	Schistosomula stage 1	2	78 862 393	78 862 393	63 455 884	80,5%	10 689 290	16,8%	117 509 517
Male	Schistosomula stage 2	1	46 435 950	46 435 950	41 021 369	88,3%	7 674 067	18,7%	78 408 908
Male	Schistosomula stage 2	2	45 483 785	45 483 785	42 224 436	92,8%	9 935 897	23,5%	87 733 454
Male	Schistosomula stage 3	1	50 736 887	50 736 887	48 352 597	95,3%	9 256 137	19,1%	101 017 417
Male	Schistosomula stage 3	2	54 969 867	54 969 867	52 502 684	95,5%	8 747 069	16,7%	94 467 640
Male	Adult Worms	1	92 986 429	92 986 429	88 604 058	95,3%	13 404 439	15,1%	155 335 224
Male	Adult Worms	2	56 525 649	56 525 649	52 804 964	93,4%	8 343 204	15,8%	90 541 752
Female	Cercariae	1	42 102 368	42 102 368	39 714 246	94,3%	7 405 637	18,6%	89 824 912
Female	Cercariae	2	52 423 593	52 423 593	49 230 139	93,9%	8 584 861	17,4%	104 914 020
Female	Schistosomula stage 1	1	40 838 407	40 838 407	34 421 271	84,3%	6 058 612	17,6%	65 844 021
Female	Schistosomula stage 1	2	50 328 305	50 328 305	38 288 326	76,1%	6 895 542	18,0%	81 002 227
Female	Schistosomula stage 2	1	44 955 734	44 955 734	41 488 974	92,3%	6 974 631	16,8%	75 247 827
Female	Schistosomula stage 2	2	50 684 669	50 684 669	42 803 702	84,5%	8 329 585	19,5%	94 331 741
Female	Schistosomula stage 3	1	52 487 717	52 487 717	48 728 431	92,8%	9 709 543	19,9%	106 032 001
Female	Schistosomula stage 3	2	54 624 768	54 624 768	49 018 802	89,7%	9 087 749	18,5%	102 312 587
Female	Adult Worms	1	48 724 561	48 724 561	46 277 234	95,0%	7 176 790	15,5%	92 801 485
Female	Adult Worms	2	52 683 651	52 683 651	50 120 959	95,1%	8 178 369	16,3%	98 391 482
Sum			1 080 386 261	1 080 386 261	981 363 482	N.A.	170 068 892	N.A.	1 897 227 931
Mean			54 019 313,05	54 019 313,05	49 068 174,10	90,81%	8 503 444,60	17,52%	97 681 883,62
Number of reads used for differential expression analysis			N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1 316 880 420

S3 – 2/7

RNA-seq: HEATMAPS (100 best P-values per stage)



FASTX-Toolkit
(v1.0.0 galaxy tool version)

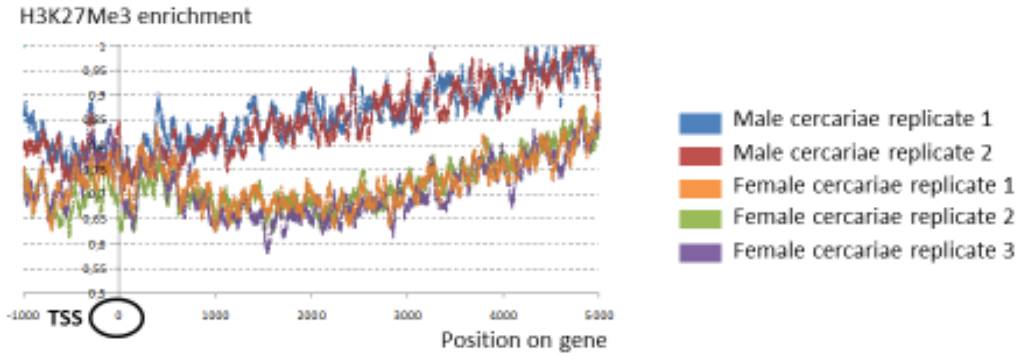
S3 – 3/7

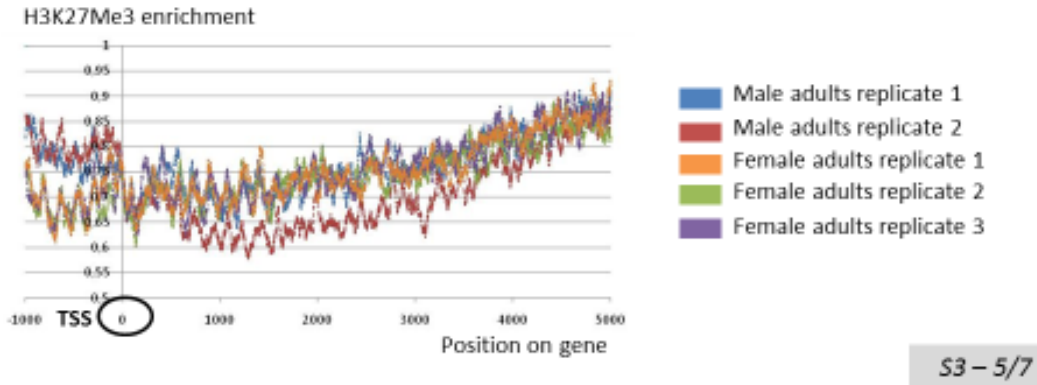
ChIP-seq: QUALITY OF THE METRICS

	Adult males				Adult females				Cercaria male				Cercaria female			
	Unbound_1	Unbound_2	H3K27Me3_1	H3K27Me3_2	Unbound_1	Unbound_2	H3K27Me3_1	H3K27Me3_2	Unbound_1	Unbound_2	H3K27Me3_1	H3K27Me3_2	Unbound_1	Unbound_2	H3K27Me3_1	H3K27Me3_2
raw data	33 119 430	29 687 218	39 508 805	28 879 242	39 423 831	25 378 682	36 815 594	45 320 761	44 606 481	44 157 403	34 670 844	46 214 556	38 753 631	40 949 706	51 819 705	44 155 986
groomed	33 119 430	29 687 218	39 508 805	28 879 242	39 423 831	25 378 682	36 815 594	45 320 761	44 606 481	44 157 403	34 670 844	46 214 556	38 753 631	40 949 706	51 819 705	44 155 986
QC passed	33 119 430	29 687 218	39 508 805	28879342	39 423 831	25 378 682	36 815 594	45320761	44 606 481	44 157 403	34 670 844	46214556	38 753 631	40 949 706	51 819 705	44 155 986
aligned (=1)	17 685 004	15 049 246	22 341 047	15 255 606	18 556 275	12 576 032	17 722 235	23 034 830	24 152 929	23 002 385	20 714 025	26 301 405	16 732 388	19 657 069	25 418 099	22 382 122
aligned (=1) %	53,40%	50,69%	56,39%	53,17%	47,07%	49,55%	48,14%	50,83%	54,15%	49,83%	59,74%	56,70%	43,18%	48,00%	49,05%	52,95%
aligned (>1)	14 018 376	13 624 187	15 493 271	12 343 496	18 924 948	11 676 105	16 812 583	19 600 397	18 935 354	20 516 084	12 542 556	18 287 941	20 258 268	19 593 421	24 058 455	18 592 334
aligned (>1) %	42,33%	45,89%	39,21%	42,74%	48,00%	46,01%	45,67%	42,25%	42,45%	46,46%	36,18%	39,57%	52,27%	47,85%	46,43%	42,11%
total mapping %	95,73%	96,59%	95,51%	95,91%	95,07%	95,56%	93,81%	94,07%	96,60%	96,29%	95,92%	96,37%	95,45%	95,85%	95,48%	95,06%
used for peak calling	15 000 000	15 000 000	15 000 000	15000000	15 000 000	12576032	15 000 000	15000000	15 000 000	15 000 000	15 000 000	15000000	15 000 000	15 000 000	15 000 000	15 000 000
number of peaks	N.A.	N.A.	8363	6947	N.A.	N.A.	14 302	5 697	N.A.	N.A.	7 116	11 382	N.A.	N.A.	5 044	4 719

S3 – 4/7

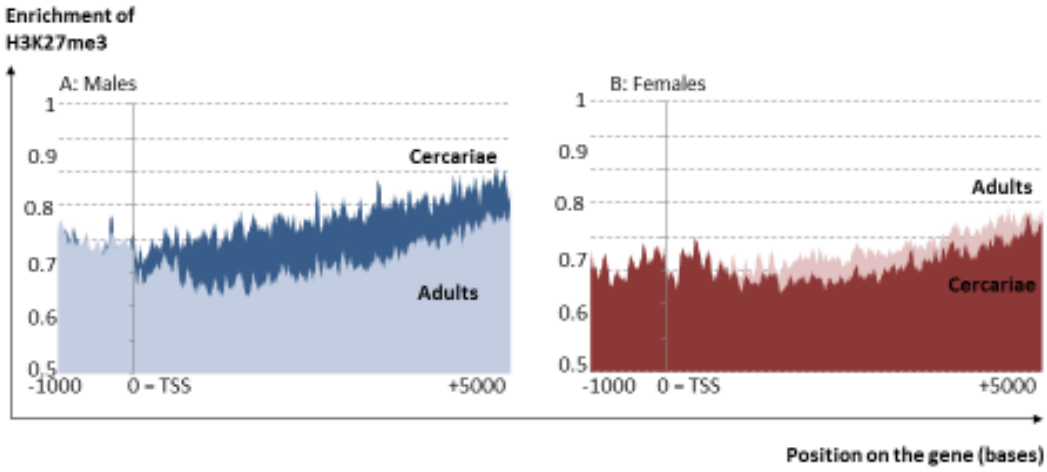
ChIP-seq: REPLICATE REPRODUCTIBILITY OF EPICHIP ANALYSIS





S3 – 5/7

ChIP-seq: Male and Female H3K27Me3 enrichments, depending on stage.



S3 – 6/7

Statistical test of EpiChIP profiles differences

Comparison between sexes			
	Extreme Differences	Z value	p
Cercariae	76,50%	41,91	<0,001
Adults	10,70%	5,862	<0,001
Comparison between stages			
	Extreme Differences	Z value	p
Males	56,30%	30,811	<0,001
Femelles	25,60%	13,997	<0,001

All pairs of comparison are significant (Kolmogorov-Smirnov two sample tests; p<0.001). The extreme differences given by the Kolmogorov-Smirnov two sample tests show that (i) the difference between adult male and adult female distribution is low (10.7% of maximum difference) compare to cercarial stage (76.5% of maximum difference) (ii) the difference in chromatine structural change from cercariae to adult is twice in male compare to female (25.6% of maximum difference for female vs 56.3% of maximum difference for male).

S3 – 7/7

Supplementary file 4: *De novo* functional annotation and structural analysis of the 100 best P-values: an overview.

In this part of the study we focused on the **100 best-hits of sex-biased transcripts (100 best adjusted P-values) of the five developmental stages**, introducing the two stages of schistosomula s#1 and s#3, respectively younger and older than schistosomula s#2. The transcripts were (i) mapped on the *S.mansoni* genome 5.2 in order to identify transcripts that matched with previously annotated genes and those that corresponded to newly described expressed loci; (ii) subjected to manual de novo annotation based on predictive protein domain analysis and sequence homology. This analysis allowed us to assign a putative function to 40.5% of the female-biased products and 68% of male-biased ones. Following the same pattern of the global analysis, the proportion of male-associated transcripts is maximal in the developmental stage schistosomula s#2 (Figure SF4_F1). This improvement was particularly true for genes that were specifically localized on the Z-chromosome, and we noticed an over-representation of male-biased transcripts on this chromosome specifically during the schistosomula differentiation. Among the female-biased genes, five (in schistosomula s#2) to 14 (in adults) were exclusively detected in females and an important proportion were described for the first time in this study. This is a global trend of female-associated 100 best-hits: 40% (in adults) to 80% (in schistosomula s#1) were not previously annotated (Figure SF4_F1). We furthermore noticed that a significant part of these newly-described sequences were localized in intronic region of genes. This was true for each stage, not only for female, but also for male-biased newly-described transcripts. Mobile genetic elements were particularly interesting in this context because many of them were localized in intronic part of annotated genes. Besides, their biased expression may be maintained in several stages of the developmental process which was barely meet for other differentially expressed candidates. We also noticed another interesting structural feature among the female-biased genes: in cercariae, four female-biased genes were located in a 30.9 kb region of the Z-specific region of the sex-chromosome (from Schisto_mansoni.Chr_W:5.303.528 to 5.334.428) and all of them are "calcium binding proteins". This structural pattern was also observed for seven female-specific genes in adults, that were located in a 29.5kb region of an unplaced scaffold (from Schisto_mansoni.SC_0225: 125679 to 152847). In this second female-expressed cluster, we detected "*MEG-2*" (Smp_159800) that we previously described as an important player of host-pathogen interaction.

In a functional point of view, we further focused our attention on biased transcripts linked to the parasite development and/or reproduction. Concerning the female-biased hits detected as transcripts of particular interest in the global study, we spotted here among the 100 best-hits: the "Nose resistant to fluoxetine protein 6" (Smp_124340, female-bias in cercariae), the two homeogenes "Prospero-like homeobox domain containing protein" (Smp_045470, female-bias in cercariae) and "Homeobox domain containing protein" (Smp_161270/161280, female-bias in cercariae), the "putative insulin-like growth factor" (N.A. XLOC_020824, female-bias in adult). In the newly studied stages, we detected the female-bias in schistosomula s#3 of the "Single-minded protein 2" (Smp_178780, Z specific, female-bias in s#2 and adults detected in the previous part), the "Delta-like protein 1" of the Notch pathway (Smp_141250, female-bias in s#2 detected in the

previous part). Besides, we newly detected one female-biased developmental gene in this part of the study: the reproduction-linked gene "Trematode eggshell synthesis protein" (Smp_191910). Concerning the male-associated hits detected as transcripts of particular interest in the global study, we spotted here among the 100 best-hits: the "Noggin like protein" of the BMP pathway (Smp_099440, male-bias in cercariae), the "splicing factor U2AF" (Smp_019690, male-bias in s#2), the "polycomb protein EED" (Smp_165220, Z specific, male-bias in s#2), a "Steroid dehydrogenase" (Smp_131430, male-bias in adults) the neuropeptide (Smp_134550 or Sma-npp-27 Collins et al. 2010, male-bias in adults) and a "Gluthatione-S-transferase" (Smp_163610, male-bias in adults). In the newly studied stages, we detected also the male-bias in schistosomula s#1 of "DISCO Interacting Protein 2 Homolog" involved in neural development (N.A. XLOC_028837, male-bias in cercariae detected in the previous part), the "neurogenic locus notch homolog protein 2-like" (Smp_050520, male-bias in cercariae and adult detected in the previous part) and the "EGF receptor – tyrosine kinase" (N.A. XLOC_034575, male-bias in cercariae, s#2 and adults detected in the previous part). Besides, we newly detected two male-biased developmental genes in this part of the study: (1) in schistosomula s#1, the "Notch binding-protein" (Smp_034160) and (2) in both schistosomula s#1 and s#3, we detected male-bias of the Transcriptional enhancer factor TEF-3 known to be involved in anatomical structure development (Smp_141830, Z-specific).

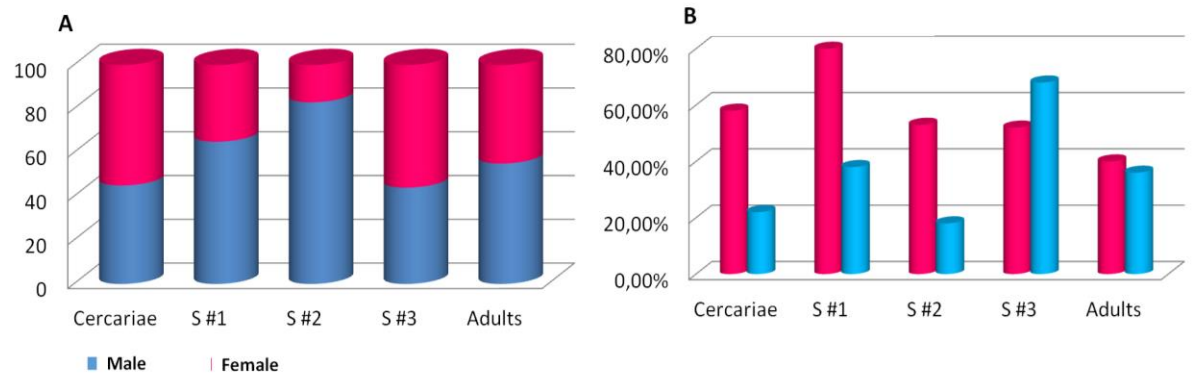
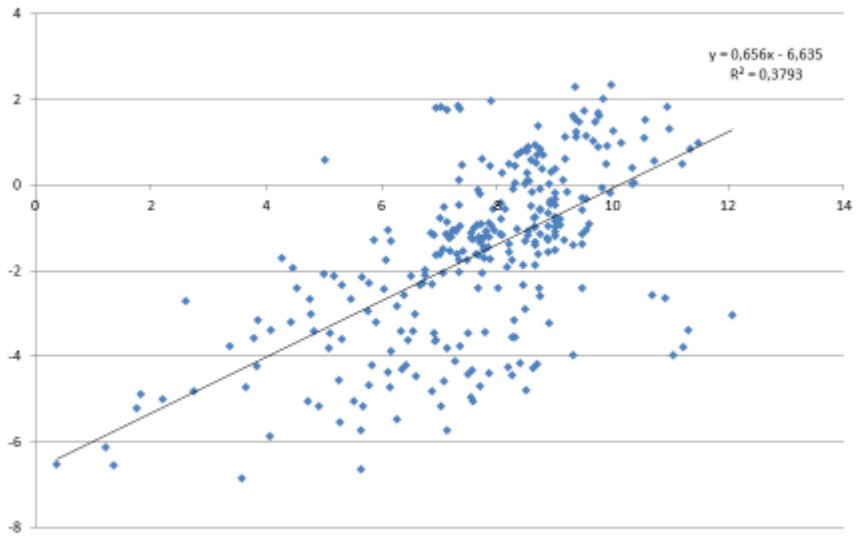


FIGURE SF4_F1. Proportion of male and female associated genes in the 100 best-hits of each stage (A). Proportion, in each sex, of newly described genes (B).

Supplementary file 5: Global statistics of qPCR experiment.

LINEAR REGRESSION OF ALL THE TESTED GENES



Regression: R^2=38% F=174.78 p<0.0001

49

GENERAL SPEARMAN RANK TEST

R=0.6218
p<0.0001

SPEARMAN RANK TEST ON THE RNAseq SIGNIFICATIVE DIFFERENCES (* DEseq)

R=0.65
p<0.0001

Supplementary file 6: Gene ontologies.

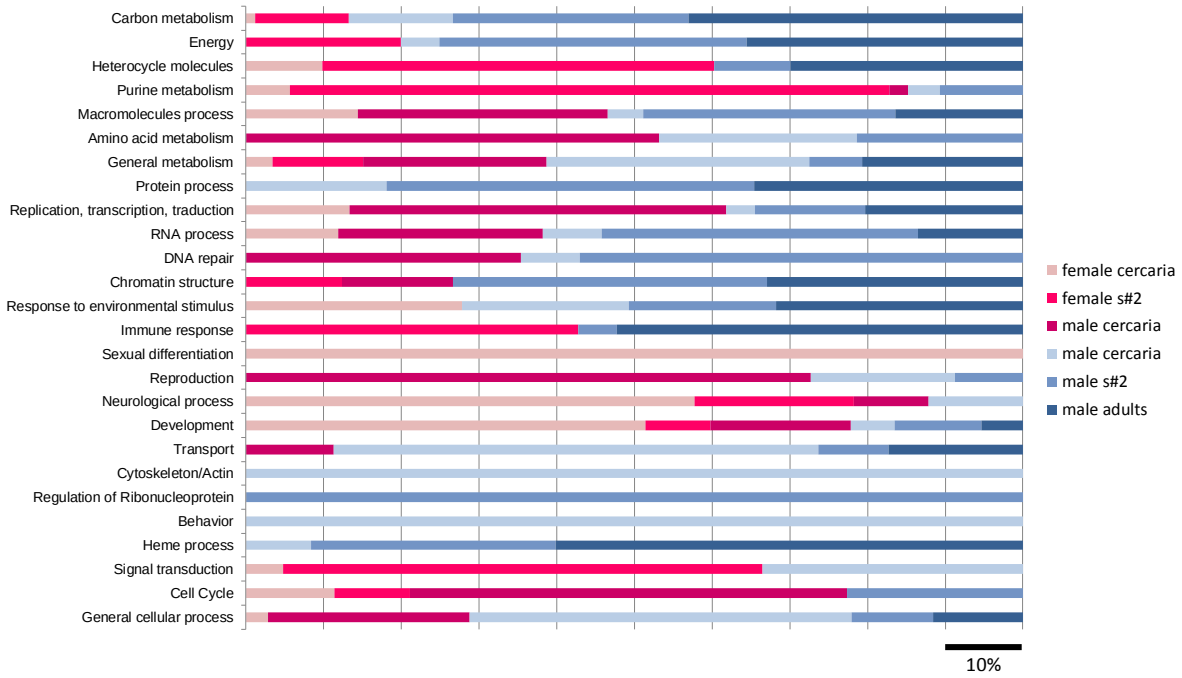
Number of enriched GO terms per category for each stage.

	female cercaria	male cercaria	female s#2	male s#2	female adults	male adults
General cellular process	4	107	0	24	12	7
Cell Cycle	3	0	1	10	5	0
Signal transduction	1	11	5	0	0	0
Heme process	0	2	0	8	0	4
Behavior	0	2	0	0	0	0
Regulation of Ribonucleoprotein	0	0	0	6	0	0
Cytoskeleton/Actin	0	10	0	0	0	0
Transport	0	26	0	4	1	2
Development	110	19	7	40	13	5
Neurological process	36	12	5	0	2	0
Reproduction	0	6	0	3	5	0
Sexual differentiation	6	0	0	0	0	0
Immune response	0	0	8	4	0	11
Response to environemental stimulus	14	17	0	16	0	7
Chromatin structure	0	0	1	14	1	3
DNA repair	0	1	0	8	1	0
RNA process	4	4	0	23	3	2
Replication, transcription, traduction	9	4	0	16	11	6
Protein process	0	17	0	47	0	9
General metabolism	3	47	4	10	7	8
Amino acid metabolism	0	9	0	8	4	0
Macromolecule process	4	2	0	15	3	2
Purine metabolism	7	8	37	22	1	0
Heterocycle molecules	3	0	6	5	0	4
Energy	0	2	2	17	0	4
Carbon metabolism	1	18	4	43	0	16
Total enriched GO term obtained for each stage	**205**	**324**	**80**	**343**	**69**	**90**

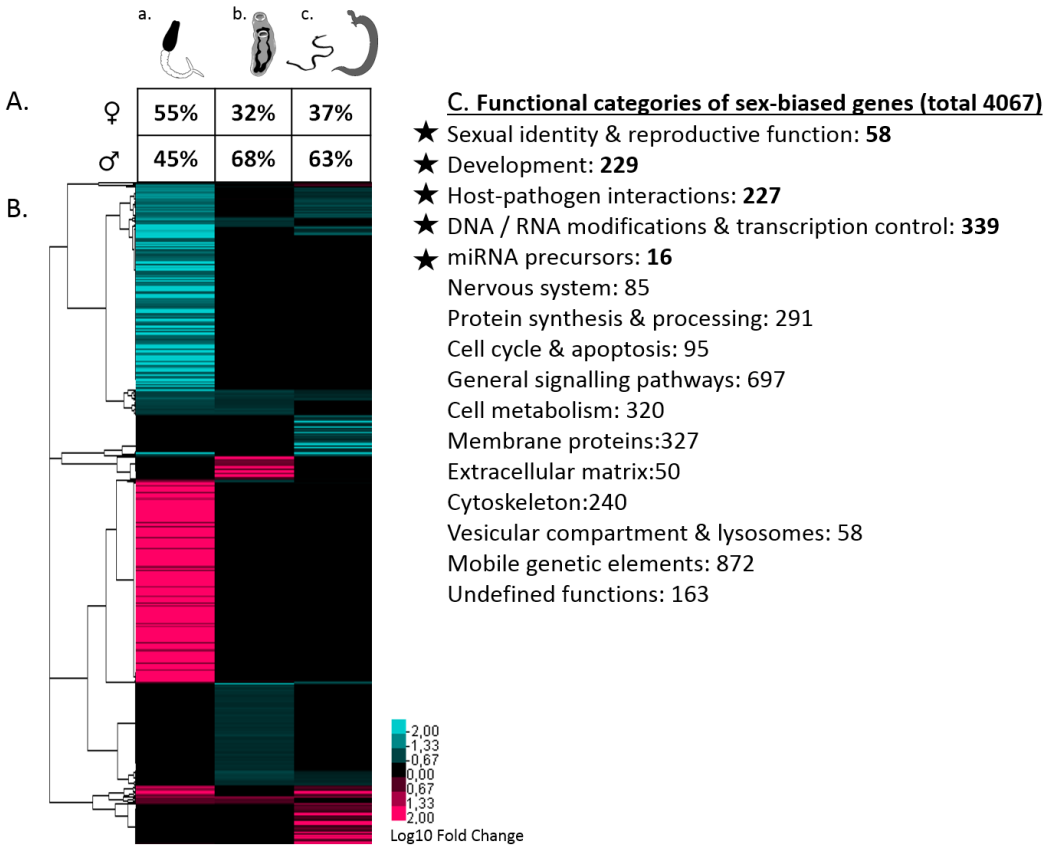
Number of enriched GO terms per category normalized with total enriched GO terms obtained for each stage and expressed in percentage.

	female cercaria	male cercaria	female s#2	male s#2	female adults	male adults
General cellular process	2,906	49,186	0,000	10,421	25,902	11,584
Cell Cycle	11,366	0,000	9,709	22,644	56,281	0,000
Signal transduction	4,814	33,505	61,680	0,000	0,000	0,000
Heme process	0,000	8,348	0,000	31,544	0,000	60,108
Behavior	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Regulation of Ribonucleoprotein	0,000	0,000	0,000	100,000	0,000	0,000
Cytoskeleton/Actin	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Transport	0,000	62,389	0,000	9,067	11,268	17,277
Development	51,431	5,621	8,387	11,178	18,059	5,325
Neurological process	57,741	12,178	20,550	0,000	9,531	0,000
Reproduction	0,000	18,569	0,000	8,770	72,661	0,000
Sexual differentiation	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Immune response	0,000	0,000	42,756	4,986	0,000	52,258
Response to environmental stimulus	27,853	21,400	0,000	19,025	0,000	31,722
Chromatin structure	0,000	0,000	12,359	40,355	14,329	32,957
DNA repair	0,000	7,546	0,000	57,022	35,432	0,000
RNA process	11,853	7,500	0,000	40,735	26,412	13,500
Replication, transcription, traduction	13,345	3,753	0,000	14,179	48,459	20,265
Protein process	0,000	18,124	0,000	47,333	0,000	34,543
General metabolism	3,410	33,799	11,650	6,793	23,637	20,711
Amino acid metabolism	0,000	25,467	0,000	21,384	53,149	0,000
Macromolecules process	14,441	4,569	0,000	32,366	32,178	16,447
Purine metabolism	5,691	4,115	77,087	10,691	2,416	0,000
Heterocycle molecules	9,844	0,000	50,452	9,806	0,000	29,898
Energy	0,000	4,931	19,971	39,593	0,000	35,504
Carbon metabolism	1,179	13,433	12,090	30,312	0,000	42,986
Total enriched GO term obtained for each stage	**205**	**334**	**81**	**343**	**69**	**90**

Graphical representation of GO terms repartition by sex and stage for each category.



Supplementary file 7: Functional analysis: an overview.



Supplementary File 7 – Sheet1. Overview of the 4065 genes functionaly annotated and sex-biased in at least one stage of development : A. Proportion of female and male-biased genes depending on the stage (a. cercariae, b. schistosomula s#2, c. adults) B. General clustering of gender-enriched genes expression C. Repartition in 16 functional categories. Stars show the 5 functional categories detailled in the present study.

Supplementary file 8: Sex determination/differentiation networks.

Gene ID	RNAseq experiment ID	Functionnal annotation	Chromosomal location	Sex of bias	Fold Change			Presence in several networks
					Cerc.	S#2	Adults	
Mago Nashi protein homolog: Smp_103470								
Smp_103470.3	XLOC_029759	mago nashi protein homolog	SC_0129	♂	N.A.	0,31	N.A.	-
Smp_125540/102240	XLOC_022467	upf3 regulator of nonsense transcripts-like protein	Z1	♂	N.A.	0,29	0,40	-
Smp_128420	XLOC_025776	protein casc3	Z3	♂	N.A.	0,23	0,42	-
Smp_034190	XLOC_007723	eukaryotic initiation factor 4a-iii-like	2	♂	N.A.	0,47	N.A.	-
Smp_164160	XLOC_019914	sjchgc02773 protein	6	♂	N.A.	0,38	N.A.	-
Smp_003660	XLOC_003470	helicase at 25e	1	♂	N.A.	0,42	N.A.	-
Non-biased putative partners: Smp_002550, Smp_091360, Smp_097660, Smp_108820, Smp_061590								
Sex comb on midleg homolog (SCMH1): Smp_006250								
Smp_006250	XLOC_025309	sex comb on midleg homolog	Z1	♂	N.A.	0,32	N.A.	-
Smp_165220	XLOC_023151	polycomb protein EED	Z3	♂	0,18	0,20	N.A.	-
Smp_068230	XLOC_023180	DNAj-like protein	Z3	♂	0,31	0,47	0,47	-
Non-biased putative partners: Smp_175040, Smp_050160, Smp_078900, Smp_149240, Smp_174220, Smp_089230, Smp_07405, Smp_164190								
Transformer-2 protein homolog (TRA-2)								
TRA-2.1: Smp_045950								
Smp_045950	XLOC_026534	TRA-2.1	PSA4	♂	N.A.	0,45	N.A.	-
Smp_036270.2	XLOC_001685	arginine serine-rich splicing factor	1	♂	N.A.	0,34	N.A.	-
Smp_113620/113200	XLOC_009795	splicing arginine serine-rich 2	2	♂	N.A.	0,38	N.A.	-
Smp_093100	XLOC_022226	splicing factor u2af 35 kda subunit isoform x2	Z1	♂	N.A.	0,49	N.A.	-
Smp_053940	XLOC_017499	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2 homolog 1	4	♂	N.A.	0,29	N.A.	-
Smp_168390	XLOC_000550	tnf receptor-associated factor 4	1	♀	18,04	N.A.	N.A.	-
Non-biased putative partners: Smp_185230, Smp_154730, Smp_013360, Smp_163870 & Smp_143190 (DMRT genes)								
TRA-2.2: Smp_050920								
Smp_174880	XLOC_025404	FOG (coiled-coil domain-containing protein 11)	Z2	♂	0,25	N.A.	N.A.	-
Smp_019690	XLOC_031937	splicing factor u2af 65 kda subunit	SC_0187	♂	0,27	0,17	N.A.	-
Smp_069870	XLOC_018039	u1 small nuclear ribonucleoprotein a	5	♂	N.A.	0,30	N.A.	-
Smp_069880	XLOC_018040	u1 small nuclear ribonucleoprotein a	5	♂	N.A.	0,46	N.A.	-
Smp_068420	XLOC_007775	small nuclear ribonucleoprotein sm d3	2	♂	N.A.	0,34	N.A.	-
Smp_024140.4	XLOC_026648	polyadenylate binding protein	PSA4	♂	N.A.	0,41	N.A.	-
Smp_127730	XLOC_021349	atp-citrate synthase	7	♀	3,01	N.A.	N.A.	-
Non-biased putative partners: Smp_157510, Smp_094130, Smp_013360, Smp_078610								
DMRT genes: DMD1: Smp_143190, DMD2: Smp_138230, DMD3: Smp_163870, DMD4: Smp_132060								
Smp_045950	XLOC_026534	TRA-2	PSA4	♂	N.A.	0,45	N.A.	Int. DMD1, 3 & 4
Smp_087070/169500	XLOC_031015	antennapedia-like homeobox protein	SC_0164	♀	26,68	N.A.	N.A.	Int. DMD1, 3 & 4
Smp_170750	XLOC_017450	paired box protein pax-6	4	♀	141,35	N.A.	N.A.	Int. Dach. DMD3 & 4
Smp_160670	XLOC_016875	paired box protein pax-6	4	♀	93,86	N.A.	N.A.	Int. Dach. DMD3 & 4
Non-biased putative partners: Smp_074590, Smp_146670, Smp_007540, Smp_045950.2, Smp_153490, Smp_074590, Smp_146790								
FEM1: Smp_175780								
Smp_000530	XLOC_029461	zinc finger transcription factor gli2	SC_0113	Switch	0,07	2,18	0,40	-
Smp_009320.2	XLOC_019814	elongation factor siii p15 subunit	6	♂	N.A.	0,42	N.A.	-
Smp_171820.2	XLOC_005389	patatin-like phospholipase domain-containing protein 7	1	♂	N.A.	N.A.	0,42	-
Smp_154960.1	XLOC_002162	cop-coated vesicle membrane protein p24	1	♂	N.A.	0,47	N.A.	-
Smp_173420	XLOC_004543	leucine-rich repeat protein 1	1	♂	0,32	0,44	N.A.	-
Non-biased putative partners: Smp_079740, Smp_147870, Smp_169940, Smp_016340, Smp_140180								
Dachshund network: Smp_196410 or Smp_180990								
Smp_196410 or Smp_180990	XLOC_000057	dachshund homolog	1	♀	86,52	N.A.	N.A.	-
Smp_170750	XLOC_017450	paired box protein pax-6	4	♀	141,35	N.A.	N.A.	Int. Dach. DMD3 & 4
Smp_160670	XLOC_016875	paired box protein pax-6	4	♀	93,86	N.A.	N.A.	Int. Dach. DMD3 & 4
Smp_173090	XLOC_025102	eyes absent homolog	Z1	♀	8,51	4,87	9,10	-
Smp_152680	XLOC_032694	epidermal growth factor receptor	SC_0225	♂	0,19	N.A.	N.A.	-
Smp_165470	XLOC_025923	epidermal growth factor receptor	Z3	♂	N.A.	N.A.	0,43	-
Smp_127240	XLOC_029617	homeobox protein six-related	SC_0125	♂	0,02	N.A.	0,32	-
Non-biased putative partners: Smp_169270, Smp_039270, Smp_009630, Smp_177400								

ANNEXE 2 – *Curriculum vitae*

Marion Picard
✉ marionpicard@hotmail.com
✆ 33 (0) 6 70 43 58 24
fr.linkedin.com/pub/marion-picard/55/a88/70a

Keywords

Sex determination and sexual differentiation, Sex-biased genes, Sex-chromosomes evolution, Dosage compensation, Chromatin mechanisms, Dioecious parasites, *Schistosoma mansoni*, Neglected tropical disease, RNA-sequencing, Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP)-sequencing.

Education

1er Dec. 2015 — **PhD defense** « Molecular bases of sex determination and sexual differentiation of a female heterogametic species ZZ/ZW: *Schistosoma mansoni*. »
Perpignan University, France.

2010 / 2011 — **Master 2nd year,** Biomedicine, Specialization in Neurobiology and Endocrinology.
Montpellier 2 University, France.
4th rank in GPA (out of 74 students), *Magna cum laude*

2009 / 2010 — **Master 1st year,** Molecular Biology and Biomedicine.
Montpellier 2 University, France / University of the Basque Country, Bilbao, Spain (Erasmus exchange programme studnt).
5th rank in GPA (out of 165 students), *Magna cum laude.*

2007 / 2009 — **Bachelor,** Animal Physiology and Neurosciences.
Montpellier 2 University, France.
4th rank in GPA (out of 70 students), *Cum laude.*

2005 / 2007 — **Medical Studies**.
Montpellier 1 University, France.

2005 — **High School Diploma,** Specialization in Physics and Chemistry, *Magna cum laude.*

Laboratory experiences

Oct. 2011 / Aug. 2015 — **PhD Student** and **Temporary research and teaching assistant,** « Molecular bases of sex determination of a female heterogametic species ZZ/ZW: *Schistosoma mansoni*. »
UMR 5244, IHPE Laboratory, Perpignan University, France.
http://ihpe.univ-perp.fr/en/
Supervisors: Jérôme Boissier and Céline Cosseau.
Ministerial financing, First laureate 2011 of Perpignan Graduate School ED305.

Oct. 2010 / June 2011 — **Internship,** « Survival of Motor Neuron (SMN) protein function in axonal localization of messenger RNAs. »
UMR 5535, Institute of Molecular Genetics of Montpellier, France.
http://www.igmm.cnrs.fr/
Supervisor: Florence Rage.

Feb. 2010 / June 2010 — **Internship,** « Analysis of Alzheimer's disease brain deposits by glucidic radical staining. »
Neurosciences Department, University of the Basque Country, Bilbao, Spain.
https://www.ehu.eus/ehusfera/lance/
Supervisor: José Vicente Lafuente Sanchez.

International collaboration

April 2014 / May 2014 **Invited visiting student** « Functional validation of the putative sex determining DMRT genes using RNA interference on *in vitro* schistosomula stage. »
Conor Caffrey research team, Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, Department of Pathology, University of California San Francisco, United States of America.
Burroughs Wellcome Schistosome Toolbox award, allocated in a personal capacity.

Laboratory expertise

Molecular biology	- Preparation of nucleic acids - Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) - Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction (PCR) - Quantitative RT-PCR
Functional biology	- RNA interference: dsRNA and siRNA on larval stage of *Schistosoma mansoni* - Immunofluorescence, *in situ* hybridization
Data processing of high throughput sequencing	*Using a local Galaxy instance:* - Quality check of rough data - Reconstruction of intron-exon structure and *de novo* transcriptome assembling (Cufflinks, Cuffmerge) - Mapping on reference genome (Tophat, Bowtie) - Quantification of reads abundance and differential genes expression (HTseq, DEseq) *Other processing:* - Genes clustering (Cluster3.O, Java treeview) - Functional annotation (Blast2go, Blastx, Conserved domains)
***In vitro* cultivation**	- Multicellular organism: larval and adult stages of *Schistosoma mansoni* - Immortal cells: NSC34 - Primary motor neurons - Specific device: Microfluidic chambers
Animal experimentation	- Complex parasite life cycle maintenance and sampling: *Schistosoma mansoni* - Dissection, tissue sampling and perfusion on *Mus musculus* model *Sept. 2013: Animal experimentation CNRS training, level one, Marseille, France*
Histology	- Tissue fixation - Paraffin wax inclusion - Microtome slicing - Tissue array - Histochemistry, immunohistochemistry
Imaging	- Confocal, fluorescence and optical microscopy - Images analyses (Metamorph, ImageJ)

Teaching/Supervising

Student internship supervising

2014 / 2015 Master student, 4 months: « Maternally and paternally imprinted genes in female and male schistosome parasites. »
2013 / 2014 Bachelor student, 1 week: « Study of chromatin modifications at different developmental stages of *Schistosoma mansoni*. »
2011 / 2012 Master student, 3 months**:** « Sex determination and differentiation in *Schistosoma mansoni*: a multiscale analysis. »

Lectures: 22h

2014 / 2015 Bachelor's degree, 21h: Cell biology.
2011 / 2012 Master's degree, 1h: « Diversity of sex determination system and sperm competition across animal kingdom. »

Practical works: 112h

2014 / 2015 Bachelor's degree, 64h: Cell biology, Immunology, Reproduction and development.
2012 / 2013 Bachelor's degree, 32h: Reproduction and development, Molecular biology techniques.
2011 / 2012 Bachelor's degree, 16h: Endocrinology.

Publications

« The roles of DMRT (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: ubiquity and diversity across the animal kingdom. »
Comptes rendus biologies, 2015.
Picard M. AL., Cosseau C., Mouahid G., Duval D., Grunau C., Toulza E., Allienne JF., Boissier J.

« The epigenome of *Schistosoma mansoni* provides insight about how cercariae poise transcription until infection.»
PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015.
Roquis D.*, Lepesant J. MJ.*, Picard M. AL.*, Freitag M., Parrinello H., Groth M., Emans R., Cosseau C. & Grunau C.
** authors contributed equally*

« Sex-specific transcriptome of *Schistosoma mansoni* through *in vivo* development: genetic and epigenetic interplay to trigger off the sexual differentiation. »
Picard M. AL. *et al.* *In preparation (Expected submission: Novembre 2015 – PlosNTD).*

« Atypical DMRT genes female-biased expression profile through the *Schistoma mansoni* lifecycle. »
Picard M. AL. *et al.* *In preparation (Expected submission: Novembre 2015).*

« Epigenetic implication for dynamic dosage compensation in *Schistosoma mansoni*. »
Picard M. AL. *et al.* *In preparation (Expected submission: January 2016).*

« Study of sex-biased gene expression and parental imprinting in hybrid adult worm of *Schistosoma mansoni*. »
Picard M. AL. *et al.* *In preparation (Expected submission: January 2016).*

Congress

July 2015 **Annual meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution**, Vienna, Austria.
TALK: « Genetic and epigenetic mechanisms to trigger off separate sex appearance. Example of intriguing dioecious parasites: *Schistosomatidae.* »
Picard M. AL., Grunau C., Allienne JF., Duval D., Boissier J., Cosseau C.*

July 2015 **Open days in Biology, Informatics & Mathematics**, Clermont-Ferrand, France.
KEY NOTE LECTURE: « Environmental and evolutionary epigenomics of non-model organisms: challenges and solutions. »
Grunau C.*, Lepesant J. MJ., Picard M. AL., Freitag M., Parrinello H., Emans R., Cosseau C. & Chaparo C.

August 2013 **XIV Congress of the European Society for Evolutionary Biology**, Lisbon, Portugal.
POSTER: « Genetic/epigenetic mechanisms to trigger off separate sex appearance. Example of intriguing dioecious parasites: *Schistosomatidae.* »
Picard M. AL.*, Rognon A., Duval D., Mouahid G., Grunau C., Cosseau C. & Boissier J.

June 2013 **Workshop Schistosomiasis**, Perpignan, France.
TALK: « The intriguing W-heterochromosome of *Schistosoma mansoni*. »
Picard M. AL.*

May 2013 **Jacques Monod Conference « Recent advances on the evolution of sex and genetic systems »**, Roscoff, Brittany, France.
POSTER : « Genetic/epigenetic mechanisms to trigger off separate sex appearance. Example of intriguing dioecious parasites: *Schistosomatidae.* »
Picard M. AL.*, Rognon A., Duval D., Mouahid G., Grunau C., Cosseau C. & Boissier J.

May 2013 **2nd Pluridisciplinary Congress of the Perpignan University PhD students**, Perpignan, France.
TALK : « A parasitic worm with a very complex sex. »
Picard M. AL.*, Duval D., Mouahid G., Arancibia N., Grunau C., Cosseau C. & Boissier J.
Silver medal for best talk.

August 2012 **34th Petit Pois Déridé Congress**, Avignon, France.
POSTER: « How do we make sex in *Schistosoma mansoni*? »
Picard M. AL.*, Cosseau C., Duval D., Grunau C., Boissier J.

June 2012 **1st Pluridisciplinary Congress of the Perpignan University PhD students**, France.
POSTER: « Sex determination and sexual differentiation in *Schistosoma mansoni*. »
Picard M. AL.*, Boissier J. *Bronze medal for best poster.*

**Speaker*

Scientific animation

Oct. 2013	**Design of educational posters** (Primary, Secondary School) « Schistosomiasis at the world scale » and « The Schistosome travel in the human body. » Perpignan Sciences Fair.
Oct. 2012 **Oct. 2011**	**Lecture and educational games (Primary, Secondary School) « How do medicines work in the body? » and « What is a parasite? Example of Schistosomes. »** **Perpignan Sciences Fair.**
Nov. 2012 & Nov. 2011	**Lecture and debate** (College) « Career paths of Scientist women. » Perpignan University Student's day and Wangary day (Women & Sciences fair).
June 2012	**Organization of Congress.** 1st Pluridisciplinary Congress of the Perpignan University PhD students, France.

Collective responsibilities

IHPE laboratory committee member.

Languages

French: Maternal.
English: Proficient.
Spanish: Fluent.

Molecular bases of sex determination and sexual differentiation of a female heterogametic species ZZ/ZW: *Schistosoma mansoni.*

Key words : Sex determination, Sexual differentiation, *In vivo* parasite development, Sex chromosome evolution, Dosage compensation, Chromatin mechanisms, ZZ/ZW female heterogametic system, *Schistosoma mansoni,* Sex-biased genes, High-throughput sequencing (RNA-seq., ChIP-seq.).

Abstract: Parasitic flatworms include more than 20,000 species that are mainly hermaphrodites. Among them, the hundred species of *Schistosomatidae* are intriguing because they are gonochoric. The acquisition of gonochorism in these species is supposed to provide genetic and functional advantages to adapt to their hosts: warm-blooded animals. Sex of schistosomes is genetically determined at the time of fertilization (*i.e.* ZW female heterogametic system). However, there is no phenotypic dimorphism through all the larval stages of its complex lifecycle: sexual dimorphism appears only in the definitive host. The molecular mechanisms triggering this late sexual differentiation remain unclear, and this is precisely the topic of our present work. We performed transcriptomic (RNA-sequencing and quantitative-PCRs) and structural (ChIP-sequencing) analyses at different stages of *Schistosoma mansoni* development. Here, we present data suggesting that the sexual differentiation relies on a combination of genetic and epigenetic factors. In a genetic point of view, we show a sex-biased expression of the *DMRT* genes (*Double-sex and Mab-3 Related Transcription Factors*) that are known to be involved in sex determination/differentiation through all the animal kingdom. In addition, we propose new potential sex-determining key genes and a pivotal role of host-pathogen interaction at the time of development. In a structural point of view, we highlight a dynamic status of dosage compensation in females and chromatin modifications in males. This intense remodeling reveals a specific transcriptomic strategy which optimizes male development and beyond that, schistosomes reproductive success.

Etude des bases moléculaires du déterminisme sexuel et de la différenciation chez une espèce hétérogamétique femelle ZZ-ZW : *Schistosoma mansoni*.

Mot-clés : Déterminisme sexuel, Différenciation sexuelle, Développement parasitaire *in vivo*, Evolution des chromosomes sexuels, Compensation de dose génique, Mécanismes chromatiniens, Système hétérogamétique femelle ZZ/ZW, *Schistosoma mansoni,* Expression différentielle de gènes, Séquençage haut-débit (RNA-seq., ChIP-seq.).

Résumé : Parmi plus de 20000 espèces de trématodes hermaphrodites, les *Schistosomatidae* ont un statut particulier car ils sont gonochoriques (*i.e.* deux sexes séparés). Le gonochorisme chez ces espèces, et leur dimorphisme sexuel, seraient en fait une stratégie d'adaptation à leur habitat : le système veineux des vertébrés à sang chaud, dont l'Homme. Malgré un mode chromosomique de déterminisme sexuel (*i.e.* hétérogamétie femelle ZW), les individus mâles et femelles demeurent phénotypiquement identiques durant tous les stades larvaires de leur cycle de vie hétéroxène. La différenciation sexuelle n'a lieu qu'après l'infestation de leur hôte définitif. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs moléculaires déclenchant cette différenciation chez *Schistosoma mansoni*. Nous avons établi le profil d'expression sexe-dépendant de gènes conservés de la cascade de détermination/différenciation chez les animaux : les *DMRT*s (*Double-sex and Male-abnormal-3 Related Transcription Factors*). Nous avons par ailleurs généré un transcriptome comparatif mâle/femelle (RNA-seq) sur cinq stades de développement *in vivo*, dont trois stades « schistosomules » inédits. Cela nous a permis d'identifier de potentiels gènes « clés » de la différenciation sexuelle et de souligner l'importance de l'interaction hôte-parasite. Enfin, par la combinaison de cette approche transcriptomique et d'une analyse épigénomique (ChIP-seq), nous avons montré une dynamique de la compensation de dose génique au cours du cycle de vie chez les femelles ainsi que la mise en place d'une stratégie transcriptionnelle particulière chez les mâles, optimisant leur développement dans l'hôte et ainsi, leur succès reproducteur.