Comparaison des traits de reproduction de deux espèces phylogéniquement soeurs du groupe des Ostéoglossomorphes : Heterotis niloticus en Afrique et Arapaima gigas en Amérique du Sud

N Zi Daniel Koua

▶ **To cite this version:**

N Zi Daniel Koua. Comparaison des traits de reproduction de deux espèces phylogéniquement soeurs du groupe des Ostéoglossomorphes : Heterotis niloticus en Afrique et Arapaima gigas en Amérique du Sud. Biologie animale. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC260 . tel-02520009v2

HAL Id: tel-02520009

https://theses.hal.science/tel-02520009v2

Submitted on 27 Mar 2020

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Comparaison des traits de reproduction de deux espèces phylogéniquement soeurs du groupe des Ostéoglossomorphes : Heterotis niloticus en Afrique et Arapaima gigas en Amérique du Sud.

Présentée et soutenue par
N Zi Daniel KOUA

Thèse soutenue publiquement le 17/12/2019 devant le jury composé de		
Mme CATHERINE BENETAU-PELISSERO	Professeur des universités, Université de Bordeaux	Rapporteur du jury
M. PATRICK KESTEMONT	Professeur, Université de Namur	Rapporteur du jury
Mme MARIE-LAURE BEGOUT	Maître de conférences HDR, IFREMER	Membre du jury
Mme VALERIE CORNET	Docteur, Université de Namur	Membre du jury
M. JÉSUS NUNEZ- RODRIGUEZ	Chargé de recherche, IRD	Membre du jury
Mme CELINE ZATYLNY - GAUDIN	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par JOEL HENRY et JEAN-FRANCOIS RENNO, Biologie des organismes et ecosystèmes aquatiques (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques
BOREA

A mon Père Dibi Koua et à ma grande sœur Edith Koua qui ont été arrachés à mon affection pendant que j'étais en France et en Bolivie dans le cadre de cette thèse.

Votre soutien et vos encouragements n'ont pas été vains.

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) dans l'unité de recherche Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (FRE BOREA, MNHN, CNRS 7208, Sorbonne Université, IRD 207, UCN, UA) à l'Université de Caen Normandie.

Cette thèse a été financée sur le fond du projet C2D de rénovation pédagogique et institutionnelle de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT BOIGNY (INP-HB) de Yamoussoukro avec Montpellier SupAgro comme établissement coordonnateur. Un appui financier de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à travers le Laboratoire Mixte International, Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI EDIA) a été également obtenu. La Universidad Autónoma Gabriel René Moreno (UAGRM) de Santa Cruz (Bolivie) a mis à notre disposition le laboratoire PROVETSUR de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) pour la réalisation d'une partie des analyses génétiques.

Avant-propos

Je tiens à remercier les trois "J" comme j'ai eu l'occasion de les appeler aux Journées Scientifiques BOREA de juillet 2016. J'ai nommé Joël Henry, Professeur à l'Université de Caen, Jean-François Renno, Directeur de recherche à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Jésus Núñez, Chargé de recherche à l'IRD, tous les 3 membres du Laboratoire Mixte Internationale, Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonnienne (LMI EDIA). J'ai bénéficié de votre confiance pour réaliser cette thèse dans de meilleures conditions d'encadrement scientifiques, d'échanges et de partage mutuel. Pendant mes séjours en France et en Bolivie, votre soutien a été au delà du simple cadre académique. Les conditions souvent difficiles dans lesquelles vous avez effectué des missions d'encadrement en Côte d'Ivoire ne vous ont pas freiné dans l'atteinte des objectifs fixés. Je salue votre amitié durant toutes ces années passées ensemble.

Je remercie le Professeur Catherine Benetau-Pelissero et le Professeur Patrick Kestemont d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie également le Docteur Céline Zatylny-Gaudin, Maître de Conférences à l'Université de Caen Normandie et actuelle Directrice du site Caennais de BOREA, le Docteur Marie-Laure Begout et le Docteur Valérie Cornet d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse mes remerciements au Docteur N'Guessan Koffi, Directeur Général de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët Boigny (INP-HB) de Yamoussoukro, au Docteur Siaka Koné, Directeur de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'INP-HB et au Colonel Bob Kouadio, Directeur de Département Eaux, Forêts et Environnement (FOREN) de l'INP-HB qui ont tout mis en œuvre pour me permettre d'obtenir la bourse de thèse, aménagé mon temps de travail d'enseignant-chercheur dans ledit institut pour réaliser cette thèse sans contrainte. Sans vous, je n'aurais pas eu les autorisations de sortir du territoire ivoirien pour me rendre en France et en Bolivie.

Je me dois de remercier les équipes de Montpelier SupAgro et de l'ESA de Yamoussoukro qui ont asuré la gestion des fonds destinés à ma thèse dans le cadre du projet de Renovation pédagogique et institutionnelle de l'ESA. J'adresse une mention spéciale à Christine Moretti qui a œuvré d'arrache-pied pour trouver les solutions face aux difficultés sans cesse rencontrées. Je n'oublie pas non plus Djinan, Sinan, Corinne Pickett et Gisèle André qui ont été toujours disponibles et prompts à répondre à mes sollicitations. Grace à vous, mes

déplacements en Bolivie et en France ont été fluides et ma prise en charge financière a été assurée régulièrement.

Je remercie l'IRD et ses représentations de Bondy (France) et de la Paz (Bolivie) pour l'appui financier complémentaire à la bourse de thèse. Grand merci à Sébastien pour sa compréhension et la relance d'achat des billets d'avion lorsque l'obtention de mon visa a été retardée.

Je tiens à remercier le Professeur Pascal Sourdaine pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Caennais de BOREA lorsque je démarrais ma thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Fabrice Duponchelle, Chargé de recherche à l'IRD, pour m'avoir accueilli au sein des équipes 2 puis 7 puis D mais finalement C de l'UMR BOREA.

Je veux aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire BOREA, professeurs, maîtres de conférences ainsi que le personnel technique et administratif pour ces années passées parmi vous. Je remercie très sincèrement Marie-Pierre qui malgré ses nombreuses sollicitations, n'a pas hésité une seconde à me prêter main forte pour réaliser des PCR. Merci également à Christophe Roger pour ses chaleureuses poignées de main lorsqu'on se rencontre dans les couloirs du labo et à Catherine pour les démarches entreprises pour l'obtention de mon logement au Crous lors de mes séjours en France.

Je remercie Thomas Knigge, Jean-Yves Toullec, Céline Ollivaux et Antoine Drieu qui ont accepté d'être membres de mon Comité de Suivi Individuel (CSI). Vos encouragements et vos conseils avisés m'ont été d'une grande utilité.

J'adresse également des remerciements aux doctorants, particulièrement à mon ami Alex. Tu te souviens de ma valise que tu trainais en courant avec moi pour ne pas que je manque mon bus lorsque je me rendais à Paris avant de prendre mon vol pour la Côte d'Ivoire ! Julie et Floriane je ne vous oublie pas, c'est grâce à vous qu'on était au bon moment au RU pour le déjeuner.

Je remercie Benoît Bernay et Julien Pontin de la plateforme PROTEOGEN de l'Université de Caen pour les longues heures passées sur mes échantillons. Le projet "Hormonotis", comme vous avez baptisé la partie protéomique de ma thèse, n'est pas prêt de finir ; il y a encore beaucoup de choses à découvrir sur le « bonytongue » africain.

Je remercie également tous mes collègues du département FOREN de l'INP-HB pour leurs encouragements et leur soutien, en particulier, je remercie le Docteur/Colonel Danhoué Goué pour avoir assuré mes modules d'enseignement lorsque j'étais absent de Côte d'Ivoire. J'ai pu me consacrer presqu'à 100% à mes travaux de thèse grâce à vous.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les pisciculteurs, pêcheurs et acteurs du domaine piscicole qui m'ont permis de collecter les échantillons de *H. niloticus* nécessaires à la réalisation de cette thèse. Ce sont Affif et Jacques de Yamoussoukro, Drissa, Sinan, Mamadou et Kouassi de Sinfra, Ballo de Yopohué, Soro de l'association des pisciculteurs de Gnanagonfla, Maurice de Grégbeu, Mahan de Man, Millan d'Aboisso, Boko et Kamagaté d'Abengourou, Théodore et Djeneba de l'Association des pisciculteurs de Côte d'Ivoire, Soro Drissa, Roger, Raoul de l'APDRA-CI de Daloa, Moser du service de pêche de Guessabo, Marc Oswald de l'APDRA de France ainsi que le personnel des équipes projet de Côte d'Ivoire (Timothée), de la Guinée (Mansa, Augustin et Jean-Philippe) et du Cameroun (Guillaume, Thomas et David).

A tout le personnel du laboratoire PROVETSUR de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno de Santa Cruz (Bolivie), j'exprime ma profonde gratitude pour l'accueil qui m'a été réservé durant mes différents séjours. Muchas gracias por todo Ariel ! Ton ouverture et tes conseils m'ont permis d'aborder sereinement l'aspect génétique de ma thèse. Merci également à Ericka qui aménageait son temps pour rendre disponibles les locaux et équipements nécessaires à la réalisation des tests ELISA.

Je ne manque pas de remercier Gladys Carolina Herbes (sous contrat IRD) pour le temps passé à m'aider à obtenir les amplificas de séquences, à nettoyer et à aligner les séquences et à les analyser. Carolina, je te tire mon chapeau car tu as été la seule à accepter d'aller jusqu'au bout.

Je veux aussi remercier tous les étudiants qui m'ont aidé sur la partie génétique de ma thèse. Il s'agit de Grégoire pour la collecte d'échantillons en Côte d'Ivoire, Claudia, Laura et Luz pour les extractions d'ADN au laboratoire PROVETSUR.

Je remercie vivement mes deux Mamans, Suzanne et Rose ainsi que tous mes frères et sœurs biologiques qui ont cru en moi et n'ont cessé de me soutenir. Le docteur que la famille attendait est finalement là, ouf !

Merci également à tous les frères et sœurs de l'Eglise du Christ de Yamoussoukro et de Santa Cruz pour vos prières. J'ai livré le bon combat, désormais la couronne de docteur m'appartient.

Je remercie tous mes amis qui m’ont souvent appelé quel que soit le pays où je me trouvais pour m’exprimer leur attachement.

Enfin, la palme d’or revient à ma charmante épouse Sophie que j’appelle affectueusement "Mon BB" et à mes enfants Evane et Catalya. Mon BB, tu as supporté tous ces moments de longue absence et tu n’as cessé de m’encourager et de me dire de tenir bon. Je serai désormais plus souvent à tes côtés en attendant de nouveaux challenges.

Table des matières

Table des figures 13
Table des tableaux 16
Table des annexes 17
Abréviations 18

Première partie : Introduction générale 21
1. Contexte et problématique 23
1.1 Proximité phylogénétique de l'*Heterotis* et de l'*Arapaima* : intérêt pour comprendre l'évolution des téléostéens et la biologie de la reproduction 23
1.2 *Heterotis* et *Arapaima*, des poissons d'un grand intérêt pour la pêche et l'aquaculture 26
1.2.1 Pêche et aquaculture de *H. niloticus* 26
1.2.2 Pêche et aquaculture de *A. gigas* 27
1.3 Défis liés à la reproduction et à la génétique des populations d'*Heterotis* et *Arapaima* 30
2. Descriptions des deux modèles d'étude : *Arapaima gigas* et *Heterotis niloticus* 33
2.1 Systématique et morphologie 33
2.2 Particularités anatomiques des *Arapaimidae* 38
2.2.1 Le système nerveux 38
2.2.2 Gonades 38
2.2.3 Organe suprabranchial ou épibranchie 40
2.2.4 Vessie gazeuse 41
2.3 Régime alimentaire 41
2.3.1 *H. niloticus*, un poisson benthophage et microphage 41
2.3.2 *A. gigas*, un poisson carnivore 42
3. Les populations de *A. gigas* et de *H. niloticus* 44
3.1 Habitat 44
3.2 Zones de distribution des *Arapaimidae* 45
3.2.1 Les populations de *A. gigas* 45
3.2.2 Les populations de *H. niloticus* 48

3.3. Génétique des populations de *A. gigas* et *H. niloticus* 53
3.3.1 Génétique des populations et reproduction des espèces 53
3.3.2 Les différents types de marqueurs pour l'étude de la génétique des populations ... 53
3.3.3 Structure génétique et conservation des populations de *H. niloticus* et de *A. gigas* 59
4 L'organisation séquentielle et les principales étapes du cycle de reproduction des *Arapaimidae* 61
4.1 Maturité sexuelle 61
4.1.1 Stades de maturation des gonades 61
4.1.2 Taille et âge des poissons à la première maturité sexuelle 65
4.2 Période de reproduction et formation des couples 66
4.3 Construction ou réaménagement de nid 68
4.4 Ponte et fécondation des œufs 70
4.5 Soins parentaux et différents stades de développement du poisson 72
5. La régulation neuroendocrinienne de la reproduction chez les poissons téleostéens : hormones, gamétogenèse et comportement reproducteur 74
5.1 Le Rôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique 74
5.2 Les hormones stéroïdiennes 75
5.2.1 Synthèse et rôle des hormones stéroïdiennes dans la fonction de reproduction 75
5.2.2 Les récepteurs œstrogéniques 76
5.3 La vitellogénine 80
5.3.1 Rôle et distribution tissulaire de la vitellogénine chez les téléostéens 80
5.3.2 Domaines et variantes de la vitellogénine 82
5.3.3 Les familles de récepteurs à la vitellogénine 85
5.4 La choriogénine 89
6. Objectifs de la thèse 92

Deuxième partie : Matériel et méthodes 95
1. Etude de la variabilité génétique des popula-tions de *H. niloticus* 97
1.1 Les échantillons de *H. niloticus* utilisés 97
1.2 Extraction, amplification et séquençage d'ADN 99
1.2.1 Extraction de l'ADN génomique 99
1.2.2 Choix des marqueurs moléculaires et PCR 100
1.2.3 Séquençage 102

1.3 Analyse des données 104
1.3.1 Alignement des séquences 104
1.3.2 Biogéographie des haplotypes 104
1.3.3 Diversité nucléotidique et haplotypique 104
1.3.4 Relation phylogéographique entre les haplotypes 105
1.3.5 Analyse de variance moléculaire (AMOVA) 105
2. Approches transcriptomiques et protéomiques 106
2.1 Echantillonnage et prélèvements tissulaires 106
2.2 Approches transcriptomiques 107
2.2.1 Extraction des ARN 107
2.2.2 Séquençage et traitement bioinformatique 107
2.3 Approches protéomiques ciblée sur la recherche de Vtg 109
2.3.1 Préparation d'échantillons pour analyse par spectrométrie de masse 109
2.3.2 NanoLC – MS/MS 109
2.3.3 Séquençage des peptides et identification des protéines 110
2.4 Approches fonctionnelles 110
3. Sexage des individus mâtures de *H. niloticus* et étude du comportement reproducteur de *A. gigas* 112
3.1 Sexage des individus matures de *H. niloticus* 112
3.1.1 Test du kit de sexage de *A. gigas* 112
3.1.2 Test de l'anti corps anti Vtg de *A. gigas* et *O. bicirrhosum* 114
3.1.3 Mise au point d'un anticorps anti-Vtg spécifique de *H. niloticus* 115
3.1.4 Détection de la Vtg par MS/MS et sexage des individus matures 116
3.2 Suivi télémétrique pour l'étude du comportement reproducteur 117
3.2.1 Site expérimentale et poissons utilisés 117
3.2.2 Système de suivi des *Arapaima* 118
3.2.3 Pose des émetteurs ultrasoniques sur les poissons 118
3.2.4 Disposition des hydrophones dans l'étang expérimental 118

Troisième partie : Première approche de la caractérisation de la ressource génétique d'*Heterotis* en Côte d'Ivoire, par comparaison du polymorphisme haplotypique de l'ADNmt (Cytb et NADH) selon l'origine géographique des échantillons sauvages (capturés dans la nature) ou cultivés (élevés en pisciculture) 121

1. Introduction 123

2 Démarche expérimentale 125

3. Caractérisation de la ressource génétique en Côte d'Ivoire 127

3.1 Variation de séquences des gènes mitochondriaux de *H. niloticus* 127

3.1.1 Matrice concaténée des marqueurs mitochondriaux 127

3.1.2 Gène Cyt b 129

3.1.3 Segment NADH1 130

3.2 Phylogéographie des haplotypes 132

3.3 Origine géographique des bonytongues de Côte d'Ivoire 134

3.4 Comparaison de distribution géographique des haplotypes entre populations sauvages et stock d'élevage de la Côte d'Ivoire et du Cameroun 136

3.5 Comparaison de distribution des haplotypes entre populations sauvages selon les bassins versants de Côte d'Ivoire 138

3.6 Comparaison de distribution des haplotypes entre stocks d'élevage selon les piscicultures de Côte d'Ivoire 141

3.7 Lien entre piscicultures et populations sauvages d'un même bassin versant 144

3.8 Discussion et conclusion 146

Quatrième partie : La vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas* : Identification et caractérisation structurale des acteurs moléculaires 151

La vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas* : Identification et caractérisation structurale des acteurs moléculaires 151

1. Introduction 153

2. Démarche expérimentale 155

2.1 Approche transcriptomique 156

2.2 Approche protéomique 156

3. Les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *Heterotis niloticus* 157

Article 1 : Identification et caractérisation des acteurs mpliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez l'Osteoglossiforme africain d'intérêt aquacole, *Heterotis niloticus (Cuvier, 1829)* 158

4 Proximité phylogénétique de *A. gigas* et *H. niloticus* basée sur les aspects moléculaires de la vitellogenèse et sa régulation 218
4.1 Les séquences utilisées 218
4.2 Identification des acteurs moléculaires chez *A. gigas et* comparaison avec *H. niloticus* 219
4.2.1 Les vitellogénines et leur récepteur 219
4.2.2 Récepteurs du 17β-estradiol 219
4.2.3 La Prolactine et son récepteur 223
4.2.4 Les Gonadotropines et leurs récepteurs 225
4.3 Phylogénie des acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas* 226
4.3.1 Sous unité commune α de la LH et la FSH (GPα) 227
4.3.2 Sous unité β de la LH 228
4.3.3 Sous unité β de la FSH 229
4.3.4 Récepteur de la FSH 230
4.3.5 Récepteur de la LH 231
4.3.6 Prolactine 232
4.3.7 Récepteur de la PRL 233
4.3.8 Récepteur du 17ß-estradiol 234
4.3.9 Vitellogénine 235
4.3.10 Récepteur de la Vtg 236
4.4 Discussion 237
5. Conclusion 239

Cinquième partie : Sexage des individus matures de *H. niloticus* et suivi télémétrique du comportement reproducteur de *A. gigas* 241

1. Introduction 243
2. Démarche expérimentale 244
3. Utilisation d'un réseau de télémétrie acoustique pour suivre le comportement reproducteur de *A. gigas* en captivité 246
Article 2 : Use of an acoustic telemetry array for fine scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas*, breeders 249

4. Sexage de reproducteurs de *H. niloticus* pour suivre leur comportement reproducteur en étang de pisciculture 258
4.1 Résultats avec le test du kit de sexage de *A. gigas* 258
4.2 Résultats avec l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* et de *O. bicirrhosum* 259
4.3 Résultats avec l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* 260
4.3.1 Purification de la Vtg et production d'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* 260
4.3.2 Test de l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* 261
4.4 Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse 262
4.5 Discussion 265
5. Conclusion 268

Sixième partie : Conclusion générale et perspectives 269

1. *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, un poisson d'origine « camerounaise » à faible variabilité génétique ? 272
2. Caractérisation et identification des acteurs moléculaires de la vitellogenèse, une étape pour comprendre la physiologie de la reproduction des *Arapaimidae* 273
3. Trois méthodes pour sexer *H. niloticus,* un poisson dépourvu de dimorphisme sexuel 276
4. Comprendre le comportement reproducteur des *Arapaimidae* en étang de pisciculture, c'est désormais possible 278

Septième partie : Références bibliographiques 279

Annexes 323

Table des figures

Figure 1 : Fragmentation et divergence de certaines espèces d'Osteoglossomorphes. 24
Figure 2 : Arbre phylogénétique montrant la divergence entre *Heterotis - Arapaima*.....25
Figure 3 : Capture de la pêche et production aquacole de *A. gigas*. 29
Figure 4 : Principaux pays ayant importé *A. gigas* vivant. 30
Figure 5 : Coloration de *A. gigas* mâle et femelle mâtures durant la période reproduction. ...31
Figure 6 : *Heterotis niloticus* adulte.....33
Figure 7 : *Arapaima gigas* adulte.....33
Figure 8 : Position systématique de *A. gigas* et de *H. niloticus*.....34
Figure 9 : Variation de forme de la cavité préoperculaire d'*Arapaima sp* 35
Figure 10 : Squelette de la tête d'*Heterotis niloticus* et d'*Arapaima giga*s.....37
Figure 11 : Morphologie du cerveau de *H niloticus* 38
Figure 12 : Position des gonades chez les *Arapaimidae*.....39
Figure 13 : Position schématique de l'organe suprabranchial de *H. niloticus*.....40
Figure 14 : Distribution géographique des populations natives et introduites de *A. gigas*.....47
Figure 15 : Distribution géographique de *H. niloticus*. 49
Figure 16 : Bassins versants des cours d'eau principaux de la Côte d'Ivoire.....51
Figure 17 : Carte du génome mitochondrial de *A. gigas* 56
Figure 18 : Evolution de la maturation des ovaires et ovocytes des *Arapaimidae* 63
Figure 19 : Schéma d'une coupe testiculaire de poisson et stades de maturation de testicule de *A. gigas*. 64
Figure 20 : Œufs observés dans la bouche d'une femelle de *H. niloticus*. 68
Figure 21 : Nid de *H. niloticus* dans un étang piscicole 69
Figure 22 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique 74
Figure 23 : Niveau d'expression des ERs chez les femelles de *Micropterus salmoides* e. 77
Figure 24 : Structure des récepteurs d'estrogène. 78
Figure 25 : Séquences du noyau des DBD des récepteurs œstrogéniques alpha, beta et gamma de *Micropterus salmoides*. 79
Figure 26 : Régulation de la vitellogenèse et de la choriogenèse chez les Salmonidae 81

Figure 27 : Représentation de la structure des VtgA, VtgB et VtgC. 83
Figure 28 : Nomenclature de la Vtg chez divers espèces de téléostéens 85
Figure 29 : Arbre phylogénétique présentant les récepteurs de la superfamille des LDLR 86
Figure 30 : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de vitellogénine. 87
Figure 31 : LRP1, LRP1B et LRP2 re-annotés LRP13 89
Figure 32 : Schématisation du chorion ovarien de A*cipenser transmontanus*. 90
Figure 33 : Structure de la choriogénine H de certains téléostéens 91
Figure 34 : Etat des lieux des études de génétique des populations de *H. niloticus* et objectif de la thèse 993
Figure 35 : Sites de collecte d'échantillons de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun 98
Figure 36 : Membrane mini Array du kit de sexage de *A. gigas* 113
Figure 37 : Membrane Mini Array montrant la détection de la Vtg 113
Figure 38 : *A. gigas* équipé d'un émetteur ultrasonique. 119
Figure 39 : Echantillonnage et analyse de génétique de populations de *H. niloticus*. 126
Figure 40 : Arbre phylogénétique des haplotypes du gène Cyt b de *H. niloticus*..... 133
Figure 41 : Carte de distribution des haplotypes des gènes Cyt b de *H. niloticus* et réseau d'haplotypes. 135
Figure 42 : Approche mise en œuvre pour caractériser les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas* 155
Figure 43 : Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques de *A. gigas*..... 220
Figure 44 : Alignement des séquences protéiques déduites des deux récepteurs œstrogéniques béta de *A. gigas* et comparaison d avec *H. niloticus*..... 221
Figure 45 : Structure en hélice α des LBD des récepteurs œstrogéniques beta de *A. gigas*. . 222
Figure 46 : Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (de la prolactine de *A. gigas,* structure tertiaire et alignement avec *H. niloticus*..... 223
Figure 47 : Séquence nucléotidique partielle et séquence protéique déduite du récepteur à la prolactine de *A. gigas* et alignement *H. niloticus* 224
Figure 48 : Alignement des séquences protéiques déduites des GPα, LHβ et FSHβ de *H. niloticus* et *A. gigas*..... 225
Figure 49 : Comparaison des structures secondaires de la PRL, GPα, FSHβ, LHβ et des ERβ de *H. niloticus* et *A. gigas* 226
Figure 50 : Arbre phylogénétique des GPα 227
Figure 51 : Arbre phylogénétique des LHβ 228

Figure 52 : Arbre phylogénétique des FSHβ 229
Figure 53 : Arbre phylogénétique des FSHR.....230
Figure 54 : Arbre phylogénétique des LHR.....231
Figure 55 : Arbre phylogénétique des PRL 232
Figure 56 : Arbre phylogénétique des PRLR.....233
Figure 57 : Arbre phylogénétique des ERβ et ERγ.....234
Figure 58 : Arbre phylogénétique des Vtg.....235
Figure 59 : Arbre phylogénétique des VtgR ou VLDLR.....236
Figure 60 : Démarche suivie pour mettre au point une méthode de sexage de *H. niloticus* et réaliser une étude des interactions mâle-femelle de *A. gigas* par télémétrie ultrasonique. ...245
Figure 61 : Méthodologie de télémétrie Lotek utilisée pour étudier le comportement reproducteur de *A. gigas*. 248
Figure 62 : Test du kit de sexage de *A. gigas* 258
Figure 63 : Révélation de la série de dilution de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg1 de *A. gigas* 259
Figure 64 : Révélation de la série de dilutions de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum*.....260
Figure 65 : SDS-PAGE de plasma de *H. niloticus* d'individus avant induction et induits au 17β-estradiol 261
Figure 66 : Révélation de la série de dilution de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*.....262
Figure 67 : Niveau de détection de la Vtg ou ses produits de clivages par spectrométrie de masse dans le mucusd'individus mâles et femelles de *H. niloticus* en vitellogenèse.....263
Figure 68 : Détermination du sexe par analyse en spectrométrie de masse de deux lots de reproducteurs de *H. niloticus.* 264
Figure 69 : Etudes réalisées au cours de cette thèse qui contribuent à la domestication de *H. niloticus* et *A. gigas.*.....271

Table des tableaux

Tableau 1 : Noms attribués à *Heterotis niloticus* dans plusieurs pays d'Afrique 36

Tableau 2 : Quelques introductions de *H. niloticus* dans les pays africains 50

Tableau 3 : Quelques caractéristiques de l'ADN mitochondrial 55

Tableau 4 : Organisation des gènes du génome mitochondrial de *A. gigas* 56

Tableau 5 : Stades de maturation et caractéristiques morphologiques des ovaires des *Arapaimidae* 62

Tableau 6 : Stades de maturation et caractéristiques du testicule des *Arapaimidae* 65

Tableau 7 : Taille minimale de première maturité sexuelle des *Arapaimidae* suivant la longueur standard , l'âge ou le poids 66

Tableau 8 : Période de reproduction de *H. niloticus* dans différentes régions de l'Afrique 67

Tableau 9 : Taille et fécondité chez *H. niloticus* 71

Tableau 10 : Masses moléculaires de divers types de vitellogénine chez les téléostéens 84

Tableau 11 : Amorces utilisées pour la PCR du gène Cyt b et du segment NADH1 de *H. niloticus* 102

Tableau 12 : Provenance et nombre d'échantillons collectés et séquencés pour les gènes Cyt b et NADH1 de *H. niloticus* 103

Tableau 13 : Organes prélevés sur les individus mâles et femelles pour le transcriptome et le protéome 106

Tableau 14 : Solutions stocks utilisés pour les tests ELISA 114

Tableau 15 : Fréquences absolues des haplotypes concaténés de l'ADNmt de *H. niloticus* . 127

Tableau 16 : Indice de diversité génétique du gène concaténé de l'ADNmt de *H. niloticus* 128

Tableau 17 : Fréquences absolues des haplotypes du Cyt b de *H. niloticus* 129

Tableau 18 : Indice de diversité génétique du Cyt b de *H. niloticus* 130

Tableau 19 : Fréquences absolues des haplotypes du segment NADH1 de *H. niloticus* 131

Tableau 20 : Indice de diversité génétique du segment NADH1 dt de *H. niloticus* 132

Tableau 21 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 de populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) de *H. niloticus* de Côte d'Ivoire et du Cameroun 136

Tableau 22 : Test exact de Fisher entre PS et SE de *H. niloticus* de Côte d'Ivoire et du Cameroun. 137

Tableau 23 : Analyse moléculaire de variance (AMOVA) des PS et SE de *H. niloticus* de Côte d'Ivoire et du Cameroun 138

Tableau 24 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 de PS de *H. niloticus* de quatre bassins versants (BV) de Côte d'Ivoire . 139

Tableau 25 : Test exact de Fisher entre PS de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire. . 139

Tableau 26 : AMOVA des PS de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire.....140

Tableau 27 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 des SE de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire.....141

Tableau 28 : Test exact de Fisher entre SE de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire..142

Tableau 29 : AMOVA des SE de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire. 143

Tableau 30 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 des PS et SE de *H. niloticus* de quatre BV de Côte d'Ivoire 144

Tableau 31 : Test exact de Fisher entre PS et SE de *H. niloticus* d'un même BV de Côte d'Ivoire.....144

Tableau 32 : AMOVA des PS et SE de *H. niloticus* dans un même BV de Côte d'Ivoire....145

Tableau 33 : Acteurs moléculaires de la vitellogenèse et sa régulation identifiés chez *H. niloticus* et *A. gigas*.....274

Table des annexes

Annexe 1 : Amorces microsatellites développées pour *H. niloticus* 325

Annexe 2 : Panels microsatellites définis pour *H. niloticus* 326

Annexe 3 : Amorces mitochondriales développées pour *A. gigas*.....327

Annexe 4 : Alignement des séquences nucléotidiques des haplotypes de la matrice concaténée des gènes mitochondriaux de *H. niloticus* 328

Annexe 5 : Alignement des séquences nucléotidiques des haplotypes d'un fragment du gène Cyt b de *H. niloticus*. 329

Annexe 6 : Alignement des séquences nucléotidiques des haplotypes du segment NADH1 de *H. niloticus.*.....330

Annexe 7 : Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des ERRs de *H. niloticus.*..... 332

Abréviations

ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

AF-1 : Première fonction d'activation

AF-2 : Deuxième fonction d'activation

AMOVA : Analyse Moléculaire de la Variance

ARNm : Acide ribonucléique messager

BV : Bassin Versant

CITES : Convention International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora

CT : Extrémité C-terminale

CTAB : Bromure de Cétrimonium

CTE : Extension COOH-terminale

Cyt b : Cytochrome b

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DTT : Dithiothréitol

E2 : 17β-estradiol

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGF : Facteur de croissance épidermique

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ER : Récepteur oestrogénique

ERR : Récepteur apparenté aux récepteurs oestrogéniques

FCFA : Franc de la Communauté Financière d'Afrique

FPKM : Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped

FSH : Hormone folliculo-stimulante

FSHR : Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante

Fst : Index de fixation

IGS : Indice Gonado-somatique

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

JTT : Modèle Jones-Taylor-Thornton

kDa : kilo Dalton

LBD : Domaine de liaison au ligand

LBR : Répétitions se liant au ligand

LDLR : Récepteur de lipoprotéines de basse densité

LH : Hormone lutéinisante

LHR : Récepteur de l'hormone lutéinisante

LMI EDIA : Laboratoire Mixte International Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne

LR8+ : VLDLR avec 8 LBR et le domaine O-glycosylation

LR8- : VLDLR avec 8 LBR et dépourvu du domaine O-glycosylation

LRP : Protéine liée au LDLR

LS : Longueur Standard

LT : Longueur Totale

Lv : Lipovitelline

MS/MS : Spectrométrie de masse

NADH1 : Nicotinamide Adénine dinucléotide sous unité 1

NPS : Sérum de porc

Pb : Paires de bases

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction de polymérisation en chaine

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PRL : Prolactine

PRLR : Récepteur de la prolactine

PS : Population sauvage

Pv : Phosvitine

SE : Stock d'élevage

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

VLDLR : Récepteur de lipoprotéines de très basse densité

Vtg : Vitellogénine

VtgR : Récepteur de la vitellogénine

Première partie

Introduction générale

1. Contexte et problématique

1.1 Proximité phylogénétique de l'*Heterotis* et de l'*Arapaima* : intérêt pour comprendre l'évolution des téléostéens et la biologie de la reproduction

Le super ordre des Ostéoglossomorphes constitue l'un des groupes de téléostéens les plus primitifs présents sur le Gondwana (Bauchot et al., 1993 ; Hilton, 2003). Ce clade a un rôle essentiel dans la compréhension de la phylogénie des téléostéens (Hilton, 2003), raison pour laquelle il fait ainsi partie de l'un des clades les plus étudiés au sein des Poissons. Les différents auteurs se sont intéressés particulièrement à la biogéographie en raison de la répartition intercontinentales des espèces que renferme ce groupe (Nelson, 1969). Il est présent dans presque toutes les parties du globe en dehors de l'antarctique. Les Ostéoglossomorphes présentent un grand nombre d'espèces fossiles datant du proche crétacé dont une douzaine de genres identifiés proviennent de sédiments d'eau douce et marins (Lavoué, 2016). Il est composé de deux ordres : les Ostéoglossiformes largement distribués dans la zone tropicale et les Hiodontiformes de la zone tempérée nord-américaine (Betancur-R et al., 2017 ; Lavoué, 2016). L'ordre des Ostéoglossiformes est composé de la famille des *Gymnarchidae*, *Mormyridae*, *Notopteridae*, *Osteoglossidae* (y compris les *Arapaimidae*) et *Pantodontidae*. Cette classification est basée entre autres sur des données moléculaires et génomiques (Betancur-R et al., 2017).

Arapaima gigas (Schinz, 1822), *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829), *Scleropages sp* et *Osteoglossum sp* sont des espèces appartenant au clade des Ostéoglossomorphes.

De -150 à -30 millions d'années, la fragmentation du Gondwana, a permis d'isoler l'Afrique, l'Inde, Madagascar, l'Amérique du Sud, l'Australie, l'Antarctique et la nouvelle Zélande. Cette dissociation est reconnue comme une cause majeure de la divergence des espèces terrestres et d'eau douce par le mécanisme de la vicariance (Cox, 1974). La divergence entre *Arapaima* et *Heterotis* serait intervenue lors de la séparation de l'Amérique du Sud et de l'Afrique il y a environ 105 millions d'années (Nelson, 1969). La séparation de l'Inde-Madagascar et l'Afrique a été la cause de la divergence des Notopteridae africains et asiatiques il y a 135 millions

d’années (Inoue et al., 2009). La fragmentation de l'Australie et de l'Antarctique-Amérique du Sud a été la cause de la divergence des *Scleropage*s australiens-sud asiatiques et des *Osteoglossum* sud-américain (*bicirrhosum* et *ferreirai*) il y a 60 millions d’années (Nelson, 1969) (**Figure 1**).

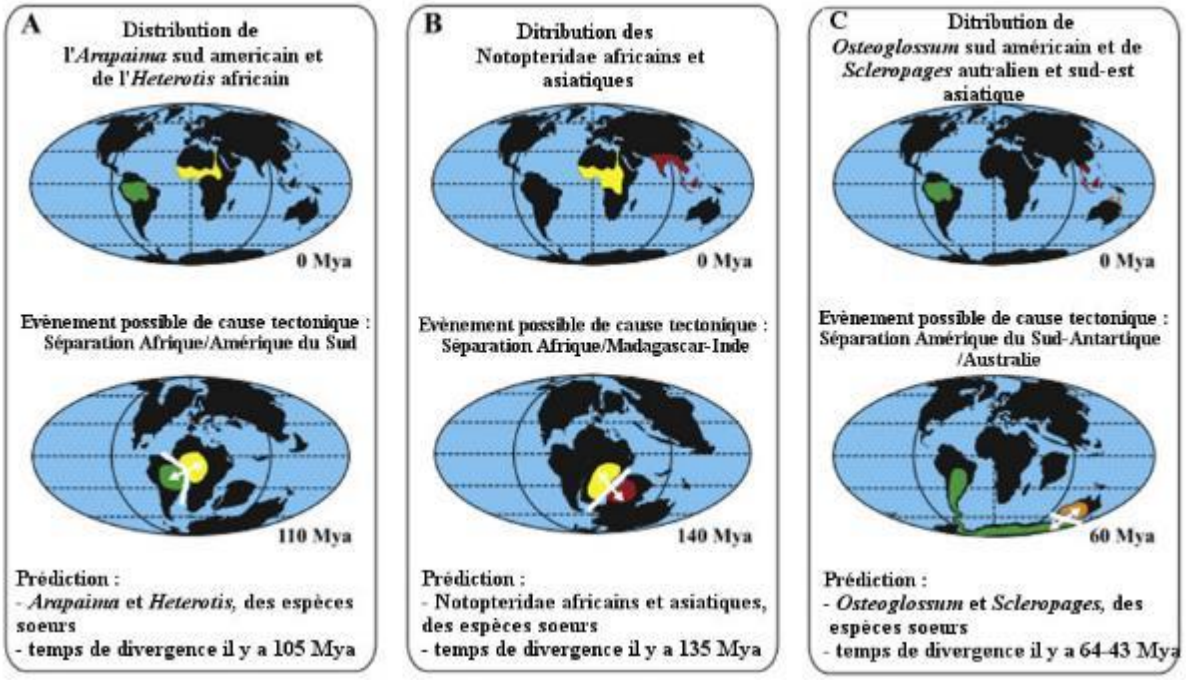


Figure 1 : Fragmentation et divergence de certaines espèces d’Ostéoglossomorphes, d’après Lavoué (2016).
(A) *Arapaima* et *Heterotis*, (B) Notopteridae africains et asiatiques, et (C) S*cleropages* et *Osteoglossum*, Mya : millions d’années.

Des études plus récentes (Lavoué, 2016) indiquent qu'il est probable que la fragmentation du Gondwana n'ait pas provoqué la divergence entre *Arapaima* et *Heterotis* ou entre les Notopteridae asiatiques et africains. L'analyse des données combinées des taxons fossiles et vivants, des caractères moléculaires et morphologiques, situe les temps de divergences après la fragmentation du Gondwana (**Figure 2**).

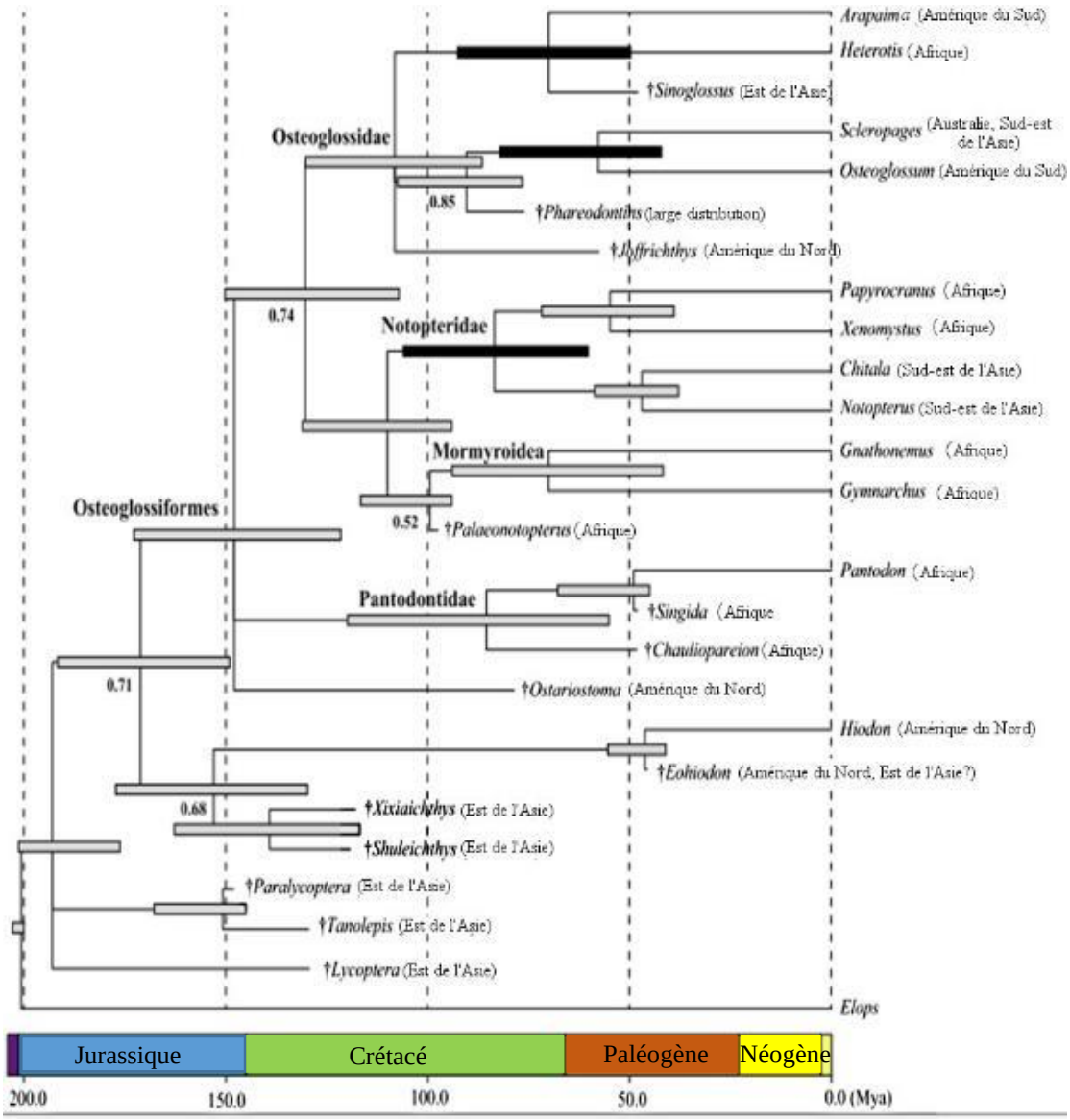


Figure 2 : Arbre phylogénétique situant la période de divergence entre *Heterotis* - *Arapaima* après la séparation de l'Afrique et de l'Amérique du Sud, d'après Lavoué (2016)
Les barres horizontales noires (pour les nœuds focaux) et grises (pour les autres nœuds) correspondent à des intervalles de confiance de 95%. Les nombres en gras aux nœuds sont des probabilités bayésiennes postérieures <0,9. Les genres fossiles sont précédés d'une croix, Mya : millions d'années.

Plusieurs études ont permis de montrer la proximité phylogénétique entre *H. niloti*cus du bassin hydrographique africain et *A. gigas* du bassin amazonien (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ; Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969). Ces études sont basées entre autres sur l'analyse de caractères squelettiques, la dentition, les approches bayésiennes de données morphologiques, fossiles et moléculaires, la structure des arcs branchiaux et les os infra orbitaux. Cette proximité phylogénique se traduit à la fois par une similitude de traits de vie entre les deux espèces sœurs et quelques évolutions (comportement, cycle de reproduction, croissance). L'étude de ces aspects à une échelle transcontinentale se révèle particulièrement intéressante dans le domaine de la biologie de la reproduction et pour la compréhension de l'évolution des téléostéens.

1.2 *Heterotis* et *Arapaima,* des poissons d'un grand intérêt pour la pêche et l'aquaculture

1.2.1 Pêche et aquaculture de *H. niloticus*

H. niloticus est une espèce importante pour la pêche continentale en Afrique (Adite et al., 2006 ; Moreau, 1982 ; Odo et al., 2009). C'est la principale espèce visée pendant les périodes de crue car les individus adultes se dispersent dans les plaines inondées (Adite et al., 2006). Au Bénin, 742 tonnes d'*Heterotis* étaient pêchés annuellement (Adite et al., 2006). Cette espèce qui représentait avec *Oreochromis niloticus* plus de 60% de la production de la pêche commerciale artisanale en Côte d'Ivoire (Bernacsek & Powles, 1992) connait une surexploitation de ses pêcheries. En 2016, la production halieutique de *H. niloticus* était estimée à 874 tonnes en Côte d'Ivoire (DAP, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d), soit moins de 3% des captures de pêche. Dans certains cours d'eau de sa zone de distribution, les alevins sont souvent pêchés volontairement en même temps que les géniteurs ; ce qui constitue une menace pour les populations sauvages de cette espèce (Bauchot et al., 1993 ; Oladosu et al., 2007).

La pisciculture africaine est axée principalement sur l'élevage de *O. niloticus* (Brummett et al., 2008). Les efforts en matière d'élevage d'*Heterotis* ont été réalisés dès 1955 avec les premiers essais couronnés de succès en Centrafrique (Tillon, 1959). En Côte d'Ivoire, c'est la deuxième espèce piscicole (Yao et al., 2017). *Heterotis* est généralement élevé en polyculture avec *O.*

niloticus qui constitue l'espèce principale (Kimou et al., 2016 ; Yao et al., 2017). Les élevages en monoculture sont assez rares (Bard, 1973 ; Kimou et al., 2016 ; Reizer, 1964 ; Tillon, 1959).

H. niloticus est généralement très prisé par les populations locales ; ce qui induit une exploitation régulière des pêcheries et une commercialisation facilitée dans ces zones (Depierre & Vivien, 1977 ; Kouakou et al., 2016). Dans certaines régions de la Côte d'Ivoire (Lazard, 1990), du Gabon (Depierre & Vivien, 1977) et du Nigeria (Ekanem et al., 2010), il est impopulaire à cause de son goût diversement apprécié. Cependant, lorsqu'il est salé et fumé, son acceptation par le consommateur est très élevée (Akinneye et al., 2007 ; Ekanem et al., 2010). C'est une importante source d'acides aminés indispensables (Monentcham et al., 2010), de protéines et de sel minéraux (Akinneye et al., 2007).

En Côte d'ivoire, l'association de l'élevage de *H. niloticus* et de la culture du riz dans un même étang est un axe important de la sécurité alimentaire dans les communautés villageoises (Bony et al., 2015). Ce poisson joue un rôle socioculturel chez les peuples Ibo du Nigeria (Odo et al., 2009) et procure dans sa zone de distribution un revenu substantiel aux pêcheurs et aux pisciculteurs (Depierre & Vivien, 1977). Le rendement de filetage de *H. niloticus* représente plus de 59% du poids total du poisson (Adeyemo, 2013). Toutes les parties du poisson éviscéré sont en général consommées. Les poissons sont vendus lorsqu'ils ont atteint un poids supérieur à 2 kg contrairement à *O. niloticus* qui dépasse rarement les 500 g à la vente. Le prix du kilogramme se négocie en Afrique de l'Ouest sensiblement au même prix que *O. niloticus* entre 1 500 et 2 500 FCFA suivant la taille du poisson.

1.2.2 Pêche et aquaculture de *A. gigas*

A. gigas fait partie de l'une des espèces les plus exploitées en pêcherie et commence à être produite en aquaculture en Amérique du Sud. C'est une source importante de protéines animales utilisée par les populations du bassin amazonien. Il a longtemps fait partie de l'alimentation des amérindiens vivant pour la plupart à proximité des rivières et des fleuves. A partir du XVIII^{e} siècle, avec l'arrivée des colonisateurs espagnols, il a été utilisé comme substitut de la morue et fortement exploité. Ainsi, la pêcherie commerciale d'*Arapaima* s'est développée à partir de cette période (Farias et al., 2003). De 1885 à 1893, 11 540 tonnes d'*Arapaima* séché et salé sont exportées de Belém (environ 1282 tonnes/an). Cette exploitation a connu une croissance entre 1919 et 1921 pour atteindre 1920 tonnes/an. De 1918 à 1924,

6 775 tonnes d'*Arapaima* sont exportées de l'Etat d'Amazonas (968 tonnes/an). A partir de 1970, l'espèce a commencé à se faire rare. Dès 1980, son exploitation à des fins commerciales n'était plus viable économiquement. L'épuisement des stocks naturels a conduit l'espèce à disparaître dans certaines régions. Depuis 1975, *A. gigas* figure dans l'Annexe II de la liste CITES (Convention International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (CITES, 2018) avec une population estimée entre 50 000 à 100 000 individus dans le bassin amazonien (Schaefer et al., 2012). Cependant, il est classé sur la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) comme espèce ne disposant pas de données suffisantes pour établir clairement son statut et donc son degré de de vulnérabilité et de risque d'extinction (IUCN, 2017).

Le statut CITES n'a pas empêché la poursuite de son exploitation illégale. En 2001, le gouvernement brésilien a interdit toute activité de pêche d'*Arapaima* dans ses cours d'eau (Hrbek et al., 2005). Cependant, il ne fait pas partie de la liste nationale des espèces en danger (Castello et al., 2015). La saison favorable de pêche d'*Arapaima* se situe de Septembre à Janvier pendant la baisse du niveau des cours d'eau (Castello, 2008b).

Les populations naturelles d'*Arapaima* continuent leur déclin dans la majorité des eaux amazoniennes en raison de la forte exploitation des pêcheries. Il ressort d'une étude récente (Castello et al., 2015) que *A. gigas* a disparu dans 19% des localités dans la zone basse de l'Amazonie. Compte tenu de son importance économique et culturelle, la pisciculture de cette espèce s'est développée (Castello et al., 2015) pour répondre aux besoins sans cesse croissants des consommateurs (Schaefer et al., 2012). Son statut CITES a suscité dès les années 2004, un grand intérêt pour son élevage (**Figure 3**). En plus, tout comme *H. niloticus* (Reizer, 1964), les caractéristiques exceptionnelles de *A. gigas* font de ce poisson, un excellent candidat pour la pisciculture (Santos et al., 2014 ; Schaefer et al., 2012). Il possède :

- un taux de croissance élevé (10 à 15 kg/an) ;
- une excellente utilisation de sa carcasse ;
- une maturité sexuelle tardive, ce qui permet une bonne croissance des mâles et des femelles ;
- une résistance aux manipulations et au transport ;
- une tolérance à des faibles teneurs d'oxygène dissous dans l'eau grâce à l'existence d'une double respiration, branchiale et aérienne.

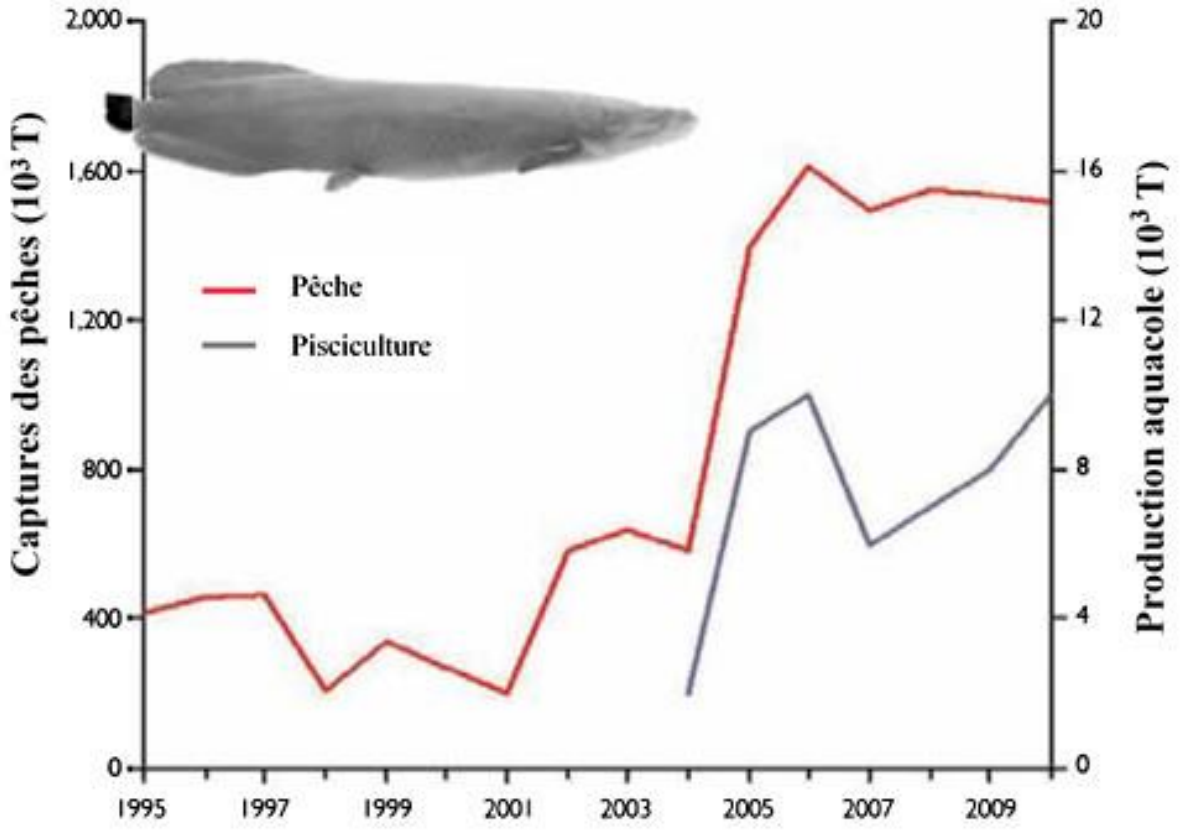


Figure 3 : Capture de la pêche et production aquacole de *A. gigas* de 1995 à 2010, d'après Schaefer et al. (2012). T : tonne.

L'aquaculture commerciale d'*Arapaima* est une activité récente. Sa production est limitée principalement à la région amazonienne en particulier au Pérou et au Brésil. Les conditions environnementales y sont favorables (Valladão et al., 2016). Le suivi de la reproduction en captivité a débuté au Pérou en 2007 (Nuñez et al., 2011). En élevage intensif, les poissons sont élevés à très faible densité : 1 à 2 kg/m^2 avec des températures d'eau variant entre 28 et 30°C (Marre, 2011). La taille commerciale des *Arapaima* d'élevage qui offrirait un optimum de goût est comprise entre 10 et 12 kg (Marre, 2011). L'aquaculture ornementale de *A. gigas* est une activité en plein essor. Elle se développe en raison de la demande de pays comme les Etats Unis, le Japon, la Thaïlande et Hong Kong (**Figure 4**). Des juvéniles sont exportés et se retrouvent dans des aquariums ou servent à empoissonner des lacs en vue de la pêche sportive (Schaefer et al., 2012).

Arapaima offre une couleur et une texture de chair attrayantes, un faible contenu en matières grasses (environ 1%) et des niveaux élevés de protéines (20% des tissus musculaires) et

d'acides gras polyinsaturés (oméga 3 et 6). Sa chair est ferme et ne présente pas d'arrêtes intramusculaires (Schaefer et al., 2012). Il présente une belle épaisseur de filet qui facilite les préparations culinaires. De ce fait, il est apprécié par les grands chefs cuisiniers américains et japonais. Le filet sans peau représente 42% du poids total du poisson. Sur le marché international, il est vendu entre 20-25 USD / kg aux États-Unis et 12-15 USD / kg dans les villes sud-américaines. Les filets vendus en France pèsent en moyenne 2 kg et coûtent 18 euros/kg (Marre, 2011). Sur les marchés locaux, en Amazonie, le prix du filet varie de 3 - 3,75 USD / kg. Le produit salé et séché est compris entre 5 - 6,25 USD / kg (Valladão et al., 2016).

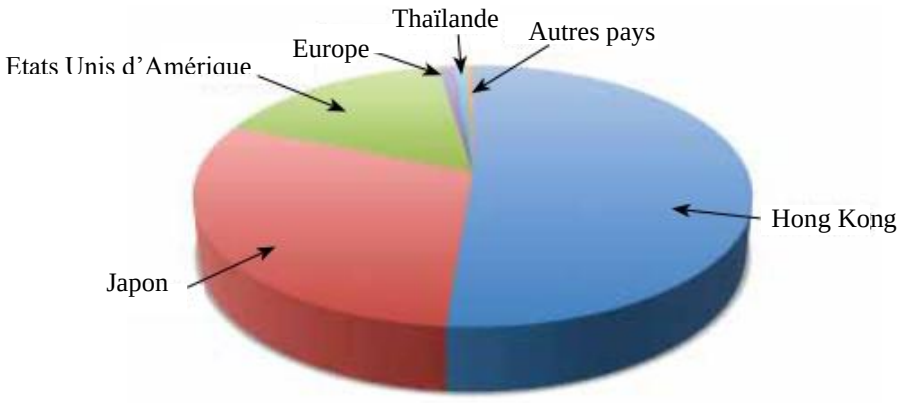


Figure 4 : Principaux pays ayant importé *A. gigas* vivant de 2000 à 2010.
D'après Schaefer et al. (2012).

1.3 Défis liés à la reproduction et à la génétique des populations d'*Heterotis* et *Arapaima*

Malgré leurs caractéristiques biologiques étonnantes, la production croissante et les efforts de marketing pour leur commercialisation, l'élevage de *A. gigas* et *H. niloticus* se heurte à des difficultés techniques au niveau de la reproduction (Adite et al., 2006 ; Kouakou et al., 2016 ; Valladão et al., 2016) et de la génétique des populations (Hrbek et al., 2005 ; Hurtado et al., 2013).

La maîtrise de l'élevage de l'*Arapaima* et de l'*Heterotis* est difficile en raison de particularités comportementales et physiologiques communes : induction artificielle de la ponte impossible

pour l'instant, parade nuptiale, confection d'un nid, soins parentaux (Reizer, 1964 ; Valladão et al., 2016). De plus, l'identification morphologique des sexes des reproducteurs est impossible en dehors de la période de reproduction au cours de laquelle quelques traits distinctifs sont parfois visibles chez *A. gigas* (**Figure 5**) (Carreiro et al., 2011 ; Chu-Koo et al., 2009 ; IRD, 2008 ; Oladosu et al., 2007). En conséquence, obtenir des reproductions en captivité demeure l'une des principales difficultés de la pisciculture de ces deux espèces (Carreiro et al., 2011 ; Chu-Koo et al., 2009 ; IRD, 2008 ; Monentcham et al., 2009). L'absence de dimorphisme sexuel chez les deux espèces est un frein à l'optimisation de la reproduction en captivité (Nuñez, 2008).

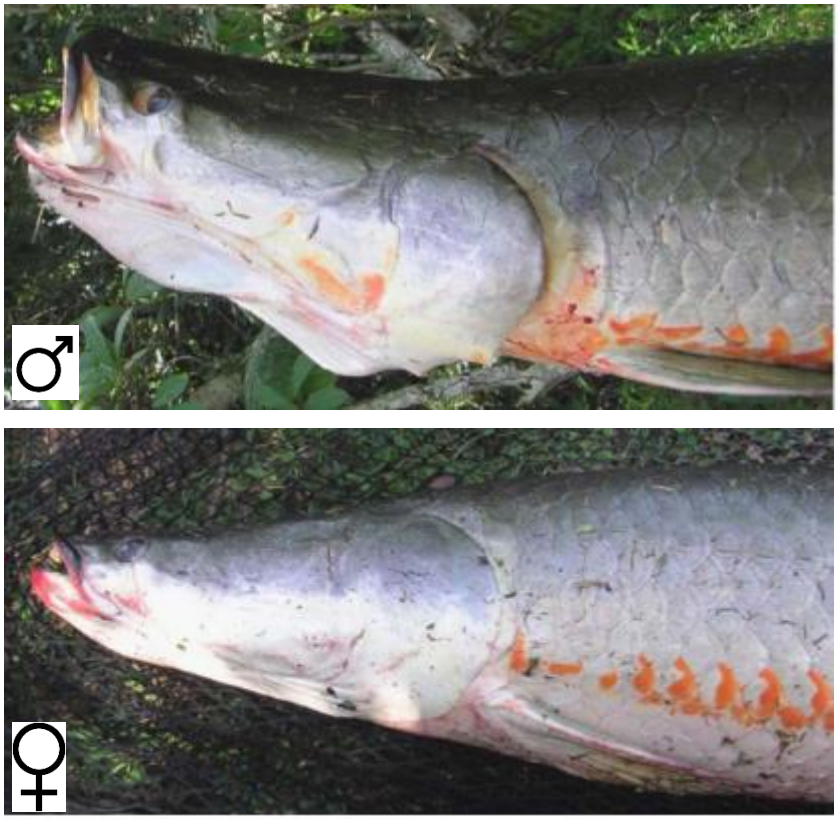


Figure 5 : Coloration de *A. gigas* mâle et femelle mâtures durant la période reproduction (Chu-Koo et al., 2009). Chez le mâle, une coloration rouge-orangée est observée latéralement de manière continue de la nageoire caudale jusqu'au niveau de l'opercule. Chez la femelle, la coloration s'arrête avant l'opercule.

Une gestion adéquate des géniteurs passe nécessairement par leur sexage. Chez *A. gigas*, une technique d'analyse immuno-enzymatique a permis de développer un kit de sexage (Chu-Koo

et al., 2009 ; Dugué et al., 2008 ; Núñez & Duponchelle, 2009 ; Nuñez et al., 2011). Le sexage a été rendu possible aussi par l'utilisation d'endoscope (Carreiro et al., 2011). Cela a permis une production importante d'alevins au Pérou, où ces alevins sont utilisés à la fois pour la pisciculture et pour l'ornement. Cependant, la compréhension du comportement reproducteur de *A. gigas* demeure encore assez limitée. Les facteurs environnementaux et sociaux qui conduisent à la formation des couples et au succès reproducteur ne sont pas encore connus.

Aucune technique de sexage fiable n'existe pour *Heterotis* (Oladosu et al., 2007). Les pisciculteurs comptent généralement sur la loi des grands nombres en introduisant dans un étang plusieurs géniteurs d'*Heterotis* (Reizer, 1964). La difficulté de contrôler la reproduction conduit aussi certains pisciculteurs à prélever des alevins dans les cours d'eau naturels pour les élever en étang de pisciculture (Bauchot et al., 1993).

Les études relatives à la génétique des populations sauvages de *A. gigas* et *H. niloticus* sont récentes (Hrbek et al., 2005 ; Hurtado et al., 2013). Le statut de nombreuses populations et de sous-populations naturelles et piscicoles de ces espèces n'est pas encore complètement établi. Cette insuffisance de données pourrait affecter la gestion des stocks de reproducteurs de *A. gigas* et de *H. niloticus* dans les pêcheries et les fermes piscicoles.

2. Descriptions des deux modèles d'étude : *Arapaima gigas* et *Heterotis niloticus*

Figure 6 : *Heterotis niloticus* adulte, environ 1 m de longueur totale maximale et 10 kg de poids maximal.

Figure 7 : *Arapaima gigas* adulte, environ 3 m de longueur totale maximale et 200 kg de poids maximal.

2.1 Systématique et morphologie

La famille des *Osteoglossidae* comprend outre *H. niloticus* et *A. gigas*, les arrowanas sud-américains (*Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829), *O. ferreirai* (Kanazawa, 1966)), australiens (*Scleropages jardinii* et *S. leichardtl*) et asiatiques (*Scleropages formosus*) (Bard,

1973 ; Hilton, 2003 ; Kottelat, 2013 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Lévêque & Paugy, 1999, 2006 ; Nelson, 1968). *Heterotis* et *Arapaima* sont classés dans la famille des *Arapaimidae* ou *Arapaimatidae* (**Figure 8**) par certains auteurs (Adite et al., 2006; Miranda-Chumacero et al., 2012). D'autres auteurs les classent dans la famille des *Osteoglossidae* (Betancur-R et al., 2017) et dans la sous famille des *Heterotidinae* ou *Heterotinae* (Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2003). *Heterotis niloticus* est la seule espèce connue du genre *Heterotis* (Adite et al., 2005 ; Moreau, 1982). Son synonyme valable est *Clupisudis niloticus* (Cuvier, 1829). Considéré comme un genre monotypique (Hrbek et al., 2005), des études ont rapporté que le genre *Arapaima* comporterait au moins cinq espèces encore vivantes (Stewart, 2013). Il s'agit de *A. gigas*, *A. arapaima*, *A. mapae*, *A. agassizii* et *A. leptosoma*.

Phyllum : Chordata

Sous-Phyllum : *Vertebrata*

Infra-phyllum : *Gnathostomat*a

Classe : Actinoterygii

Sous-Classe : *Neoptrygii*

Infra-classe : *Teleostei*

Superordre : *Osteoglossomorpha*

Ordre : *Osteoglossiform*

Famille : *Osteoglossidae* / *Arapaimidae*

Genre : *Heterotis*

Espèce : *Heterotis niloticus*

Genre : *Arapaima*

Espèces :

Arapaima gigas

Arapaima arapaima

Arapaima mapae

Arapaima agassizii

Arapaima leptosoma

Figure 8 : Position systématique de *A. gigas* et de *H. niloticus*

L'un des caractères qui permet de distinguer les cinq espèces d'*Arapaima* est la forme de la cavité dorsale la plus latérale sur le pré opercule (**Figure 9**).

A. gigas est connu sous le nom de Pirarucu au Brésil et en Colombie, Paiche au Pérou, Equateur, Venezuela et en Bolivie, Arapaima en Guyana. Le nom Pirarucu signifie dans la langue des indiens d'Amazonie « Poisson rouge » en référence à la couleur rouge du bord postérieur des écailles. Il est l'un des plus grands poissons d'eau douce. C'est une espèce emblématique du bassin amazonien. Il peut mesurer jusqu'à 3 m de long (Bard, 1973) et peser plus de 200 kg (Arantes et al., 2010 ; Hrbek et al., 2005 ; Schaefer et al., 2012). Sa durée de vie se situe entre 15 et 20 ans.

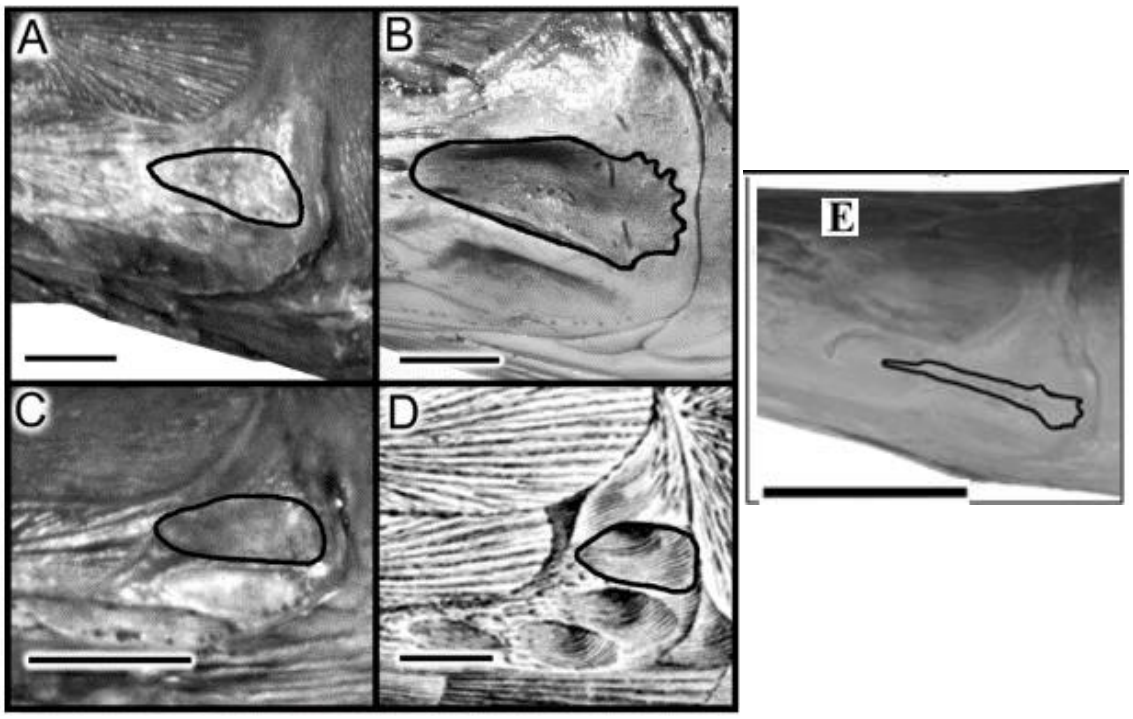


Figure 9 : Variation de forme de la cavité préoperculaire de *Arapaima sp* (Stewart, 2013)
(A) *A. gigas* (Schinz, 1822), holotype ; (B) *A. arapaima* (Valenciennes, 1847), topotype ; (C) *A. mapae* (Valenciennes, 1847), holotype ; (D) *A. Agassizii* (Valenciennes, 1847), holotype ; (E) *A. leptosoma*, holotype.

Plusieurs noms en langue locale sont utilisés pour désigner *H. niloticus* en Afrique (**Tableau 1**). *H. niloticus* est de taille plus modeste que *A. gigas*. Dans la rivière Nun au Nigeria, il peut atteindre 105,5 cm LT et peser 10,6 kg (Ezekiel & Abowei, 2013). Comme chez la plupart des espèces tropicales, la longévité de *H. niloticus* est courte. Elle se situe entre 5 et 10 ans (Moreau, 1982).

H. niloticus et *A. gigas* ont le corps couvert d'écailles épaisses et osseuses avec une consistance cornée. Ces énormes écailles constituent un système de protection très efficace pour *A. gigas*. Elles le protègeraient particulièrement contre les sévères morsures de Piranha ou d'autres animaux aquatiques qui partagent son écosystème. Les nageoires pectorales et pelviennes de *A. gigas* et *H. niloticus* sont très éloignées les unes des autres. La nageoire dorsale et la nageoire anale sont souvent subégales et opposées. Elles sont très rapprochées de la nageoire caudale qui est de forme arrondie (Bard & Imbiriba, 1985 ; Moreau, 1982).

Tableau 1 : Noms attribués à *Heterotis niloticus* dans plusieurs pays d'Afrique.

Pays	**Nom attribué localement à *H. niloticus***
Gabon	Poisson sans nom
Cameroun	Kanga, Tergal, Bambté, Balli, Bargi, Lareo, Noussa, Penge, Riki, Tou
Madagascar	Toundro'ny Presida (poisson du président), Rotivita, Fataoroti, Hataonoti, Biby lava (bête longue)
Côte d'Ivoire	Poisson Cameroun, Fanan, Ahoussou Koffi
Nigeria	Afo, Aika, Bahli, Bonytongue
Sénégal	Bakata, Bala, Balde, Dugande, N'Diaguel
RDC	Congo Ya sika, Muzalazala
Kenya	Dese
Ghana	Fa
Burkina Faso	Fana, Rakoko
Mali	Fana, Kondo
Benin	Hwa, Kouala, Kpote
Tchad	Kani, Kawi, Ngol, Ngôlô
Soudan	Katakpi, Lek, Nauk

La coloration de *A. gigas*, de type marron clair à verdâtre, est plus foncée chez les juvéniles et change chez le mâle en devenant beaucoup plus rouge en période de reproduction (Bard & Imbiriba, 1985). Chez *H. niloticus*, la coloration est uniforme, grisâtre, brunâtre ou olivâtre pendant la période de repos sexuel. Elle devient beaucoup plus foncée (noirâtre) à l'approche de la reproduction (Moreau, 1982 ; Tillon, 1959).

La tête de *H. niloticus* est courte (**Figure 10a**), épaisse et arrondie. La longueur du corps est 3,7 à 4,7 fois celle de la tête qui est 1,6 à 1,7 fois plus longue que large. La longueur standard (LS) est 3,9 à 4,6 fois la hauteur du corps (Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Moreau, 1982). Chez *A. gigas*, la tête (**Figure 10b**) et le corps sont de forme allongée, avec une section circulaire et ellipsoïdale (Bard & Imbiriba, 1986).

La bouche de ces deux espèces est équipée d'une langue osseuse ; ce qui leur vaut l'appellation de bonytongues en anglais (Bard & Imbiriba, 1985). *A. gigas* dispose de deux à deux rangées et demie de dents. Au sud du Brésil, dans la rivière Grande, une seule rangée de dents a été observée chez certains *Arapaima* (Carvalho et al., 2015). *H. niloticus* possède seulement une rangée de dents linguales et de forme conique (Moreau, 1982).

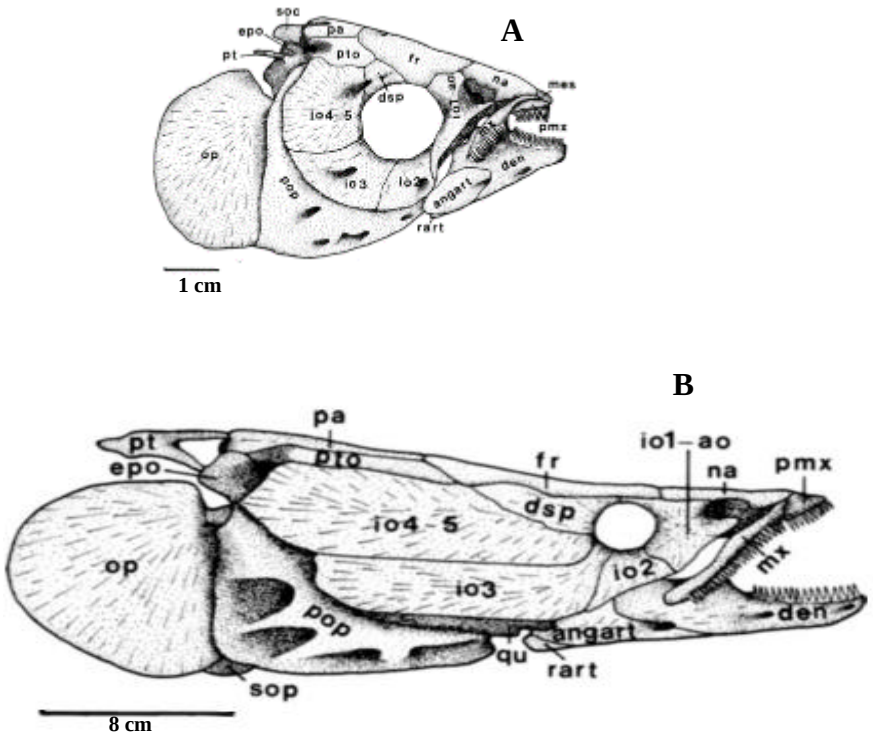


Figure 10 : Squelette de la tête de *Heterotis niloticus* (A) et de *Arapaima gigas* (B) (Guo-Qing & Wilson, 1996).
Angart : angulo-articulaire, br : branchiostegals, ch : ceratohyal, den : dentaire, dsp : dermosphénotique, enp : endopyterygoïd, eoc : exoccipital, ep : epural, epo : épiotique, fr : frontal, hh : hypohyal, hl, 1er hypural, h2 : 2ème hypural, h6 : 6e hypural, iol-ao : antorbital fusionné et 1er infraorbital, io2 : 2e infra-orbitaire, io3 : 3e infraorbital, io4-5, 4ème et 5ème infraorbitales fusionnés, iop : interopercule, mes : mesethmoïde, mx : maxillaire, na : nasale, npu2 : épine(s) neurale(s) sur la 2ème preurale, op : opercle, pa : pariétal, pas : parasphenoïde, ph : parypypique, pmx : prémaxillaire, pop : pré-opercule, pt : post-temporale, pto : dermopterotique, pul : 1er centrum preurale, pu2, 2ème centrum preurale, qu : quadrate, rart : rétroarticulaire, sm : symplectique, soc : supraoccipital, sop, subopercule, ul : 1er centrum ural, u2 : 2ème centrum ural.

2.2 Particularités anatomiques des *Arapaimidae*

2.2.1 Le système nerveux

La forme du cerveau de *A. gigas* et de *H. niloticus* (**Figure 11**) rappelle celui de la plupart des téléostéens. Le cerveau d'*Heterotis* est plus encéphalisé que celui d'*Arapaima*, d'*Osteoglossum* ou de *Scleropages*. Les vues dorsales et latérales du cerveau de l'*Heterotis* montrent des lobes vagaux bilatéraux postérieurs au cervelet. Sa forme étrange est semblable au chou-fleur (Bauchot et al., 1993). Le cerveau est protégé par une plaque osseuse dure. L'hypophyse se trouve comme très classiquement en position ventrale enveloppée dans une petite cavité appelée selle turcique.

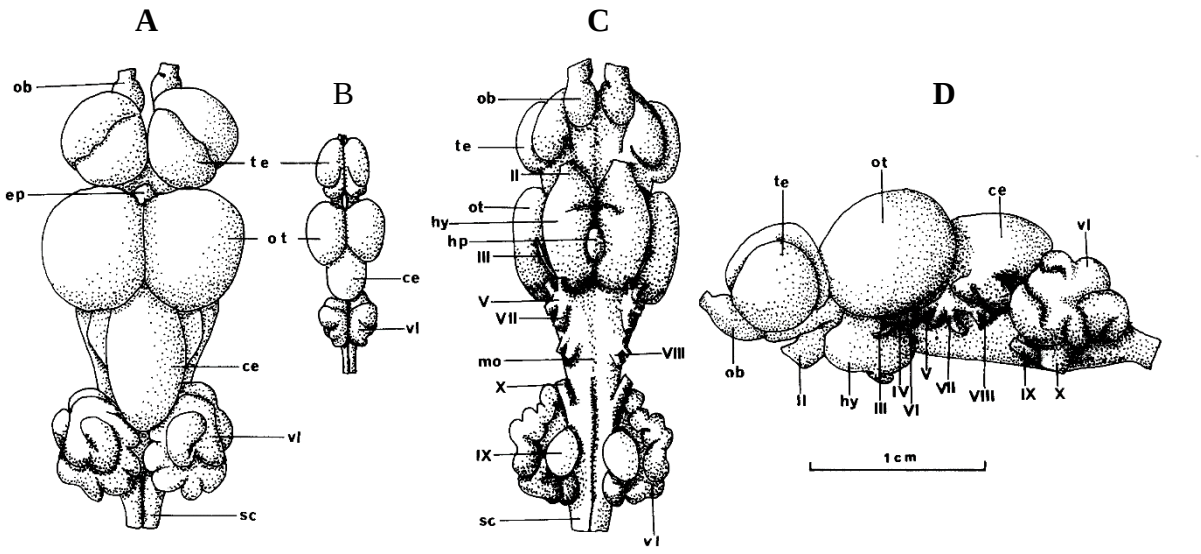


Figure 11 : Morphologie du cerveau de *H. niloticus* (Bauchot et al., 1993).
Vue dorsale (A), vue dorsale chez un spécimen juvénile (B), vue ventrale (C) et vue latérale (D), ce : cervelet, ep : épiphyse, hy : hypothalamus, hp : hypophyse, mo : moelle allongée, ob : bulbe olfactif, ot : tectum optique, sc : moelle épinière, te : télencéphale, vl : lobe vagal, II : nerf optique, III : nerf oculomoteur commun, V : nerf trigeminal, VI : nerf abducens, VII : nerf facial, VIII : nerf auditif, IX : nerf glossopharyngien, X : nerf vagal.

2.2.2 Gonades

L'aspect des gonades de *H. niloticus* et de *A. gigas* est similaire à celles des Ostéoglossomorphes. La plupart des espèces de poissons possèdent deux gonades fonctionnelles chez les deux sexes. Chez les *Arapaimidae*, il n'existe qu'un seul ovaire et qu'un seul testicule fonctionnel qui sont situés sur le flanc gauche (**Figure 12**). Les lamelles

ovariennes sont "nues" et directement exposées dans la cavité générale du corps (Adite et al., 2006 ; Bard & Imbiriba, 1986 ; Chu-Koo et al., 2009 ; Godinho et al., 2005 ; Moreau, 1982 ; Oladosu et al., 2007). Chez *A. gigas* un ovaire atrophié situé sur le flanc droit a été observé chez certains individus. Il est dans ce cas toujours non fonctionnel (Godinho et al., 2005). Compte tenu de ces particularités anatomiques, la canulation ovarienne est rendue difficile chez ces deux espèces. Récemment, à l'aide d'un endoscope, elle a été réalisée chez *A. gigas* (Carreiro et al., 2011).

Le testicule de *H. niloticus* peut atteindre 7 cm et peser 3 à 4 g. L'indice gonado-somatique (IGS) demeure inférieur à 1% même en période de reproduction. Le testicule est rattaché dorsalement par un tissu conjonctif. L'ovaire des individus matures pèse 70 à 90 g et peut représenter jusqu'à 5% du poids du poisson (Moreau, 1982).

Chez *A. gigas*, l'ovaire est rattaché à la paroi de la cavité du corps par une couche basale. Un ovaire gravide d'une femelle prête à frayer peut atteindre une longueur de 780 mm, une largeur de 240 mm et un poids de 2800 g (Flores, 1980). Des ovaires immatures et matures peuvent peser respectivement 4,8 g et 728,7 g. On enregistre des IGS variant entre 0,04% (immatures) et 0,65% (matures). Le testicule est allongé et son diamètre peut atteindre 1,5 cm. Il peut peser entre 0,8 g (immatures) et 11,4 g (matures) avec un IGS de 0,011% (matures) à 0,012% (immatures) (Godinho et al., 2005).

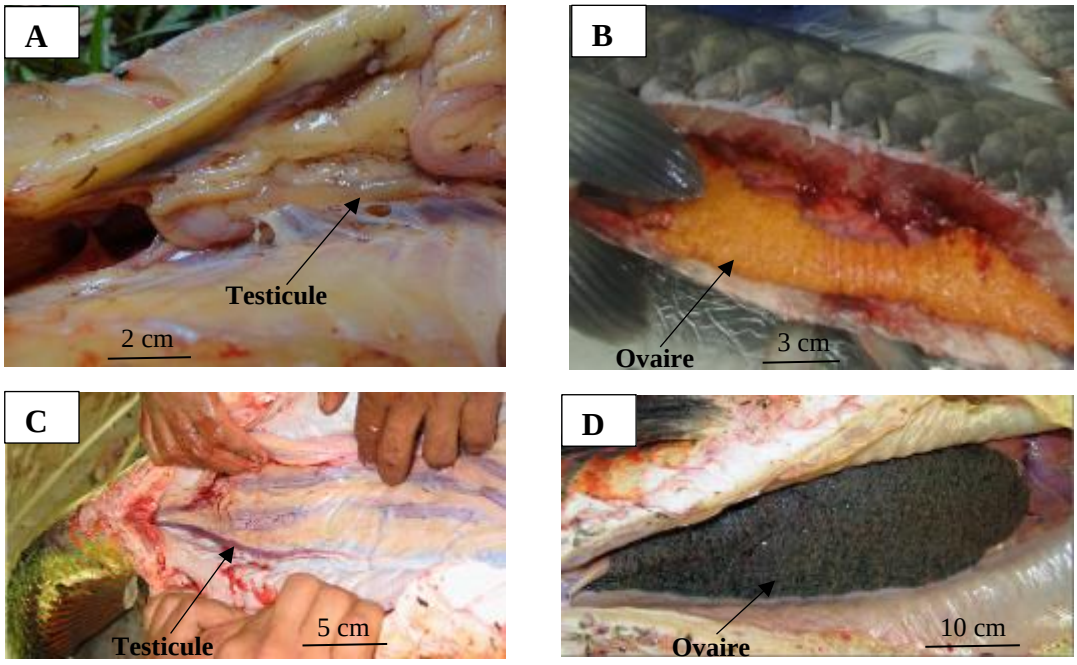


Figure 12 : Position des gonades chez les *Arapaimidae*.
Testicule (A) et ovaire (B) de *H. niloticus*, testicule (C) et ovaire (D) de *A. gigas*.

2.2.3 Organe suprabranchial ou épibranchie

Chez *H. niloticus*, une paire de diverticules tubulaires plus ou moins enroulés en spirale est visible lorsque l'on ouvre les opercules (**Figure 13**). Leur forme rappelle celle de la coquille d'escargot (Braford, 1986 ; Moreau, 1982). Cet organe est appelé organe suprabranchial ou épibranchie (Bauchot et al., 1993 ; Braford, 1986 ; Moreau, 1982). *H. niloticus* est le seul Ostéoglossiformes à disposer de cet organe. Il est présent chez trois autres groupes de téléostéens : les Clupeiformes, les Gonorynchiformes et les Charachiformes. Cependant, il n'a pas une structure similaire à celle de l'*Heterotis* (Braford, 1986). Le nombre de spires croît avec l'âge du poisson pour atteindre 7 chez les adultes. L'épibranchie est tapissée de bourgeons gustatifs (Bauchot et al., 1993 ; Braford, 1986).

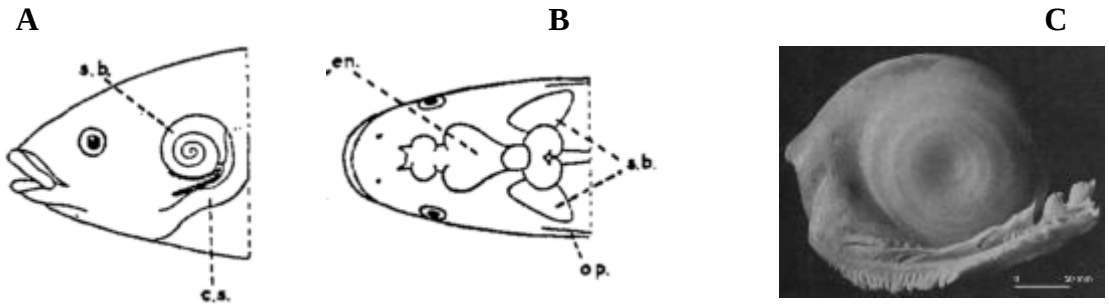


Figure 13 : Position schématique de l'organe suprabranchial (s.b.) de *H. niloticus* (Braford, 1986 ; Moreau, 1982).
Vue latérale gauche (A), vue dorsale (B). Vue externe latérale de l'épibranchie droit (C), en : encéphale, op : opercule, cs : ceinture scapulaire.

L'épibranchie joue un rôle dans l'alimentation en servant à filtrer des microparticules alimentaires contenues dans l'eau (Bauchot et al., 1993 ; Braford, 1986). Précédemment, des fonctions respiratoires et auditives ont été attribuées à l'arc suprabranchial respectivement par Hirtl en 1854 et par D'Aubenton et Daget en 1961 (Moreau, 1982). Le nom *Heterotis* qui signifie « autre oreille » provient du rôle auditif joué.

En Côte d'Ivoire, certains pêcheurs pensent que la présence de l'épibranchie après la mort du poisson affecte négativement la qualité et le goût de sa chair. Elle est de ce fait immédiatement

extraite du poisson après les pêches. Cette pratique de retirer les branchies a également cours en Amazonie pour l'*Arapaima*, sans que l'on puisse vraiment confirmer une action négative sur les qualités gustatives de leur chair.

2.2.4 Vessie gazeuse

Les espèces de la famille des *Arapaimidae* ont une double respiration : branchiale et aérienne (Brauner et al., 2004 ; Depierre & Vivien, 1977 ; Galdames-portus et al., 1978). Ils disposent d'un organe adapté à la respiration aérienne qui fonctionne comme un véritable poumon. Il s'agit d'une vessie natatoire modifiée (Bard & Imbiriba, 1986 ; Bard, 1973 ; Lévêque & Paugy, 1999) semblable à celle d'un autre Ostéoglossiformes, *Gymnarchus niloticus*. Chez *Heterotis*, la vessie natatoire est tripartite et communique avec le pharynx par un sphincter. La partie antérieure de la vessie, dans la région voisine de ce sphincter, est peu vascularisée. La deuxième partie est très vascularisée et la troisième partie accolée aux reins forme une masse spongieuse vascularisée par l'artère pulmonaire et les veines cardinales postérieures (Moreau, 1982).

La respiration aérienne obligatoire permet à *A. gigas* et *H. niloticus* de peupler les cours d'eau relativement pauvres en oxygène (Moreau, 1982). Ils remontent tous les 5 à 15 min. en surface pour respirer (Bard, 1973). En s'appuyant sur ce comportement respiratoire, une technique a été développée pour dénombrer les populations naturelles de *A. gigas* au moment où les poissons émergent. Dans les pêcheries, ce comportement respiratoire les expose aussi aux spécialistes de la pêche au harpon (Arantes et al., 2010 ; Castello, 2008a ; Castello, 2004). Face au danger, ce temps peut être prolongé jusqu'à 40 min (Bard, 1973)

2.3 Régime alimentaire

2.3.1 *H. niloticus*, un poisson benthophage et microphage

H. niloticus est un omnivore à tendance benthophage et microphage (Adite et al., 2005 ; Depierre & Vivien, 1977 ; Edoghotu & Hart, 2014 ; Kouakou et al., 2016). Il a une grande plasticité alimentaire qui varie avec l'âge et la taille du poisson (Depierre & Vivien, 1977 ; Odo et al., 2009 ; Ugwumba, 1993). Il consomme principalement les invertébrés benthiques et des

micro crustacés (Adite et al., 2005 ; Kouakou et al., 2016 ; Lévêque & Paugy, 1999 ; Odo et al., 2009). Son régime alimentaire se compose également d'insectes, de rotifères, d'arachnides, de nématodes, de mollusques et de graines. En général, ces aliments sont riches en protéines (Ugwumba, 1996).A partir de 100 à 200 mm de LS, les individus consomment des graines et des détritus. Malgré la quantité de consommation de détritus, *H. niloticus* n'est pas considéré comme un détritivore spécifique (Adite et al., 2005 ; Edoghotu & Hart, 2014). Les juvéniles d'*Heterotis* se nourrissent aussi de zooplancton et de phytoplancton.

La partie moyenne de l'intestin de *H. niloticus* rappelle la forme du gésier des oiseaux (Moreau, 1982). Il contient également des grains de sable qui facilitent la digestion des aliments consommés (Adite et al., 2005). Cet organe n'est pas très développé chez les individus jeunes (LS< 400 mm).

En captivité, *H. niloticus* qui est élevé en polyculture avec *Oreochromis niloticus*, n'a pas une alimentation spécifique. Il partage les aliments distribués aux Tilapias sans rentrer en concurrence directe avec ceux-ci (Kimou et al., 2016). Une étude réalisée par Monentcham et al. (2010) a montré que sur le plan protéique, les besoins nutritionnels des juvéniles (3-62 g) se situent entre 310 et 345 g de protéines/kg d'aliment respectivement pour la croissance optimale et maximale. Les besoins spécifiques en acides aminés indispensables, excepté pour le tryptophane et l'histidine, des juvéniles de *H. niloticus* sont similaires à ceux d'autres poissons tropicaux omnivores.

2.3.2 *A. gigas*, un poisson carnivore

En milieu naturel, les adultes de *A. gigas* sont essentiellement piscivores (Schaefer et al., 2012). Leur tube digestif est court comme pour la plupart des carnivores. Ils chassent de nuit et attrapent leurs proies par une forte succion de la bouche (Bard, 1973). L'eau, absorbée en même temps que l'aliment, est rejetée à travers les opercules. Les alevins se nourrissent d'insectes et de petits gastéropodes (De Oliveira et al., 2005).

Compte tenu de son régime piscivore, en captivité, *A. gigas* est nourri avec une variété d'aliments riches en protéines animales. Dans le milieu naturel, le régime alimentaire se compose de poissons vivants ou de différents animaux morts. En élevage, les aliments industriels distribués à l'*Arapaima* sont riches en farine de poisson (40 à 45%) et peu riche en huile (8%) (Marre, 2011 ; Nuñez et al., 2011). L'alimentation nécessaire pour les reproducteurs

en captivité représente 2% de biomasse par jour 5 à 6 jours par semaine (Nuñez et al., 2011). Les juvéniles (26 cm et 119 g en moyenne) peuvent consommer efficacement plus de 8% de leur biomasse par jour (Padilla et al., 2004).

3. Les populations de *A. gigas* et de *H. niloticus*

3.1 Habitat

Les *Arapaimidae* sont des poissons d'eau douce qui préfèrent les zones lentiques (<0,12 m / s), des cours d'eau peu profonds (<3 m) et fuient les eaux boueuses (Adite et al., 2006 ; Bard, 1973 ; Bard & Imbiriba, 1985 ; Moreau, 1982). L'une des principales raisons qui élimine *H. niloticus* des eaux à courant moyen et rapide est son régime alimentaire microphage (Reizer, 1964).

A. gigas et *H. niloticus* sont couverts d'une mucosité abondante qui leur permet de se mouvoir dans très peu d'eau (Bard, 1973). Des Pirarucus de plus de 1,5 m de longueur ont été observés nageant dans des eaux très peu profondes de 0,5 m (Castello, 2008a). La plupart des *Arapaima* habitent les lacs et les chenaux pendant les périodes de basses eaux, de septembre à janvier (Castello & Stewart, 2010). Les eaux désoxygénées (0,4 à 4,5 mg/l) leur conviennent en raison de leur capacité à respirer l'oxygène de l'air (Adite et al., 2006 ; Arantes et al., 2013 ; Depierre & Vivien, 1977 ; Moreau, 1982). Ils sont présents aussi bien en zone pélagique que littorale. Pendant les périodes de fraie, les géniteurs fréquentent les plaines inondées. La végétation qui s'y trouve est nécessaire à leur reproduction. Les plaines inondées offrent également une variété d'aliments (Lévêque & Paugy, 1999). Les larves et les juvéniles de *H. niloticus* vivent dans les endroits marécageux parmi la végétation aquatique (Adite et al., 2006 ; Moreau, 1982).

A. gigas et *H. niloticus* ont un mode de vie pratiquement identique. Ils nagent généralement à mi profondeur. Ils réalisent des sauts importants à la surface de l'eau et se laissent tomber latéralement en faisant un bruit de battoir (Bard, 1973). *H. niloticus* peut ainsi passer d'un étang piscicole à un autre (Reizer, 1964) et ses sauts peuvent atteindre 12 m de long en cas de danger (Bard, 1973).

Grace à ses caractéristiques biologiques, *H. niloticus* a une grande capacité pour s'adapter à différents habitats (Odo et al., 2009). C'est une espèce nilo-soudanienne qui a colonisé suite à des introductions, la zone forestière guinéenne. Sa présence ne semble pas modifier l'équilibre faunique des zones colonisées (Lévêque & Paugy, 1999 ; Welcomme, 1992). *H. niloticus* peut tolérer des températures basses jusqu'à 15 °C et élevées dépassant les 35°C (Adite et al., 2006 ; Moreau, 1982).

A. gigas est un poisson inféodé aux forêts équatoriales de l'Amazonie (Bard, 1973). Il supporte des variations de température de 24 à 31°C (Bard & Imbiriba, 1986 ; Bard & Imbiriba, 1985).

3.2 Zones de distribution des *Arapaimidae*

La distribution des poissons est influencée par plusieurs facteurs du milieu : le type d'habitat, les zones climatiques, l'altitude, la végétation et les précipitations. L'histoire climatique et les évènements géologiques qui ont modelé le réseau hydrographique jouent également un rôle essentiel dans cette distribution. Ces phénomènes ont rendu possible les interconnexions entre bassins ou ont favorisé l'isolement temporaire ou définitif de certains systèmes aquatiques (Lévêque & Paugy, 2006 ; Stiassny et al., 2007).

3.2.1 Les populations de *A. gigas*

a) Populations natives

A. gigas est une espèce originaire de l'Amazonie centrale. Sa zone de distribution inclut le Brésil, le Pérou, la Colombie et le Venezuela. Sa présence est aussi signalée au Guyana sans pénétrer dans les bassin de l'Orénoque (Bard, 1973 ; Bard & Imbiriba, 1985). Il est démontré et clairement acquis que *A. gigas* n'a jamais été présent dans les eaux de Guyane (Balland & Roux, 2005) même si plusieurs communications le mentionnent. La plus grande partie de son aire naturelle se trouve en Amazonie brésilienne et péruvienne (Castello, 2008a ; Rojas Ríos, 2003). Les populations les plus abondantes se trouvent dans la rivière Solimões dans l'État d'Amazonas au Brésil (Réserve de Mamirauá). Les distributions marginales de *A. gigas* se situent :

- près d'Iquitos au Pérou ;
- dans la rivière Leticia en Colombie ;
- dans la rivière Tabatinga, à Belém à l'embouchure du fleuve Amazone, dans la région de l'Amapá au Brésil et au Guyana ;
- dans les rivières Cuyabeno, Aguarico, Napo et Tiputuini en Équateur.

Les rapides ou petites cascades du Rio Madera sont apparemment une barrière naturelle à sa dispersion plus au sud. *Arapaima* a été empêché naturellement d'atteindre les zones en amont

comme la Bolivie jusqu'à son introduction accidentelle dans les années 1970 (Miranda-Chumacero et al., 2012).

b) Populations issues des introductions

L'aire de distribution de *A. gigas* s'est étendue durant ces dernières années (Castello, 2008a ; Miranda-Chumacero et al., 2012). Des observations ont confirmé la présence du Pirarucu en dehors de sa zone de répartition géographique originelle. En 2014, *A. gigas* est observé dans le Rio Grande au Sud-est du Brésil (Carvalho et al., 2015). Des populations de *A. gigas* sont aussi signalées dans la haute région de Parnaíba au nord-est du Brésil et en amont du Rio Madera (Ramos et al., 2014). L'aire de distribution de *A. gigas* s'étend aux cours inférieurs de l'Amazonie et au bassin de l'Orénoque (Carvajal-Vallejos et al., 2011 ; Castello, 2008a ; Miranda-Chumacero et al., 2012). *Arapaima* effectue de courtes migrations saisonnières successives pour coloniser de nouveaux habitats (Castello, 2008a, 2008b). Lorsque le niveau d'eau augmente, il migre vers les plaines inondées. A travers les canaux de communication, il regagne les lacs où les eaux sont plus calmes et parfois peu profondes.

Au Brésil et au Pérou, une forte baisse des populations naturelles d'*Arapaima* est survenue en raison de la surpêche (Hrbek et al., 2007). Dans certaines régions de ces deux pays, l'espèce est localement éteinte (Castello et al., 2015). En réponse à cette extinction, des initiatives de réintroduction ont eu lieu au Pérou, lesquelles sont facilitées par le développement de la pisciculture dans l'aire de distribution originelle (Rojas Ríos, 2003). En Asie, certains pays comme la Thaïlande ont introduit l'*Arapaima* dans des lacs pour développer la pêche sportive (Ford, 2017).

Cas de l'introduction de *A. gigas* en Bolivie

Environ 1 000 alevins d'*Arapaima* provenant de populations naturelles ont été introduits en 1979 dans les lagunes Sandoval et Valencia. Ces plans d'eau font partie du bassin du Madre de Dios au Pérou. A la faveur des inondations du Madre de Dios, les eaux ont atteint les lagunes et des poissons se sont échappés et ont gagné le cours du fleuve en direction de la Bolivie où leur présence a été signalée dès 1970 dans le Beni, un fleuve situé en Bolivie qui communique avec le Madre de Dios. C'est ainsi que l'espèce est signalée pour la première fois dans les eaux boliviennes où son aire de distribution continue de s'étendre (Miranda-Chumacero et al., 2012).

Les observations de *A. gigas* dans les eaux boliviennes sont de plus en plus fréquentes. Sa présence est confirmée dans 70 points. Il est observé dans des ruisseaux, de petites rivières et des lagunes reliées aux principaux bassins fluviaux du Madre de Dios et du Beni. Les départements concernés sont le Pando avec 21 points couvrant une grande partie du département de La Paz dans sa partie extrême nord avec 44 points et le Beni dans sa partie centre-nord avec 5 points (**Figure 14**). Au Pando, *A. gigas* est observé dans les rios Tahuamanu, Orthon, Manuripi, Negro et Abuná. Dans le département de La Paz, il se trouve dans les rios Madre de Dios, Beni et Heath, ainsi que dans les rios Moa, Toromonas, Asunta, El Tigre, Madidi et Undumo. Dans le département du Beni, l'espèce se trouve près de Riberalta, en particulier dans le Florida et l'Ivón (et surtout le Yata), le lac Tumichucua et le rio Negro bolivien (Miranda-Chumacero et al., 2012).

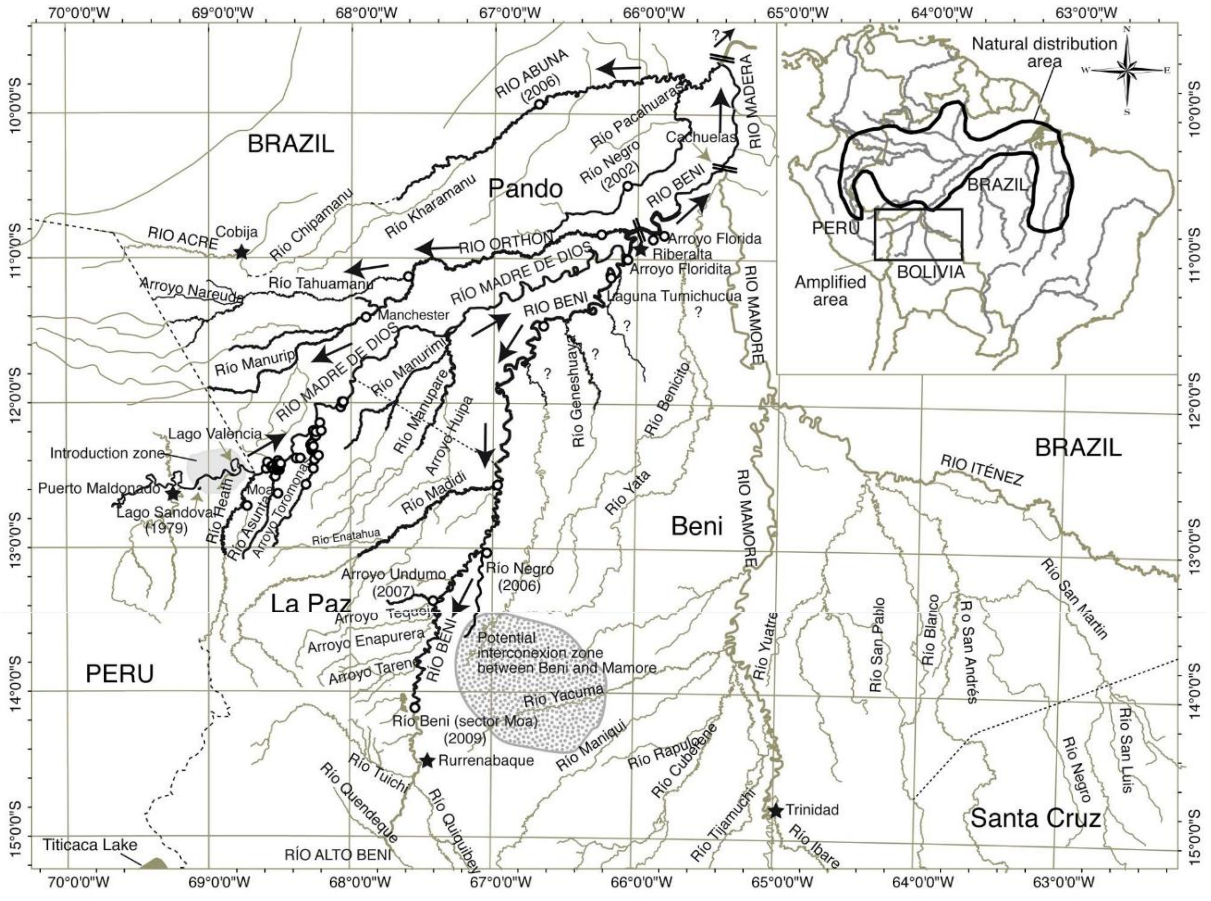


Figure 14 : Distribution géographique des populations natives et introduites de *A. gigas*
D'après Miranda-Chumacero et al. (2012).
Les flèches le long des rivières et ruisseaux indiquent la direction du mouvement de l'*Arapaima*.

La répartition géographique actuelle représente environ le quart des lacs de plaine d'inondation dans la partie inférieure de l'Amazonie bolivienne (Van Damme et al., 2015).

Les populations locales signalent que l'introduction de l'*Arapaima* a eu de graves conséquences sur l'environnement. Dans le nord de la Bolivie, cela pourrait entraîner une réduction des populations de poissons indigènes, y compris des poissons de haute valeur commerciale (Macnaughton et al., 2015).

3.2.2 Les populations de *H. niloticus*

a) Populations natives

H. niloticus est une espèce native de la province nilo-soudanienne à l'exception des sous-provinces éburnéo-ghanéenne et abyssinienne (Bard, 1973 ; Lemasson, 1957 ; Lévêque & Paugy, 2006 ; Lévêque et al., 1990 ; Moreau & Moreau, 1982 ; Reizer, 1964 ; Stiassny et al., 2007) (**Figure 15**). Les bassins hydrographiques concernés sont situés au nord de l'équateur. Ce sont :

- les cours moyens et inférieurs des grands fleuves comme le Nil, le Niger, le Sénégal, la Volta, la Gambie, le Corubal ;
- les fleuves côtiers de la Guinée Bissau, du Bénin, du Togo ;
- le lac de Guiers, le lac Tchad, le lac Turkana, le lac Omo et le lac Albert.

b) Populations issues des introductions

L'aire de distribution de *H. niloticus* s'étend désormais à d'autres provinces dont il n'est pas natif (**Figure 15**). Ce sont, le bassin du Congo (Lemasson, 1957), les sous-provinces éburnéo-ghanéenne et abyssinienne (Lévêque & Paugy, 2006), la haute et la basse Guinée (Stiassny et al., 2007).

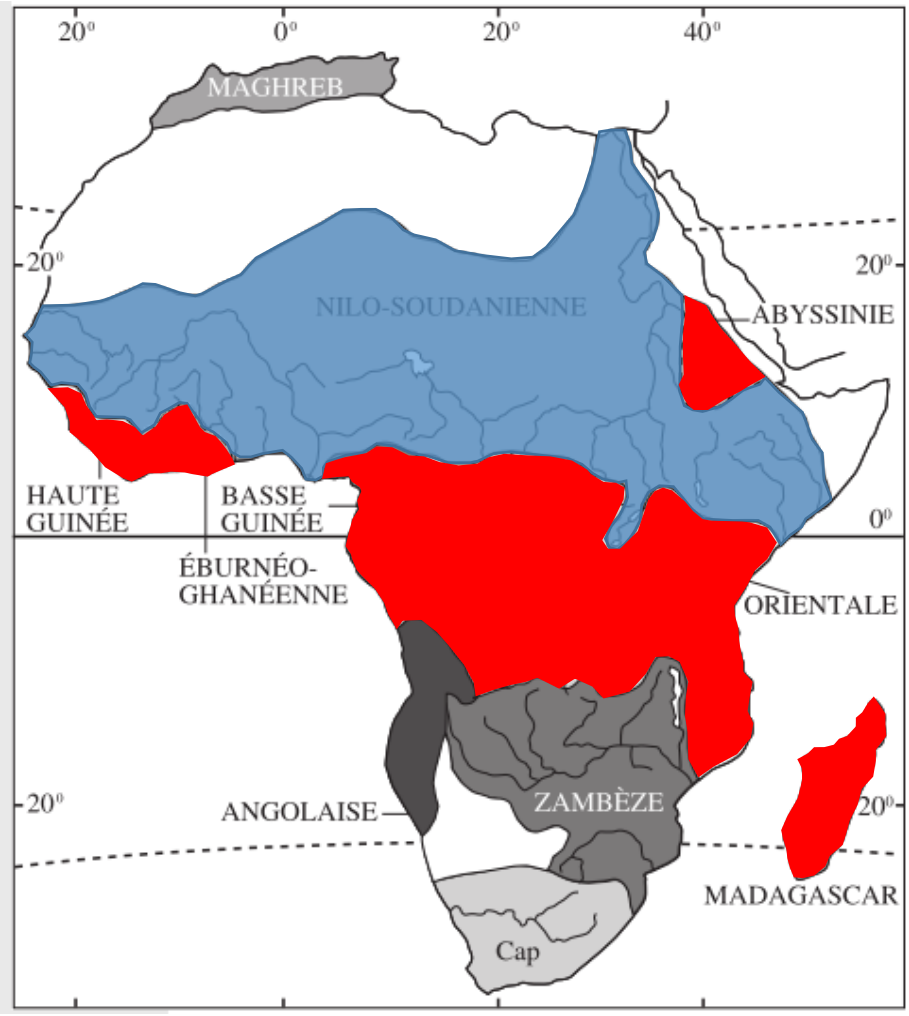


Figure 15 : Distribution géographique de *H. niloticus*.
Modifiée d'après Lévêque & Paugy (2006). En bleu : la zone de distribution native correspondant à la province ichtyologique Nilo-soudanienne sans les sous-provinces éburnéo-ghanéenne et abyssinienne, en rouge : zone de distribution après introduction. Les couleurs grises représentent les provinces ichtyologiques où la présence de *H. niloticus* n'est pas signalée, les traits noirs à l'intérieur de chaque zone coloriée représentent les cours d'eau principaux.

En raison de son intérêt économique et de ses performances zootechniques, *H. niloticus* a été introduit dans plusieurs stations piscicoles (**Tableau 2**) en Côte d'Ivoire, au Gabon, en Centrafrique, au Congo, au Cameroun, à Madagascar, en République Démocratique du Congo (Moreau & Moreau, 1982). Les premiers essais d'introduction d'*Heterotis* ont eu lieu à Bangui en Centrafrique en 1955 avec 37 alevins (Tillon, 1959). Dans les pays de son aire d'origine, *H. niloticus* a fait l'objet d'introductions et de réintroductions (Stiassny et al., 2007). L'espèce

s'adapte aux différents milieux dans lesquels ils ont été introduits et son élevage en étang connait un succès réel. Finalement, il sert à l'empoissonnement des cours d'eaux naturels et artificiels pour développer les activités halieutiques (Lazard, 1990 ; Moreau, 1982). De façon accidentelle, il s'est échappé des étangs piscicoles pour se répandre dans des cours d'eau dont il était absent (Basin du Nyong, Cross, Sanaga, Ogoué, Oubangui, Kasaï et du Congo), entrainant l'expansion de son aire d'introduction (Bard, 1973 ; Depierre & Vivien, 1977 ; Moreau, 1982 ; Moreau et al., 1995 ; Stiassny et al., 2007).

Tableau 2 : Quelques introductions de *H. niloticus* dans les pays africains.

Pays d'origine	Lieu d'introduction	Date	Références
Cameroun	Madagascar	1964	(Moreau, 1982)
Lac Tchad	Centrafrique (pisciculture et fleuve Obangui)	1955	(Tillon, 1959)
Nord du Cameroun	Sud Cameroun (Nyong)	1958 1962	(Depierre & Vivien, 1977 ; Moreau, 1982)
Yaoundé (Cameroun)	Côte d'Ivoire (Station recherche Bouaké)	1957 1959	(Lazard, 1990) (Reizer, 1964)
Bérégadougou (Burkina Faso)	Côte d'Ivoire (Station recherche Bouaké)	1960	(Reizer, 1964)
Côte d'Ivoire (Station recherche Bouaké)	Côte d'Ivoire (Lac Ayamé, Kossou)	1962 1971	(Moreau, 1982)
	Côte d'Ivoire (Lac de Buyo)	1980	(Lazard, 1990)
Cameroun	Nigeria (Cross river)	-	(Ezekiel & Abowei, 2013)
Congo	République démocratique du Congo (fleuve Congo et lac Toumba)	1966 à 1969	(Moreau, 1982)
Soudan	République démocratique du Congo	1960	(Stiassny et al., 2007)

La présence de *H. niloticus* en zone forestière a été rendue possible par l'intervention de l'homme. La communication des cours d'eau en période de crue permet à cette espèce de coloniser les espaces où sa présence n'avait pas été signalée et où il n'y a pas eu d'introduction par l'homme. Ce poisson se laisse entrainer par le courant. Il n'y aurait pas eu d'impacts signalés sur la faune autochtone du fait de l'introduction de *H. niloticus* (Lévêque & Paugy, 1999 ; Welcomme, 1992).

En considérant les zones d'introduction et natives, *H. niloticus* fait désormais partie de l'ichtyofaune de 26 pays africains.

Cas de l'introduction de *H niloticus* en Côte d'Ivoire,

Le réseau hydrographique (**Figure 16**) de la Côte d'ivoire (DCH, 1979 ; Girard et al., 1970) comprend :

- quatre bassins principaux : le Cavally, le Sassandra, le Bandama et la Comoé ;
- des petits fleuves côtiers : le Tabou, le San Pedro, le Niouniourou, le Boubo ; l'Agnéby, la Mé, et la Bia ;
- des affluents du Niger : le Baoulé, la Bagoé et le Gbanhala ;
- un affluent de la Volta noire : le Koulda.

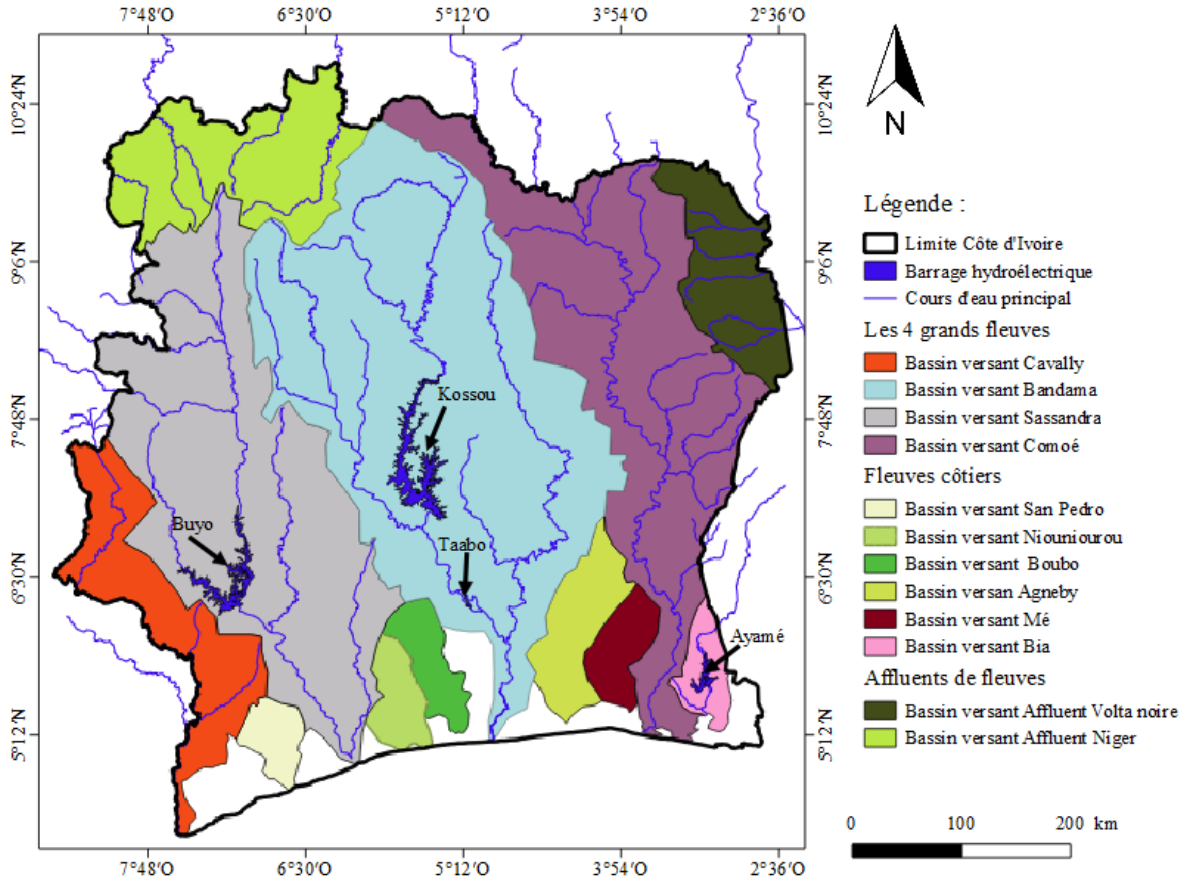


Figure 16 : Bassins versants des cours d'eau principaux de la Côte d'Ivoire.

Malgré l'inclusion d'une partie des bassins versants de cours d'eau où *H. niloticus* est natif, cette espèce est initialement méconnue du bassin hydrographique de la Côte d'Ivoire (Gourène et al., 1995).

H. niloticus a été introduit pour la première fois en Côte d'Ivoire entre 1957 et 1959. Des alevins provenant d'une pisciculture de Yaoundé au Cameroun sont mis à l'essai à la station de recherche piscicole de Bouaké, une ville située au centre de la Côte d'Ivoire (Lazard, 1990 ; Reizer, 1964). En 1960. L'effectif de *H. niloticus* de la station est ensuite renforcé avec des alevins provenant du Burkina Faso, précisément de la localité de Bérégadougou (Reizer, 1964). Des reproductions ont été enregistrées. Les alevins obtenus ont servi à enrichir la faune de certains lacs et cours d'eau environnants. C'est ainsi qu'est intervenu l'empoissonnement du lac d'Ayamé (sur le fleuve Bia) de 1962 à 1965 et celui de Kossou (sur le fleuve Bandama) de 1971 à 1972 (Bernacsek & Powles, 1992 ; Doudet, 1979 ; Moreau, 1982). En 1980, le lac de Buyo (sur le fleuve Sassandra) enregistre à son tour un empoissonnement avec *H. niloticus* (Lazard, 1990).

A partir de 1985, *H. niloticus* est introduit dans des barrages agropastoraux (Sambakaha, Gboyo, Korokara et Kiémou) construits sur des affluents secondaires du fleuve Bandama au nord de la Côte d'Ivoire dans les départements de Korhogo et Ferkessédougou (Da Costa et al., 1998 ; Tito De Morais et al., 2007).

Aujourd'hui *H. niloticus* est pratiquement présent dans tous les bassins versants de la Côte d'Ivoire. Il fait même partie des principales espèces pêchées (Da Costa et al., 2000 ; Kouakou et al., 2016 ; Tah et al., 2009).

La pisciculture de *H. niloticus* s'est aussi développée en Côte d'Ivoire. Elle est pratiquée dans des étangs ou dans de petits barrages (Kimou et al., 2016).

3.3. Génétique des populations de *A. gigas* et *H. niloticus*

3.3.1 Génétique des populations et reproduction des espèces

La génétique des populations est une discipline scientifique qui étudie les différentes forces (mutations, sélection, dérive et migration) agissant sur les changements évolutifs des espèces et de leurs populations. C'est une discipline transversale entre écologie, systématique, histoire naturelle, conservation, biologie évolutive, amélioration agronomique (horticulture, sylviculture, pisciculture, élevage) (Hartl & Clark, 2007).

Plusieurs études ont permis de déterminer la structure génétique des populations de nombreuses espèces de poissons qu'elles soient à l'état sauvage ou issues d'élevage (An et al., 2010 ; de Oliveira et al., 2017 ; Santos et al., 2014 ; Sánchez et al., remer, 2012 ; Shen et al., 2009). La connaissance de cette variabilité génétique oriente le choix des reproducteurs. Pour faire face aux problèmes de consanguinité, des pratiques, consistant à capturer des poissons à l'état sauvage, généralement contenus dans des cours d'eau avoisinantes, pour les utiliser comme reproducteurs dans les fermes aquacoles, sont mises en œuvre pour maintenir la diversité génétique (de Oliveira et al., 2017).

3.3.2 Les différents types de marqueurs pour l'étude de la génétique des populations

Les cellules des eucaryotes contiennent plusieurs génomes : non seulement le génome nucléaire, mais également des génomes plus petits, dans les chloroplastes pour les plantes et les mitochondries pour les plantes et les animaux (Birky et al., 1983 ; Boursot & Bonhomme, 1986). Il existe une large gamme de marqueurs moléculaires au sein de ces génomes qui peuvent être utilisés pour étudier la structure génétique des populations (Castellanos-Gell, 2012). Les marqueurs génétiques peuvent fournir des preuves solides que les populations sont fermées ou ouvertes parce que la différenciation génétique est très sensible à la migration. Cependant, les inférences fondées sur des données génétiques doivent nécessairement être basées sur des modèles qui supposent l'hérédité, la variabilité, la neutralité versus la valeur sélective des marqueurs et l'équilibre entre la dérive génétique, la migration et la mutation pour différencier les populations et les individus (Hellberg et al., 2002).

a) L'ADN Mitochondrial

Plusieurs études se sont focalisées sur l'analyse de l'ADN mitochondrial (ADNmt) exclusivement ou associée à d'autres marqueurs moléculaires (Avise et al., 2008 ; Castellanos-Gell, 2012 ; Honeycutt et al., 2012 ; Papetti et al., 2007 ; Sekino et al., 2002 ; Vigilant et al., 1989 ; Yue et al., 2006).

L'ADNmt joue un rôle essentiel en écologie moléculaire et en reconstruction phylogénétique des espèces animales (Hrbek & Farias, 2008). Il a permis depuis plusieurs années, de retracer l'histoire évolutive et démographique des populations et des espèces (Baillard & Whitlock, 2004).

Le taux de mutations de l'ADNmt est supérieur à celui observé au niveau de l'ADN nucléaire (Birky et al., 1983 ; Birky et al., 1989 ; Boursot & Bonhomme, 1986). Mais le rapport entre la variation de l'un et l'autre n'est pas constant et dépend des gènes étudiés (Baillard & Whitlock, 2004).

L'intérêt de l'ADNmt repose sur sa taille de population efficace qui est quatre fois plus petite que celle de l'ADN nucléaire dans une population de sexe ratio 1 :1 (Hartl & Clark, 2007). Cette taille représente le nombre d'individus d'une population idéale pour lequel on aurait une fluctuation du polymorphisme ou un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population effective (Boursot & Bonhomme, 1986 ; Hare et al., 2011). Ainsi, dans une population donnée, la dérive pouvant conduire à la fixation d'un nouvel allèle va être 4 fois plus rapide pour le génome mitochondrial que pour le génome nucléaire.

Le temps requis pour que tous les allèles, sauf un (qui est fixé), soient perdus à cause d'une dérive est en effet inversement proportionnel à la taille de population efficace. Reconnu pour son absence de recombinaison chez la grande majorité des espèces, l'ADNmt d'une espèce de moule a montré que ce marqueur moléculaire peut parfois se recombiner (Ladoukakis & Zouros, 2001). Les avantages, les limites et les causes du taux d'évolution élevé de l'ADNmt sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Quelques caractéristiques de l'ADN mitochondrial.

Avantages (Boursot & Bonhomme, 1986 ; Castellanos-Gell, 2012)	- Molécule à hérédité maternelle : possibilité de suivre les lignées maternelles au cours du temps - Présent dans la cellule en copies multiples : possibilité de travailler avec du matériel dégradé. - Evolution relativement rapide de la séquence : justification de son utilisation à l'échelle micro évolutive - Homoplasmie (un seul haplotype par individu bien que l'hétéroplasmie puisse exister) - Molécule haploïde avec absence de recombinaison
Limites (Avise, 2010 ; Baillard & Whitlock, 2004 ; Castellanos-Gell, 2012)	- L'absence de recombinaison implique que toute la molécule à la même histoire : la généalogie construite à partir de l'ADNmt pouvant ne pas refléter la totalité de l'histoire de l'espèce - L'hérédité maternelle implique une information limitée lorsque la dispersion est liée au sexe - L'emploi de la coalescence a montré l'importance de l'associer à d'autres marqueurs moléculaires
Causes du taux d'évolution élevé (Avise, 2009)	- Mécanismes relativement inefficaces de réparation de l'ADN - Molécules d'ADNmt exposé à un environnement riche en oxygène - ADNmt nu et non associé à des protéines histones

Le génome mitochondrial des animaux est formé par une petite molécule unique d'ADN circulaire double brin dont le brin H est externe et le brin L se situe à l'intérieur (Boursot & Bonhomme, 1986 ; Hrbek & Farias, 2008). L'ordre des gènes représentés sur la **Figure 1**7 est le plus fréquent chez tous les téléostéens (Dettai et al., 2012 ; Hrbek & Farias, 2008 ; Pereira, 2000). Il peut y avoir plusieurs milliers de mitochondries dans une seule cellule (Dettai et al., 2012). Sa taille varie entre 8 et 40 kb chez les eucaryotes (Hellberg et al., 2002). Chez les vertébrés, il se situe dans une gamme assez étroite : 16-20 kb (Avise et al., 1987). Le génome mitochondrial des vertébrés code pour 37 gènes dont 24 assurent le système traductionnel de la molécule elle-même (pour 22 ARNt et 2 ARNr). Les 13 autres gènes codent pour des sous-unités de la chaîne de transport d'électrons où les glucides et les graisses sont oxydés pour générer du dioxyde de carbone, de l'eau et de l'ATP (Baillard & Whitlock, 2004).

Le génome mitochondrial est composé d'une mosaïque de sections (**Tableau 4** et **Figure 17**) très conservées et très variables chez plusieurs espèces animales (Aquadro & Greenberg, 1983 ; Boursot & Bonhomme, 1986 ; Honeycutt et al., 1995 ; Hrbek & Farias, 2008 ; Pereira, 2000). A raison de pressions sélectives plus faibles, quelques positions dans la séquence de l'ADNmt sont susceptibles d'évoluer plus que d'autres (Honeycutt et al., 1995). Cette caractéristique facilite grandement le choix de régions génomiques informatives appropriées pour des questions particulières.

Tableau 4 : Organisation des gènes du génome mitochondrial de *A. gigas*.

Gene/élément	Brin	Position	Taill	Début	Fin
trnF	H	1..68	69	-	-
rrnS	H	69..1022	954	-	-
trnV	H	1023..1093	71	-	-
rrnL	H	1094..2779	168	-	-
trnL (TAA)	H	2780..2853	74	-	-
nad1	H	2858..3829	972	ATG	TA
trnI	H	3831..3902	72	-	-
trnQ	L	3903..3972	70	-	-
trnM	H	3972..4040	69	-	-
nad2	H	4041..5085	104	ATG	T*
trnW	H	5086..5154	69	-	-
trnA	L	5156..5224	69	-	-
trnN	L	5226..5298	73	-	-
OL	L	5299..5334	36	-	-
trnC	L	5335..5401	67	-	-
trnY	L	5402..5472	71	-	-
cox1	H	5474..7030	155	GTG	AG
trnS (TGA)	L	7026..7097	72	-	-
trnD	H	7101..7172	72	-	-
cox2	H	7177..7867	691	ATG	T*
trnK	H	7868..7941	74	-	-
atp8	H	7943..8110	168	ATG	TA
atp6	H	8101..8784	684	ATG	TA
cox3	H	8784..9568	785	ATG	T*
trnG	H	9569..9639	71	-	-
nad3	H	9640..9988	349	ATG	T*
trnR	H	9989..10058	70	-	-
nad4L	H	10059..10355	297	ATG	TA
nad4	H	10349..11738	139	ATG	T*
trnH	H	11739..11807	69	-	-
trnS (GCT)	H	11808..11875	68	-	-
trnL (TAG)	H	11876..11948	73	-	-
nad5	H	11949..13790	184	ATG	TA
nad6	L	13787..14317	531	ATG	TA
trnE	L	14318..14385	68	-	-
cob	H	14390..15530	114	ATG	T*
trnT	H	15531..15602	72	-	-
trnP	L	15603..15666	64	-	-
OH (control région)	H	15667..16433	767	-	-

D'après Hrbek & Farias (2008).

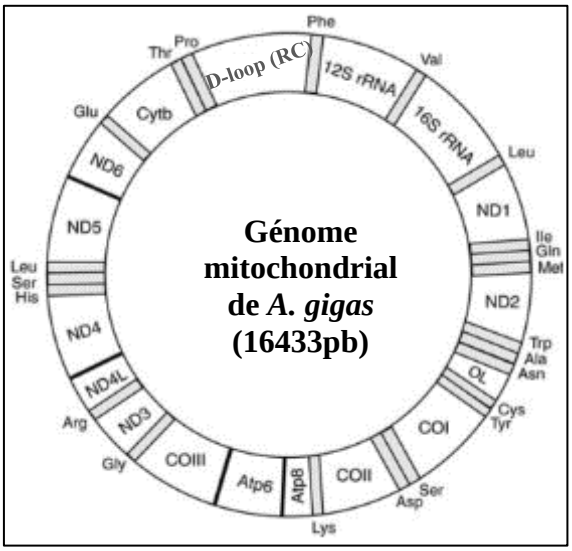


Figure 17 : Carte du génome mitochondrial de *A. gigas* (Hrbek & Farias, 2008).

Diverses parties du génome mitochondrial sont employées pour comprendre l'histoire et la démographie des espèces vivantes ainsi que pour la conception d'amorces (Hrbek & Farias, 2008).

L'ADNmt contient une région dite de contrôle (non codante) d'environ 0,8 kb appelée D-loop chez les vertébrés (Avise et al., 1987). Elle est située entre les gènes ARNt-Pro et ARNt-Phe (Hrbek & Farias, 2008). Cette région régule les processus de réplication et de transcription de l'ADNmt (Avise et al., 1987 ; Chang & Clayton, 1986). Elle est particulièrement utile pour les analyses phylogéographiques à des échelles évolutives de quelques milliers ou quelques dizaines de milliers d'années (Ward et al., 1993). Le rôle fonctionnel réduit, et donc les faibles pressions sélectives sur cette séquence, font que quelques fragments de cette séquence évoluent plus vite que la moyenne de la molécule. Ils présentent alors un rythme exceptionnellement rapide de substitutions nucléotidiques et un niveau élevé de polymorphisme intraspécifique (Mcmillan & Palumbi, 1997 ; Pomacentridae et al., 2004). Certains auteurs (Aquadro & Greenberg, 1983 ; Vigilant et al., 1989) suggèrent que le rythme de l'horloge moléculaire de l'ensemble de la région de contrôle peut être de trois à cinq fois plus grand que celui du reste du génome mitochondrial. Néanmoins, même à l'intérieur de cette région quelque espèces de vertébrés ont montré une variabilité faible, voire nulle (Baker et al., 1994 ; Walker et al., 1998). Des petits fragments non codants sont aussi présents dans l'ADNmt. Leur rôle régulateur n'est pas clairement compris (Boore, 1999).

b) ADN microsatellites

A l'instar de l'ADNmt, les microsatellites ont été beaucoup utilisés dans les études d'écologie moléculaire et de génétique des populations (Duvernell et al., 2008 ; Edwards et al., 2008 ; Godinho et al., 2008 ; Schiffer et al., 2007 ; Schultz et al., 2008 ; Väli et al., 2008).

Les microsatellites sont des séquences d'ADN polymorphes contenant des répétitions en tandem de motifs nucléotidiques (DeWoody & Avise, 2000) de 2 à 10 paires de bases (Hellberg et al., 2002 ; Treangen & Salzberg, 2013). Selon la longueur de la base répétée, on parle de microsatellites mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa- nucléotides. La structure des répétitions permet de distinguer trois types de microsatellites : (i) ceux qui contiennent un seul type d'unité répétée, (ii) ceux qui sont constitués d'au moins deux unités répétées différentes et (iii) ceux qui contiennent plusieurs interruptions à l'intérieur de la séquence (Urquhart et al., 1994). On les classe alors respectivement comme microsatellites "parfaits", "composés" et "imparfaits".

Les microsatellites se rencontrent de manière abondante dans tout l'organisme des procaryotes et des eucaryotes (Treangen & Salzberg, 2013). Chez le nématode *Pristionchus pacificus*, ils

peuvent représenter jusqu'à 3,83% de tout le génome (Molnar et al., 2012). La plupart des microsatellites sont situés dans les régions non codantes (introns) (Li et al., 2017) avec toutefois une localisation possible dans les régions codantes. Chez l'anguille des marais (*Monopterus albus*), 1% des microsatellites sont localisés dans les régions codantes (exons) (Li et al., 2017). Les microsatellites ont un taux élevé de mutation spontanée qui chez l'homme est en moyenne de $1,2x10^{-3}$ par locus, par gamète et par génération (Weber & Wong, 1993). Ils constituent une source importante de polymorphisme génétique (DeWoody & Avise, 2000 ; Kashi et al., 1997).

En génétique des populations, la plupart des microsatellites sont considérés comme des fragments d'ADN où les mutations sont neutres (Watkins, 2007). Ces marqueurs moléculaires peuvent être des éléments codants et de régulation de l'expression de gènes (Koshi & King, 2006).

De nombreux facteurs agissent sur la dynamique évolutive des microsatellites. Il s'agit entre autres du nombre de répétitions, la séquence du motif répété, la longueur de l'unité répétée, les séquences flanquantes, la présence d'imperfections, le taux de recombinaison et de transcription, l'efficacité du système de réparation et l'âge des individus (Castellanos-Gell, 2012).

Les microsatellites sont de petits fragments d'ADN qui s'amplifient facilement par PCR. Leur abondance, leur co-dominance, leur polymorphisme élevé et généralement neutre sont autant d'atouts qui justifient sa grande utilisation dans les études de génétique des populations. Ils jouent un rôle essentiel dans la reconstitution de l'histoire des migrations et de l'évolution des espèces. Ils permettent d'évaluer la diversité biologique à différents niveaux d'organisation (Edwards et al., 1992). Ces marqueurs moléculaires ont montré leur efficacité dans la détermination de la capacité dispersive des espèces à divers échelles géographiques (Araripe et al., 2013). Ils sont relativement faciles à développer et peuvent être analysés pour un coût modéré (Castellanos-Gell, 2012). Malgré le nombre élevé de microsatellites dans l'organisme, il a été montré que des individus peuvent être correctement identifiés avec huit loci et que la structure principale d'une population est visible avec deux loci hautement polymorphes (Arthofer et al., 2018).

3.3.3 Structure génétique et conservation des populations de *H. niloticus* et de *A. gigas*

Les génomes mitochondriaux de la plupart des espèces d'Ostéoglossiformes sont complètement séquencés (Hrbek & Farias, 2008 ; Lavoué et al., 2011 ; Yue et al., 2006). Le génome mitochondrial complet de *A. gigas* est composé de 16 433 pb (GenBank EF523611) et celui de *H. niloticus* compte 16 551 pb (Genbank AP009498). Récemment, le génome complet de *A. gigas* a été séquencé (Vialle et al., 2018). Le séquençage de ces génomes ouvre la voie aux études moléculaires des populations de *A. gigas* et de *H. niloticus* (Hrbek & Farias, 2008 ; Vialle et al., 2018). La carte du génome mitochondrial d'*Arapaima* est présentée dans la **Figure 17** selon Hrbek et Farias (2008).

L'une des rares études ciblant la génétique des populations naturelles de *H. niloticus* a été réalisée au Bénin (Hurtado et al., 2013). Huit microsatellites ont été utilisés. Des différenciations génétiques marquées ont pu être observées entre populations de différents bassins. Les obstacles à la dispersion semblent avoir isolé efficacement les populations de *H. niloticus* entre les trois bassins étudiés. Les cours d'eau qui communiquent lors des périodes de crue, ont présenté de faible différenciation génétique entre leurs populations. L'inondation semble donc faciliter le flux génétique entre les cours d'eau (Hurtado et al., 2013).

Contrairement à *H. niloticus*, la génétique des populations de *A. gigas* a fait l'objet de plusieurs études dans une grande partie de son aire de distribution. Des marqueurs microsatellites et mitochondriaux ont été utilisés séparément ou les deux de façon associée (Garcia-Davila et al., 2011 ; Hrbek et al., 2007, 2005 ; Santos et al., 2014 ; Vitorino et al., 2015). Les premières études de génétique des populations d'*Arapaima* ont été réalisées entre Iquitos (Pérou) et l'Etat du Macapà (Brésil) à partir de marqueurs mitochondriaux (ATPase et NADH). Sur un échantillon de 139 individus, 34 haplotypes des deux marqueurs concaténés séparés par 44 sites de ségrégation ont été identifiés et la variabilité génétique des populations semble être attribuée à des facteurs anthropogéniques comme la surexploitation (Hrbek et al., 2005). Une étude, qui utilise des marqueurs microsatellites (Araripe et al., 2013), a montré un isolement génétique par la distance : plus les populations d'*Arapaima* sont éloignées, plus la différenciation génétique est grande entre elles. Le flux génétique entre populations séparées par de petites distances est donc important. Un système de génotypage multiplex de marqueurs microsatellites a permis d'étudier la variabilité génétique des populations naturelles

d'*Arapaima* dans la basse Amazonie dans le lac Sauaçu au Brésil. Une valeur d'hétérozygotie élevée (0,69) a été obtenue avec le nombre d'allèles par locus allant de 4 (AgCTm5) à 13 (AgCAm2). La moyenne est de 8 allèles. Aucun des loci n'a présenté d'écarts significatifs à l'équilibre Hardy-Weiberg. Il n'y avait aucune paire de loci avec un déséquilibre de liaison significatif (Hamoy et al., 2008). A partir de 19 microsatellites, la variabilité génétique de populations sauvages et d'élevage d'*Arapaima* du Brésil révèle 146 allèles avec une moyenne de 7,68 allèles par locus et les populations sauvages présentent une plus grande diversité génétiques que les populations en captivité (Santos et al., 2014).

4 L'organisation séquentielle et les principales étapes du cycle de reproduction des *Arapaimidae*

4.1 Maturité sexuelle

4.1.1 Stades de maturation des gonades

Les stades de maturation des gonades chez les *Arapaimidae* sont similaires à celles des autres téléostéens (Moreau, 1982 ; Núñez & Duponchelle, 2009). L'indice gonado-somatique (IGS) est souvent utilisé pour estimer la saison de reproduction des poissons. Il ne convient pas pour des reproducteurs multiples comme *A. gigas* et *H. niloticus* (Núñez & Duponchelle, 2009).

L'évolution de la gamétogenèse est cyclique chez les deux sexes (Moreau & Moreau, 1982 ; Núñez & Duponchelle, 2009) mais avec une période de reproduction assez étendue. La période de repos sexuel est caractérisée par la réduction importante du volume des gonades. Chez *H. niloticus*, la période de repos sexuel peut durer 4 mois. La spermiation et l'oviposition ne sont généralement possibles que 4 mois dans l'année (Moreau & Moreau, 1982).

a) Chez la femelle : l'ovogenèse

En fonction de leurs stratégies de ponte, les femelles de poisson sont classées en reproducteurs uniques annuels (exemple, certaines espèces Amazoniennes comme *Pseudoplatystoma*, *Colossoma*, *Piaractus*) ou en reproducteurs annuels multiples (comme dans le cas de *Pygocentrus*, *Cichla*, *Arapaima*, *Osteoglossum*, *Heterotis*) (Núñez & Duponchelle, 2009).

Chez *A. gigas* et *H. niloticus*, les dynamiques ovariennes comportent cinq stades numérotés de 1 à 5 (**Tableau 5** et **Figure 18**) (Adite et al., 2006 ; Núñez & Duponchelle, 2009). Le développement des ovocytes comprend quatre stades numérotés de I à IV (**Figure 18**) (Núñez & Duponchelle, 2009). Les individus, n'ayant pas encore atteint l'âge de la première maturité sexuelle, ont des ovaires immatures (stade 1) contenant uniquement des ovogonies qui évoluent en ovocytes en prévitellogenèse (stade I) au moment de la première maturité sexuelle. Par la suite, les ovaires passent successivement par différents stades de maturation : stades 2, 3 et 4

correspondant respectivement à des ovocytes en début de vitellogenèse (stade II), en vitellogenèse avancée (stade III) et en fin de vitellogenèse prêt à être expulsés (stade IV). Les ovocytes en prévitellogenèse sont présents à tous les stades ovariens. On a un développement synchrone de lots d'ovocytes chez des femelles matures (Moreau & Moreau, 1982 ; Núñez & Duponchelle, 2009). Après la période de fraie, les ovaires deviennent flasques (stade 5) et contiennent encore des ovocytes aux stades II et III. Le passage des ovaires du stade 5 au stade 2 marque le début d'un nouveau cycle de reproduction (Núñez & Duponchelle, 2009).

Le développement des ovocytes et la croissance ovarienne des *Arapaimidae* sont similaires à ceux des reproducteurs uniques jusqu'aux stades III et 3 (Núñez & Duponchelle, 2009).

Tableau 5 : Stades de maturation et caractéristiques morphologiques des ovaires des *Arapaimidae*.

Stade de l'ovaire	*A. gigas* (Arantes et al., 2010 ; Flores, 1980 ; Núñez & Duponchelle, 2009)	*H. niloticus* (Adite et al., 2006)
1	Petit ovaire laminaire et immature, de couleur rose, fortement attaché au péritoine, les ovocytes ne sont pas visibles ou sont vus comme de petits points blanchâtres dispersés dans l'ovaire	Ovaire immature (juvénile) de couleur rose avec des ovocytes invisibles à l'œil nu
2	Ovaire un peu plus développé que les précédents, de petits ovocytes blanchâtres occupent la totalité de la gonade, couleur rose blanchâtre ou rose pâle	Pré maturation – ovaire de couleur jaune pâle avec des ovocytes visibles à l'œil nu
3	Ovaire développé, ovocytes ronds et turgescents, vert clair dans la région postérieure et rose blanchâtre dans la partie antérieure	Maturation avancée –ovaire très développé avec des ovocytes de couleur jaune orange
4	Ovaire complètement développé, couleur vert foncé, gros ovocytes ronds et turgescents, vert foncé viables et de petits ovocytes en vitellogenèse, quelques petits ovocytes avortés jaune, rougeâtre et blanchâtre	Ovaire mature avec des œufs au stade post vitellogenèse (diamètre 2,5–3 mm) expulsables par pression abdominale
5	Ovaire flasque, sanglant, vert pâle à groseille, il y a peu d'ovocytes viables et avortés intercalés dans un nouveau lot d'ovocytes en en vitellogenèse.	Stade post fraie, l'ovaire devient flasque et ne contient presque plus d'ovocytes matures

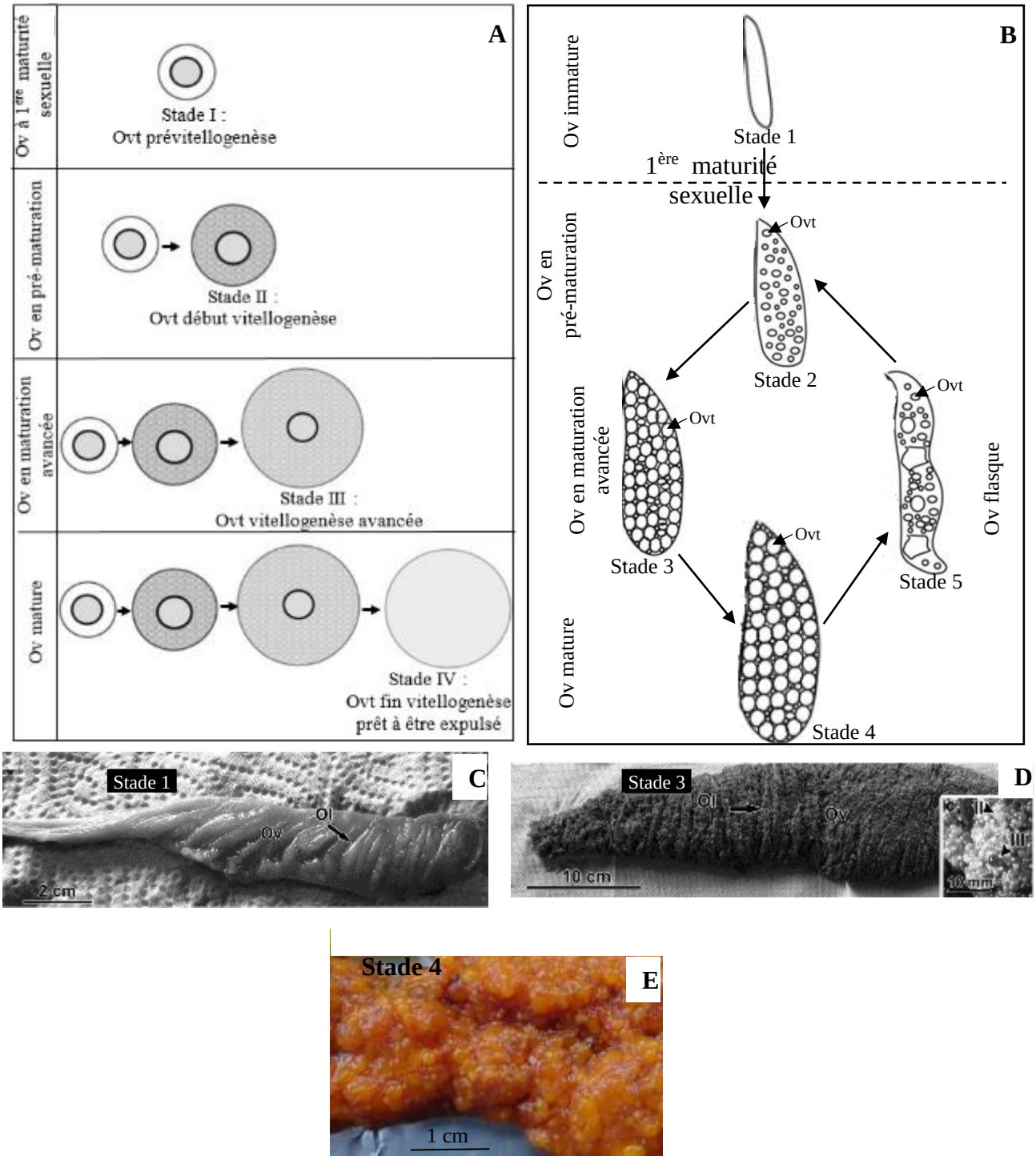


Figure 18 : Evolution de la maturation des ovaires et ovocytes des *Arapaimidae*.
Modifiée d'après Núñez & Duponchelle (2009).
Il est considéré quatre stades de développement des ovocytes (A) et cinq stades ovariens (B). Ovaire d'*Arapaima* (C et D) et d'*Heterotis* (E). Ov : ovaire, Ovt : ovocyte, Ol : lamelle ovarienne. Des ovocytes à différents stades sont présents et continuent leur processus de maturation dans l'ovaire des femelles matures (A).

b) Chez le mâle : la spermatogenèse

La spermatogenèse chez les poissons (**Figure 19**) est caractérisée par la production des spermatogonies primaires et secondaires, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes (Moreau, 1982 ; Núñez & Duponchelle, 2009 ; Schulz et al., 2010). Tous ces stades de développement (**Tableau 6**) sont présents à la fois dans le testicule de *H. niloticus* que quelques semaines par an (Moreau, 1982).

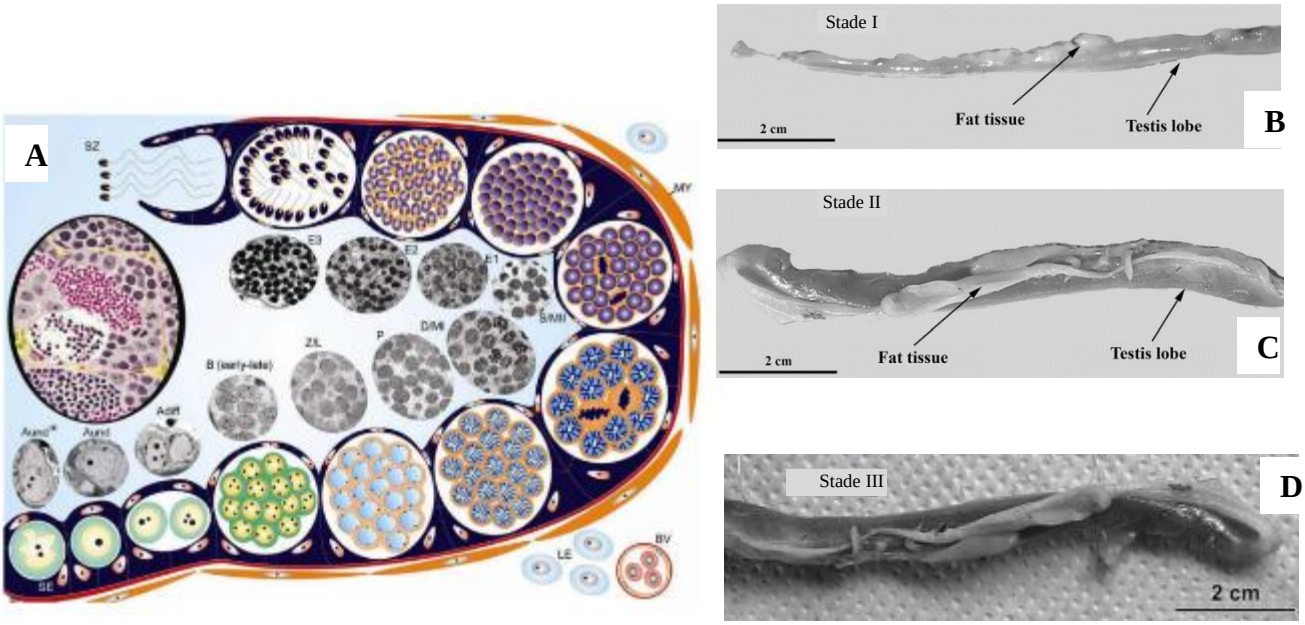


Figure 19 : Schéma d'une coupe testiculaire de poisson (A) (Schulz et al., 2010) et stades de maturation de testicule de *A. gigas* (B, C et D) (Chu-Koo et al., 2009 ; Núñez & Duponchelle, 2009).
L'épithélium germinal contient les cellules de Sertoli (SE) et les cellules germinales, délimitées par la lame basale (BL) et les cellules myoïdes péritubulaires (MY). Les cellules interstitielles de Leydig (LE) et les vaisseaux sanguins (BV) sont montrés. Spermatogonies de type A indifférenciées (Aund *, cellules souches), spermatogonies de type A indifférenciées (Aund), spermatogonies de type A différenciées (Adiff), spermatogonies de type B, spermatocytes primaires leptonique/zygotenique (L/Z), spermatocytes primaires pachyténique (P), spermatocytes diploténique /métaphase I (D/MI), spermatocytes secondaires /métaphase II (S/MII), spermatides précoces (E1), intermédiaires (E2) et finales (E3), spermatozoïdes (SZ).

Tableau 6 : Stades de maturation et caractéristiques du testicule des *Arapaimidae*.

Stade du testicule	*A. gigas* (Núñez & Duponchelle, 2009)	*H. niloticus* (Adite et al., 2006)
I	Immature : les testicules sont comme deux fils argentés ou translucides, plus minces et plus longs que les ovaires de stade 1	Immature (juvénile) : testicule non développé consistant en un filament translucide
II	Maturation : les testicules sont plus longs, plus larges, souvent de section triangulaire ou circulaire et de couleur blanche à rosée. Les adultes au repos sont généralement à ce stade	Maturation précoce : testicules de taille intermédiaire ayant une couleur jaune ou beige très claire
		Maturation avancée : grand testicule, couleur blanche opaque ou beige clair avec de nombreuses petites taches noires
III	Mûr : les testicules sont plus gros, plus pleins et complètement blancs. Sperme émis avec une légère pression sur l'abdomen	Mûr : testicules complètement développés, expulses par pression abdominale, couleur blanc laiteux
IV	Testicules encore grands comme au stade III, mais flasques et comme vides	Testicules post-fraie : flasques sans laitance

4.1.2 Taille et âge des poissons à la première maturité sexuelle

Chez *H. niloticus*, la taille de première maturité sexuelle observée chez certains poissons en Côte d'Ivoire est de 330 mm de LS chez la femelle et de 300 mm de LS chez le mâle (Kouakou et al., 2016). Au Benin, les femelles arrivent à maturité à partir de 499 mm de LS et un poids de 1,77 kg. Les mâles sexuellement matures pèsent 1,49 kg et ont 515 mm LS (Adite et al., 2006). On a également décrit des *Heterotis* ayant atteint la maturité sexuelle à un poids compris entre 0,8 et 1 kg dans la rivière Kan en Côte d'Ivoire (Moreau, 1982) et d'autres se sont reproduits pour la première fois à des poids beaucoup plus importants (4 kg) en Centrafrique (Tillon, 1959). L'acquisition de la maturité est assez longue chez certains *Heterotis* (19 à 20 mois) (Reizer, 1964; Tillon, 1959). A Madagascar, des *Heterotis* se sont reproduits pour la première fois à un âge compris entre 2 et 2,5 ans (Moreau, 1982). La maturité sexuelle semble intervenir plus tardivement en étang de pisciculture que dans le milieu naturel (Moreau, 1982). L'augmentation de la photopériode, l'installation de la saison des pluies et la diminution du pH accélèrent la maturation des gonades (Moreau, 1982).

L'âge de première maturité sexuelle chez les femelles et mâles de *A. gigas* se situe généralement à partir de 5 ans (Chu-Koo et al., 2009 ; Flores, 1980). La maturité sexuelle est précoce (à partir de 3 ans) lorsque les densités de *A. gigas* dépassent 32,3 individus/km^2. A basse densité (4,45 individus/km^2), la reproduction n'intervient pas avant 4 ou 5 ans (Arantes et al., 2010). Les poissons mâtures ont un poids supérieur à 40 kg (Bard & Imbiriba, 1986). Dans la rivière Solimoes (État d'Amazonas au Brésil), la taille de première maturité des femelles est comprise entre 157 et 164 cm LT (Arantes et al., 2010). Les femelles d'*Arapaima* dans le bassin de la rivière Tocantins au Brésil ont atteint la maturité sexuelle pour une taille plus faible (145-154 cm LS). Les mâles de cette population ont acquis la maturité à des tailles réduites, 115 à 124 cm LS (Godinho et al., 2005). Des tailles plus importantes ont été enregistrées chez les femelles à la réserve de Pacaya Samira au Pérou; 160 à 170 cm LS pour la première maturation sexuelle et 180 à 190 cm LS pour la taille de la première fraie (Flores, 1980).

Un résumé de la taille minimale de première maturité sexuelle des *Arapaimidae* est présenté dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Taille minimale de première maturité sexuelle des *Arapaimidae* suivant la longueur standard (LS), l'âge ou le poids.

Espèce	Sexe	LS (cm)	Age (mois)	Poids (kg)
A. gigas	Mâle	115	36	40
	Femelle	145		
H. niloticus	Mâle	30	19	0,8
	Femelle	33		

D'après Bard & Imbiriba (1986) ; Godinho et al. (2008) ; Kouakou et al. (2016) ; Moreau (1982) ; Reizer (1964).

4.2 Période de reproduction et formation des couples

En milieu naturel et en étang de pisciculture, la période de reproduction des *Arapaimidae* se situe généralement pendant les périodes de crue où les pluies sont abondantes (Depierre & Vivien, 1977 ; Nuñez et al., 2011 ; Reizer, 1964). Face aux effets du changement climatique

qui entraine des variations saisonnières, les périodes de reproduction sont susceptibles de varier d'une année à l'autre (Meisner & Shuter, 1992).

Les périodes de reproduction de *H. niloticus* (**Tableau 8**) ont été déterminées à partir de l'analyse de l'IGS (Adite et al., 2006 ; Kouakou et al., 2016) ou sur la base d'observations directes (Depierre & Vivien, 1977 ; Moreau, 1982 ; Tillon, 1959). La saison de reproduction dure environ de 4 à 5 mois (Moreau, 1982).

Tableau 8 : Période de reproduction de *H. niloticus* dans différentes régions de l'Afrique

Pays	Période de reproduction	Références
Centrafrique (Pisciculture)	Mai à Septembre	(Tillon, 1959)
Côte d'Ivoire (Fleuve Agnéby)	Juin à Août Novembre à Décembre	(Kouakou et al., 2016)
Bénin (Rivière Sô)	Mai à Août	(Adite et al., 2006)
Cameroun (Fleuve Nyong)	Avril à Juin Septembre à Octobre	(Depierre & Vivien, 1977)

Chez *Arapaima*, les reproductions continues sont observées en captivité avec une saisonnalité bien marquée (Flores, 1980 ; Nuñez et al., 2011). Dans le milieu naturel, la reproduction se produit essentiellement pendant la saison des pluies, à la photopériode la plus courte et à une température élevée. Au Pérou, un même couple de *A. gigas* s'est reproduit plusieurs fois au cours d'une année entre septembre et avril avec un maximum de décembre à avril au cœur de la saison des pluies. En saison sèche, les conditions environnementales sont favorables mais pas optimales à la survie des larves et des alevins. Une faible activité reproductive est observée d'avril à septembre où la photopériode est plus longue et la température plus basse (Nuñez et al., 2011).

Les *Arapaimidae* sont considérés depuis longtemps comme une famille monogame qui forme des couples stables en période de reproduction (Castello & Stewart, 2010 ; Chu-Koo et al., 2009 ; Moreau, 1982 ; Nuñez et al., 2011 ; Reizer, 1964 ; Tillon, 1959). Les mouvements des couples formés sont généralement synchronisés et on observe une absence de parade nuptiale avant l'accouplement (Reizer, 1964 ; Valladão et al., 2016). La possibilité de sexer *Arapaima* à partir d'un kit, mis au point sur la base de la détection de vitellogénine plasmatique (Chu-Koo et al., 2009 ; Nuñez et al., 2011), permet d'isoler des couples dans de grands bassins

(>1000 m^2) pour assurer naturellement la reproduction en captivité (Marre, 2011). L'absence de méthode de sexage fiable chez *H. niloticus* amène les pisciculteurs à utiliser un grand nombre de poissons matures dans les étangs de reproduction (Tillon, 1959). Trois cas de figure se présentent dans ces conditions pendant la période de reproduction : (i) tous les individus se reproduisent (Tillon, 1959), ce cas est rarement observé, (ii) aucune reproduction ne se produit, ce cas a été signalé par des pisciculteurs au centre-ouest de la Côte d'Ivoire ou (iii) certains poissons s'accouplent et d'autres qui n'ont pu s'accoupler restent isolés (Reizer, 1964).

Il n'est pas exclu que les femelles de *A. gigas* soient polyandres (Dabbadie, 2002) puisque des tests de paternité réalisés à partir de marqueurs microsatellites sur des alevins produits par une femelle au cours d'une ponte ont révélé la présence d'allèles ne provenant pas uniquement du couple formé (Farias et al., 2015). Ces allèles supplémentaires sont non compatibles avec la monogamie chez cette espèce.

4.3 Construction ou réaménagement de nid

Arapaima et *Heterotis* ne sont pas des incubateurs buccaux contrairement aux autres espèces d'Ostéoglossiformes. Ils gardent leurs œufs dans un nid (Adite et al., 2006 ; IRD, 2008 ; Lévêque & Paugy, 1999 ; Rojas, 2005) dont la construction est annonciatrice d'une reproduction prochaine (Moreau & Moreau, 1982). Toutefois, pour des raisons inconnues, les œufs sont parfois portés à la bouche par des femelles de *H. niloticus* (**Figure 20**). Ces observations ont été faites chez plusieurs femelles d'*Heterotis* dans deux fermes piscicoles du centre et du centre-ouest de la Côte d'Ivoire.

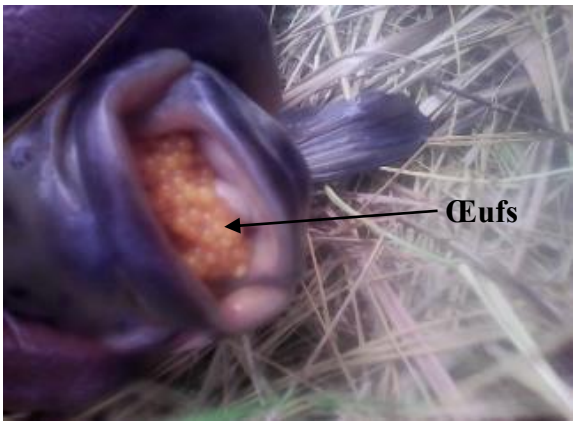


Figure 20 : Œufs observés dans la bouche d'une femelle de *H. niloticus* dans une ferme piscicole du Centre de la Côte d'Ivoire.

Les nids sont construits pendant la saison de fraie qui correspond à la saison des pluies (Adite et al., 2005). En milieu naturel, les zones favorables sont les plaines inondées à de faibles profondeurs (15-30 cm) pour les besoins d'oxygénation des alevins après éclosion des œufs (Moreau, 1982 ; Nuñez et al., 2011). Les rives à pente raide et profonde ne conviennent pas à la confection des nids (Tillon, 1959). Le matériau utilisé par les reproducteurs pour réaliser les nids est composé essentiellement de la végétation arrachée dans le plan d'eau (Adite et al., 2005 ; Depierre & Vivien, 1977 ; Lévêque & Paugy, 1999). La paroi du nid est en terre. Elle est munie d'une ouverture servant de passage aux géniteurs (Moreau, 1982).

Les reproductions en étang sont obtenues en se rapprochant des conditions du milieu naturel. Pour ce faire, les pisciculteurs maintiennent, sur les bords des étangs, une présence permanente de la végétation (Reizer, 1964). Il est cependant constaté que la présence de végétation n'est pas une condition indispensable pour la confection des nids puisque des reproductions sont observées dans des étangs sans végétation (Nuñez et al., 2011 ; Tillon, 1959). Les reproducteurs utilisent les débris végétaux qu'ils trouvent dans le plan d'eau pour construire leur nid (Adite et al., 2006 ; Tillon, 1959) situé sur les limites des étangs. Ce sont des dépressions circulaires aménagées comparables à de petites cuvettes (**Figure 21**) (Lévêque & Paugy, 1999). Chez *H. niloticus*, le diamètre du nid varie généralement entre 100 et 150 cm et la profondeur de 30 à 50 cm (Lévêque & Paugy, 1999 ; Moreau, 1982). Au Benin, des nids de 77 et 165 cm de diamètre et de profondeur comprise entre 40 et 86 cm sont observés (Adite et al., 2006). Chez *A. gigas*, les nids ont 40 à 50 cm de diamètre et une profondeur de 15 à 20 cm (Chu-Koo et al., 2009 ; Rebaza Alfaro et al., 2003).

Figure 21 : Nid de *H. niloticus* dans un étang piscicole au centre ouest de la Côte d'Ivoire
On observe les débris végétaux utilisés pour la construction du nid de forme circulaire.

Des étangs de 2 ares avec une densité de 0,08 géniteurs/m^2 sont suffisants pour obtenir des reproductions chez *H. niloticus* (Reizer, 1964 ; Tillon, 1959).

Le nombre de nids actifs peut atteindre 51/hectare/mois en milieu naturel chez *H. niloticus* (Adite et al., 2006). En pisciculture, dans un étang de 2 ares contenant 9 reproducteurs d'*Heterotis* de sexe inconnu, 5 nids actifs ont été observés au même moment (Tillon, 1959).

Les nids sont utilisés en étangs par les couples d'*Heterotis* deux à trois fois pendant trois ou quatre semaines d'intervalle. Avant d'être réutilisés, les nids sont réaménagés par les deux congénères (Moreau, 1982 ; Reizer, 1964). La sortie du nid pour regagner le centre de l'étang se fait presque toujours par le même chemin. Ce parcours est bien marqué en milieu naturel. Le trajet suivi par les reproducteurs d'*Heterotis* pour regagner les eaux profondes se remarque par le froissement de la végétation (Reizer, 1964).

Chez les *Arapaimidae*, le nid est construit par les deux géniteurs (Moreau, 1982 ; Nuñez et al., 2011). Il arrive que chez un couple de *H. niloticu*s, l'un des reproducteurs soit plus actif que l'autre (Reizer, 1964). La surveillance du nid peut durer un à deux jours avant que se réalise l'accouplement et la fécondation. Les géniteurs se relayent à tour de rôle à l'intérieur du nid (Moreau, 1982).

4.4 Ponte et fécondation des œufs

La ponte des œufs peut intervenir immédiatement après la confection des nids (Moreau & Moreau, 1982). Elle peut se produire un peu plus tard entre 5 à 45 jours après la confection du nid. Certains nids sont construits puis abandonnés sans que des œufs y soient déposés (Tillon, 1959).

Une succession de ponte est observée pendant la saison de reproduction chez *H. niloticus* et *A. gigas*. Une femelle de *H. niloticus* peu pondre 2 à 7 fois. L'Intervalle entre les pontes est de 20 à 33 jours (Moreau, 1982). La femelle de *A. gigas* peut pondre 4 à 5 fois par an (Lüling, 1964). Il a été montré que l'alimentation joue un rôle important dans la fraie de *A. gigas* en captivité (Nuñez et al., 2011).

La fécondité absolue qui est le nombre d'ovocytes matures dans l'ovaire est très faible chez les *Arapaimidae* (Adite et al., 2006 ; Kouakou et al., 2016; Moreau, 1982 ; Nuñez et al., 2011). Le **Tableau 9** montre qu'elle est comprise entre 2 300 et 27 508 ovocytes chez *H. niloticus*. Dans 1 g d'ovaire, on compte 81 à 149 ovocytes (Moreau, 1982). La fécondité absolue maximale de *A.* gigas a été observée en milieu naturel au Brésil. Elle varie entre 58 000 et 86 000 ovocytes (Bard & Imbiriba, 1986).

Tableau 9 : Taille et fécondité chez *H. niloticus*

		Valeurs minimales			Valeurs maximales			
Pays	Plan d'eau	LS (mm)	Poids (g)	Fécondité absolue	LS (mm)	Poids (g)	Fécondité absolue	Références
Bénin	-	500	1 330	2 697	815	4 650	27 508	(Adite et al., 2006)
Côte d'Ivoire	Fleuve Agnéby	595	-	5 424	780	-	25 591	(Kouakou et al., 2016)
	Lac Kan	480	1 000	2 300	570	1 650	5 700	(Moreau, 1982)
	Lac Ayamé	550	1 500	4 200	790	4 700	12 000	
Centrafrique	-	560	1 705	3 572	820	5 280	15 246	
Madagascar	Lac Ivakoina Pangalanes	450	750	3500	660	2400	8600	

Chez les *Arapaimidae*, la fécondation des œufs est externe. Elle est réalisée par le mâle après la ponte dans le nid (Marre, 2011 ; Moreau, 1982 ; Reizer, 1964).

Après la fécondation, l'un des géniteurs reste constamment près du nid ou se place à l'intérieur. Sa présence et ses mouvements permettent de protéger les œufs et de garantir leur fertilité (Moreau, 1982). Cette phase dure 2 à 3 jours chez *H. niloticus* (Reizer, 1964). A la vue d'un danger, le géniteur s'éloigne du nid mais revient rapidement avec précaution.

La taille des œufs varie entre 2,5 et 3 mm (Adite et al., 2006 ; Lévêque & Paugy, 1999 ; Moreau, 1982).

Les œufs de *H. niloticus* éclosent 2 jours après la ponte (Lévêque & Paugy, 1999). Le nombre d'alevins par ponte est d'environ 3 000 (Moreau, 1982).

Au Pérou, pour l'espèce *A.* gigas, des fermes ont enregistré entre 100 et 5 000 alevins par couple au cours d'une ponte (Marre, 2011), entre 26 à 1063 alevins par femelle par an et un nombre maximal d'alevins (3941) pour une seule reproduction (Nuñez et al., 2011). Un

maximum de 11 000 alevins ont été obtenus en une ponte par une femelle dans les conditions d'élevage au Brésil (Bard & Imbiriba, 1986).

4.5 Soins parentaux et différents stades de développement du poisson

Un à deux jours après l'éclosion des œufs, les alevins d'*Heterotis* présents au fond du nid montent régulièrement à sa surface (Moreau, 1982 ; Reizer, 1964). Les alevins sortent du nid pour se promener à partir du 5^{e} ou 6^{e} jour en forme d'essaim de 30 cm de diamètre sous la protection des parents qui tournent autour d'eux soit en couple ou de façon isolée (Lévêque & Paugy, 1999 ; Moreau, 1982 ; Reizer, 1964; Tillon, 1959). Ces sorties promenades durent 3 à 5 jours avant l'abandon définitif du nid. Face aux prédateurs ou aux intrus dans la zone de promenade, les parents se montrent agressifs (Reizer, 1964). Ils aident aussi les alevins à rechercher de la nourriture. Le groupe ne s'éloigne que de 2 à 3 m du nid. Le temps passé hors du nid augmente au fur et à mesure. Il est rare de voir deux essaims d'alevins se côtoyer (Reizer, 1964). L'essaim d'alevins est animé d'un mouvement désordonné. Après la sortie définitive du nid, les alevins sont abandonnés. Dès ce moment et jusqu'à l'âge de 2 mois, ils sont très vulnérables, leur mortalité est très élevée et peut atteindre 100% (Moreau, 1982). En conditions expérimentales, le taux de survie des alevins peut se situer entre 77 et 82% (Monentcham et al., 2010). Lorsque les alevins sont déplacés dans un autre étang, ils peuvent former plusieurs petits essaims et cela augmente leur survie (Reizer, 1964). Il semble que *H. niloticus* défende un territoire depuis la confection du nid jusqu'à l'abandon des alevins (Reizer, 1964).

Chez *A. gigas*, la garde des alevins dure 20 jours en étang. Elle est assurée par les deux parents qui les aident à venir en surface pour respirer et les protègent des prédateurs (Bard & Imbiriba, 1986 ; Chu-Koo et al., 2009). Dans le milieu naturel, les mâles protègent les alevins en restant près d'eux pendant environ 3 mois, se nourrissant dans l'environnement riche en nourriture des forêts inondées. Les adultes se séparent des juvéniles lorsque les niveaux d'eau diminuent. Ils regagnent tous les habitats plus bas des forêts inondées puis les canaux et les lacs de liaison (Castello & Stewart, 2010). Au stade larvaire, *A. gigas* est sensible à la prédation. La survie est voisine de 50% en élevage. Une fois ce stade franchi, l'espèce devient rustique (Marre, 2011).

Le taux de croissance des *Arapaimidae* compte parmi les plus élevés des poissons de pisciculture. Il varie entre 10 à 15kg/an pour *A. gigas* et peut atteindre 10g/j chez *H. niloticus* (Tillon, 1959). En étang de pisciculture, la croissance est continue chez *H. niloticus*, alors qu'en milieu naturel, elle est plus faible en période de basses eaux à cause de l'inaccessibilité des plaines inondées qui offrent une variété d'aliments plus importante. Le mâle croît plus vite que la femelle en pisciculture (Tillon, 1959). *H. niloticus* présente une croissance allométrique (Ezekiel & Abowei, 2013) et l'embonpoint diminue avec l'âge (Moreau, 1982).

Chez *H. niloticus*, le poisson est considéré comme juvénile lorsque sa longueur est < 300 mm, entre 300-500 mm il est subadulte et pour une longueur > 500mm, il est adulte (Adite et al., 2005). Les individus adultes sont difficiles à manipuler (Tillon, 1959).

5. La régulation neuroendocrinienne de la reproduction chez les poissons téléostéens : hormones, gamétogenèse et comportement reproducteur

5.1 Le Rôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Chez les poissons, les fonctions de reproduction, de la gamétogenèse au comportement sexuel, sont pour la plupart contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Labadie, 2004 ; Maruska & Fernald, 2011 ; Takahashi et al., 2016) (**Figure 22**).

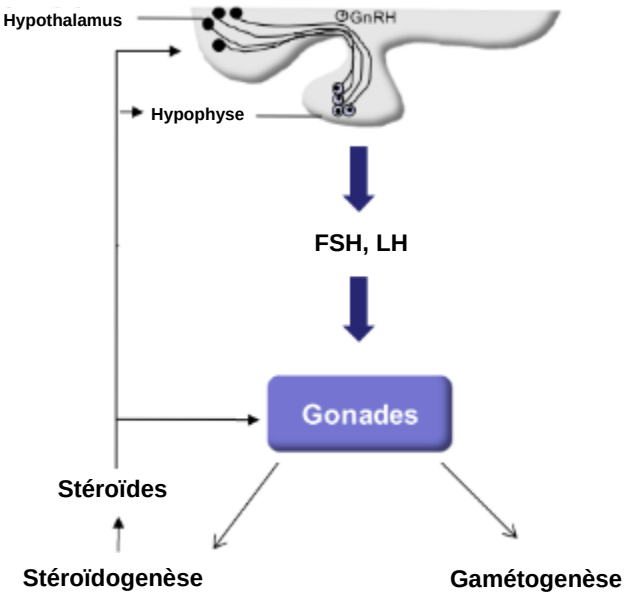


Figure 22 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.
Modifiée d'après Baudiffier (2012).
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone (gonadolibérine), FSH : hormone folliculo-stimulante, LH : hormone lutéinisante.

Sous l'effet des stimuli sensoriels tels que les facteurs environnementaux (Plant, 2015 ; Yang et al., 2017) et sociaux (K. P. Maruska & Fernald, 2011), l'hypothalamus est stimulé pour produire des neurohormones et des neurotransmetteurs. Les gonadolibérines (GnRH) produites par l'hypothalamus stimulent au niveau de l'hypophyse la synthèse de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Zohar et al., 2010). Ces deux gonadotropines vont, selon le sexe, stimuler la production de stéroïdes hormonaux dans les testicules ou les ovaires pour assurer la régulation de la gamétogenèse et stimuler la stéroïdogenèse. Un contrôle rétroactif des stéroïdes hormonaux est exercé sur les gonades ainsi que sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Baudiffier, 2012 ; Labadie, 2004 ; Plant, 2015).

5.2 Les hormones stéroïdiennes

5.2.1 Synthèse et rôle des hormones stéroïdiennes dans la fonction de reproduction

La stéroïdogenèse est un processus relativement conservé chez les vertébrés qui conduit à la biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir d'un précurseur commun, le cholestérol, par une série de réactions enzymatiques catalysées principalement par plusieurs cytochromes P450 ainsi que par des hydroxysteroïde-déshydrogenases (HSDs). Chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, elle se déroule principalement dans les gonades (testicules et ovaires), mais aussi dans le cerveau et les glandes inter- rénales (Baudiffier, 2012).

Les principaux stéroïdes produits chez les poissons, la 11-kétotestostérone ou 11KT : 17β-hydroxy-4-androstène-11,17-dione, la testostérone ou T : 17β-hydroxy-4-androstène-3-one et la 17β-estradiol ou E2 : 1,3,5,(10)-estratriène-3,17β-diol, jouent un rôle critique dans la différentiation sexuelle (Baudiffier, 2012 ; Devlin & Nagahama, 2002 ; Taranger et al., 2010 ; Zohar et al., 2010). Les hormones stéroïdiennes régulent le développement de types distincts de gonades (testicule ou ovaire), le cycle reproducteur (gamétogenèse, caractères sexuels secondaires, comportement sexuel) et la croissance (Baudiffier, 2012 ; Devlin & Nagahama, 2002 ; Taranger et al., 2010 ; Zohar et al., 2010). Elles participent également à l'homéostasie générale de l'organisme des poissons (Baudiffier, 2012).

L’estradiol est la principale hormone sexuelle qui stimule, chez les femelles, l’ovogenèse, la synthèse de la vitellogénine (Vtg) et de la choriogénine dans le foie (Hara et al., 2016 ; Nelson & Habibi, 2013). Cette hormone stéroïdienne est synthétisée par les cellules folliculaires des ovocytes en développement au début de la vitellogenèse sous le contrôle de la FSH libérée dans le sang par l’hypophyse (Hara et al., 2016 ; Norris & Lopez, 2011).

5.2.2 Les récepteurs œstrogéniques

a) Rôle et différentes variantes des récepteurs œstrogéniques

Les œstrogènes, hormones stéroïdiennes qui interviennent de manière critique dans les processus de reproduction des vertébrés, sont signalés principalement par l'intermédiaire de leurs récepteurs œstrogéniques intracellulaires (ERs). Les ERs appartiennent à une superfamille de récepteurs nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription inductibles par un ligand. Les œstrogènes se lient aux récepteurs œstrogéniques intracellulaires et les activent. En l'absence de ligand, les ERs sont présents dans le cytoplasme (Nelson & Habibi, 2013).

Chez les espèces ovipares, les ERs sont principalement synthétisés dans le foie. (Nelson & Habibi, 2013 ; Unal et al., 2014).

Plusieurs auteurs s’accordent sur l’existence de trois sous types distincts de ERs chez les poissons avec des nomenclatures assez variées (Choi & Habibi, 2003 ; Hawkins et al., 2000 ; Hawkins & Thomas, 2004 ; Marlatt et al., 2008 ; Métivier et al., 2002 ; Nelson & Habibi, 2013 ; Nelson & Habibi, 2010 ; Norris & Lopez, 2011 ; Sabo-Attwood et al., 2004). Ce sont :

- ESR1= ER = ESR = ESRA = ESTRR = Era = NR3A1 = ERα appelé ER alpha ;
- ESR2a = ERβ-I = ERβa = ERβ1 = ERγ appelé ER gamma ou ER béta 1 ;
- ESR2b = ERβ-II = ERβb = ERβ2= NR3A2 = ERβ appelé ER béta ou ER béta 2.

Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une deuxième forme d'ERα (ERα-2) a été décrite et existe probablement chez d'autres espèces (Nagler et al., 2007). Une seul forme d’ERβ a été mise en évidence chez les mammifères (Couse et al., 1997).

ERα est homologue chez les vertébrés. Chez les poissons, ERβ partage une plus grande similarité avec les ERβ des mammifères. Les ERγ de poissons qui sont probablement issus de

la duplication de gènes, présentent plusieurs changements importants d'acides aminés et n'ont pas d'homologue chez les mammifères (Hawkins et al., 2000 ; Hawkins & Thomas, 2004).

Les ERs ont une régulation spécifique suivant le sexe, le stade de la gamétogenèse, l'espèce et le type de tissu (Nelson, Wiehler, Cole, & Habibi, 2007). Par exemple, chez des femelles matures de *Micropterus salmoides* en période de vitellogenèse (**Figure 23**), l'expression de ERα prédomine dans le foie, les expressions de ERγ et ERβ prédominent dans l'ovaire (Sabo-Attwood et al., 2004). Chez les mammifères, ERα est assez largement exprimé dans l'ensemble de l'organisme, tandis que ERβ présente la plus forte valeur d'expression dans les ovaires, les poumons et la prostate (Couse et al., 1997). L'une des raisons de la différence observée entre les sexes peut être due à des niveaux d'expression différents des sous-types d'ERs. En effet, l'expression des ERα est plus élevée chez les femelles que chez les mâles, alors que l'expression des ERβ-I et des ERβ-II est similaire entre les deux sexes (Nelson & Habibi, 2010). De plus, l'expression des ERα fluctue chez les femelles, étant plus élevée chez les femelles en vitellogenèse avancée que chez les femelles en début de vitellogenèse. L'ERα est induit par l'estradiol et son augmentation chez les femelles correspond à une période d'augmentation de l'estradiol circulant (Nelson et al., 2007). Les formes ERβ ont une plus grande affinité pour l'estradiol que les formes ERα. Il est probable que les formes ERγ et ERβ agissent comme des capteurs de l'E2. Ainsi, à mesure que les taux d'E2 augmentent, on a une induction de l'expression de l'ERα et de la Vtg (Genovese et al., 2014 ; Nelson & Habibi, 2013). Il existe de ce fait, une relation étroite entre la régulation positive de ERα et l'induction de la synthèse de Vtg chez les poissons (Choi & Habibi, 2003 ; Marlatt et al., 2008 ; Nelson et al., 2007).

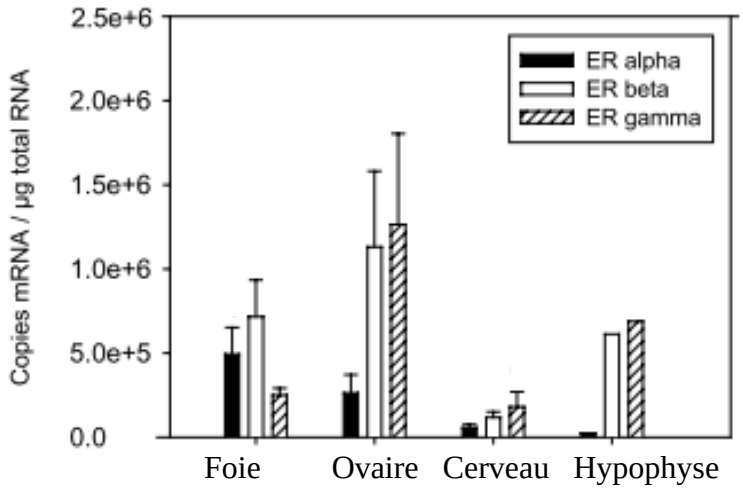


Figure 23 : Niveau d'expression des ERs chez les femelles de *Micropterus salmoides* en début de vitellogenèse. D'après Sabo-Attwood et al., (2004).

b) Structure et domaines des récepteurs œstrogéniques

Les ERs, comme la plupart des récepteurs nucléaires, contiennent cinq domaines avec des fonctions distinctes (Aranda & Pascual, 2001 ; Nelson & Habibi, 2013 ; Sabo-Attwood et al., 2004) (**Figure 24**).

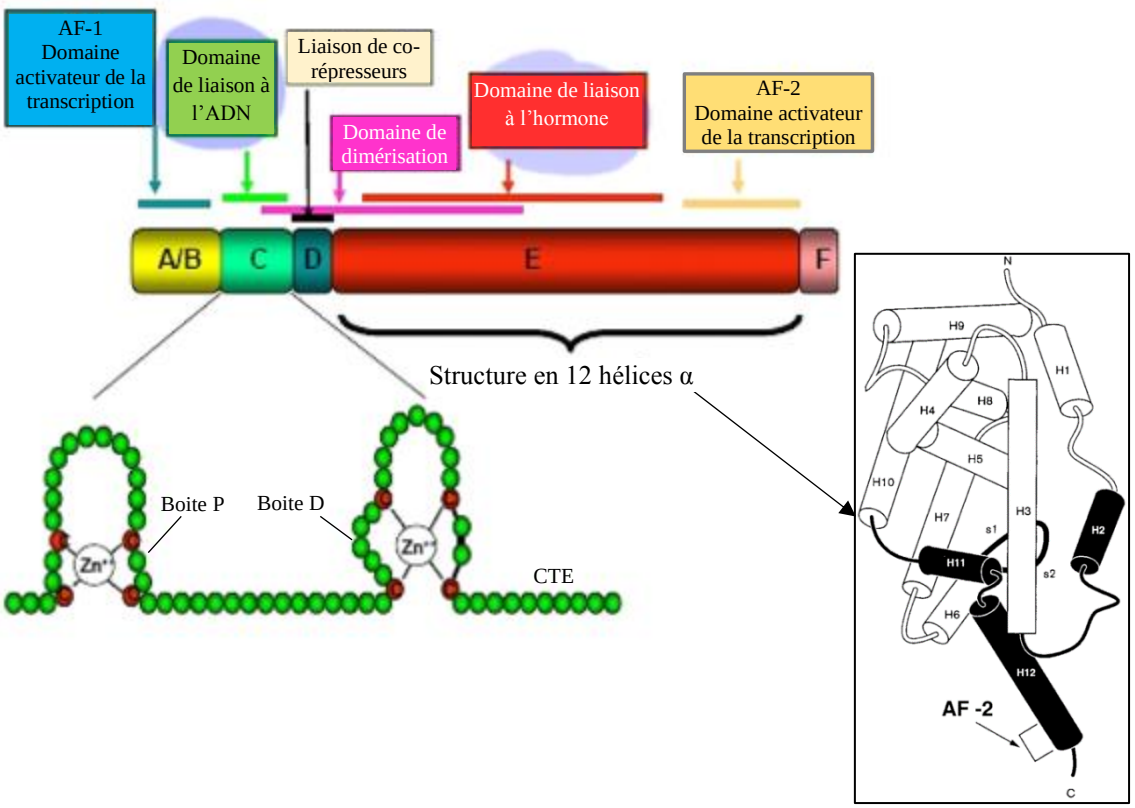


Figure 24 : Structure des récepteurs d'estrogène.
Le domaine A/B contient la 1ère fonction d'activation (AF-1), DBD ou domaine C est le domaine de liaison à l'ADN avec la « boite P » à la base du premier « doigt de zinc », la « boite D » à la base du second « doigt de zinc » et une extension COOH-terminale (CTE), le domaine D constitue un site d'interaction avec des protéines co-répresseurs et favorise la rotation du DBD, le domaine E ou domaine de liaison au ligand (LBD) avec 12 hélices α se lie à l'estradiol (E2) et contient la 2e fonction d'activation (AF-2), le début du domaine F marque la fin de la 2e fonction d'activation.
Modifiée d'après (Aranda & Pascual, 2001).

La région N-terminale des ERs (A/B) est la région la plus variable entre les différents ERs. Cette région permet de générer plusieurs isoformes d'ERs à partir d'un même gène. Il contient la première fonction d'activation (AF1) et contribue à une action spécifique des isoformes (Aranda & Pascual, 2001). La région A/B peut être phosphorylée par la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) sur des résidus sérine (Kato et al., 1995).

Le domaine C de l'ER est également connu sous le nom de domaine de liaison à l'ADN (DBD). Cette région est le domaine le plus conservé entre les ERs de différentes espèces avec 9 cystéines (**Figure 25**) (Aranda & Pascual, 2001 ; Sabo-Attwood et al., 2004). Ce domaine comprend deux « doigts de zinc » couvrant 60 à 70 acides aminés et une extension COOH-terminale (CTE) contenant les boîtes dites T et A (**Figure 24**). La reconnaissance de l'ADN est obtenue au niveau de la « boîte P » du DBD à la base du premier « doigt de zinc » et la « boîte D », un domaine à la base second « doigt de zinc », est impliquée dans la dimérisation des récepteurs (Aranda & Pascual, 2001). ERα et ERβ (Cowley et al., 1997) ou différentes isoformes de ERβ (Leung et al., 2006) sont capables de former des hétérodimères fonctionnels sur l'ADN.

```
alpha   CAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQCTIDRNRRKSCQACRLRKCYEVGM  253
gamma   CAVCQDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQRHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCNEVGM  223
beta    CAVCHDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGM  246
```

Figure 25 : Séquences du noyau des DBD des récepteurs œstrogéniques alpha, beta et gamma de *Micropterus salmoides*. D'après Sabo-Attwood et al. (2004).
Les 9 cystéines de chaque domaine de liaison à l'ADN (DBD) sont en gris, la boîte P impliquée dans la reconnaissance de l'ADN est en soulignement simple, la boîte D impliquée dans la dimérisation du récepteur est doublement soulignée, les chiffres indiquent la position de l'acide aminé terminal de la DBD dans le récepteur.

La séquence flanquante D mal conservée confère souvent des signaux de localisation nucléaire. Cette région favorise la rotation du DBD (Aranda & Pascual, 2001 ; Giguère, 1999) et constitue un site d'interaction avec des protéines co-répresseurs (Kumar et al., 2011).

C'est dans la région E désignée comme région de ligand (LBD) que le ligand (E2) se lie pour induire la seconde fonction d'activation (AF-2) située dans la partie C-terminale de cette région (Aranda & Pascual, 2001 ; Kato et al., 1995). AF-2 est un domaine bien conservé. La LBD est composée de douze hélices α (H1 à H12) liées par un demi-tour entre H5 et H6 (Aranda & Pascual, 2001).

Les ERs contrairement à d'autres récepteurs nucléaires contiennent une région C-terminal désignée par F qui commence à la fin de l'AF-2. Aucune fonction spécifique n'a encore été attribuée à cette région chez les poissons (Aranda & Pascual, 2001 ; Nelson & Habibi, 2013). Chez l'homme, il a été montré que le domaine F de l'ERα module sélectivement son activité

et ses interactions avec d'autres protéines (Koide et al., 2007) et intervient dans la dimérisation des récepteurs (Arao & Korach, 2008).

5.3 La vitellogénine

5.3.1 Rôle et distribution tissulaire de la vitellogénine chez les téléostéens

La vitellogénine (Vtg) est un précurseur des protéines du jaune de l'œuf (vitellus) chez les femelles de presque toutes les espèces ovipares, y compris les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, la plupart des invertébrés et l'ornithorynque (Wallace et al., 1990 ; Zhang et al., 2015). C'est une phospholipoglycoprotéine de 200 à 700 kDa généralement (Wang et al., 2010) homologue fonctionnel des apolipoprotéines (Avarre et al., 2007 ; Li et al., 2003) qui joue un rôle essentiel dans le développement de l'embryon et la survie des larves.

Même si la Vtg est la protéine associée à la reproduction des femelles (Zhang et al., 2015), les substances mimétiques des œstrogènes naturels, appelés xénoestrogènes (nonylphenol, génistéine), peuvent activer son expression chez les mâles, en induisant une perturbation endocrinienne (Arukwe & Røe, 2008 ; Bennetau-Pelissero et al., 2004 ; Dugué et al., 2008 ; Genovese et al., 2014 ; Gontier-Latonnelle et al., 2007 ; Ndiaye et al., 2006). Ainsi, pour suivre les pollutions du milieu aquatique à l'estradiol, la Vtg est recherchée chez les mâles de vertébrés ovipares qui y vivent.

En somme, les caractéristiques générales de la Vtg chez les vertébrés ovipares (Hara et al., 2016) peuvent être résumées de la manière suivante :

- c'est une protéine spécialement exprimée par les femelles durant la vitellogenèse ;
- l'administration d'estrogènes aux mâles ou aux juvéniles des deux sexes conduit à l'expression de la Vtg ;
- c'est une macromolécule complexe composée d'acides aminés, de glucides, de lipides et de phosphore avec des éléments de liaison comme le calcium, le fer et le zinc ;
- c'est un précurseur des protéines du jaune d'œuf ou plus généralement du vitellus.

Chez les vertébrés, les Vtg sont synthétisées et secrétées principalement par le foie sous le contrôle du 17β-estradiol. Transportées par le sang, elles sont absorbées dans les ovocytes par endocytose médiée par des récepteurs (Dominguez et al., 2012 ; Hara et al., 1998 ; Ndiaye et al., 2006). Une fois dans l'ovaire, les Vtg sont clivées en protéines vitellines nécessaires au développement embryonnaire (Avarre et al., 2007 ; Hara et al., 2016 ; Prat et al., 1998) (**Figure 26**).

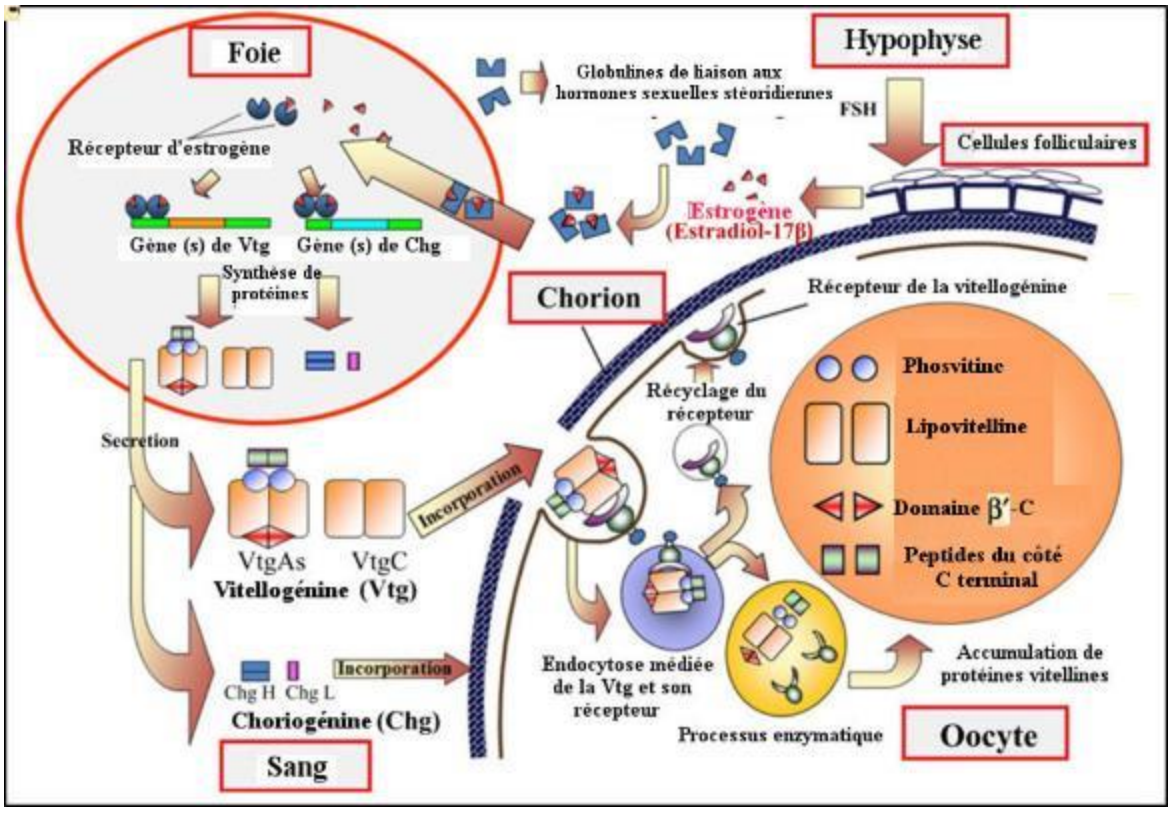


Figure 26 : Régulation de la vitellogenèse et de la choriogenèse chez les *Salmonidae*
D'après Hara et al. (2016). FSH : hormone folliculo-stimulante.

La synthèse de la Vtg dans le foie de poisson fournit un critère d'évaluation physiologiquement pertinent de l'activation de l'ER (Nelson & Habibi, 2013). Le dosage de sa concentration dans le sang permet de connaitre le stade de maturité des gonades (Baumann et al., 2013 ; Chatakondi & Kelly, 2013). Des méthodes basées sur la détection de Vtg plasmatique chez les individus adultes ayant acquis la maturité sexuelle permettent de sexer des poissons, particulièrement ceux ne présentant pas de dimorphisme sexuel. Un anticorps anti Vtg de *A. gigas* a été mis au point par une équipe de l'IRD pour réaliser le sexage de cette espèce. Un kit de sexage a été développé à cet effet (Nuñez, 2008 ; Chu-Koo et al., 2009).

Les Vtgs permettent de donner des propriétés « pélagiques » ou « benthiques » aux œufs par un mécanisme faisant appel à l'osmorégulation (Finn & Kristoffersen, 2007) qui modifie leur densité. Elles jouent également un rôle dans la défense immunitaire des femelles matures et des embryons. En effet, certains auteurs (Wang et al., 2011 ; Zhang et al., 2015) ont montré que les peptides provenant du clivage des protéines vitellines possédaient une activité antimicrobienne.

La concentration sanguine en Vtg augmente dès la prévitellogenèse et atteint des niveaux élevés durant la vitellogenèse (Xu, 2016). Elle est principalement exprimée dans le foie (Zhong et al., 2014) mais on la détecte également dans des tissus non hépatiques avec des niveaux inférieurs à 10% de celui du foie (Wang et al., 2005). On retrouve la Vtg dans le sang (Chu-Koo et al., 2009 ; Ndiaye et al., 2006 ; Nuñez, 2008), dans l'ovaire (Kong et al., 2014 ; Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2010), le mucus (Arukwe & Røe, 2008 ; Genovese et al., 2014 ; Meucci & Arukwe, 2005 ; Moncaut et al., 2003), dans le cœur, le rein, la rate, la peau, les muscles, les branchies, les yeux, le cerveau et les nageoires (Zhong et al., 2014).

5.3.2 Domaines et variantes de la vitellogénine

Un taux élevé (pouvant atteindre 79%) de domaines de la Vtg est conservé chez les téléostéens. Les alignements réalisés entre les séquences de Vtg de téléostéens et les autres vertébrés se révèlent le plus souvent faibles (Wang et al., 2010). Le génome des poissons peut contenir jusqu'à 20 copies de gènes codant des vitellogénines comme c'est le cas chez *Oncorhynchus mykiss* (Trichet et al., 2000).

D'une manière générale, la Vtg de poisson consiste de façon successive, en un peptide signal, une chaîne lourde de lipovitelline (LvH ou LvI), un domaine phosvitine riche en sérine phosphorylée (Pv), une chaîne légère de lipovitelline (LvL ou LvII), une composante β'-C et une région codante C-terminale (CT) (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006 ; Zhang et al., 2015).

La Lv est le principal produit de dégradation de la Vtg, que contient le jaune d'œuf et sa teneur en lipides avoisine les 20% de sa masse. C'est un dimère constitué de deux polypeptides LvH et LvL. La Lv est riche en divers types d'acides aminés et de lipides, sources nutritionnelles essentielles pour l'embryon (Hara et al., 2016). Le domaine Lv de la Vtg sert de site de liaison aux récepteurs (Li et al., 2003).

La Pv est une phosphoprotéine riche en phosphosérine (Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2010) avec environ 10% de phosphore et la sérine représente environ 50% des acides aminés (Hara et al., 2016). Cette composition particulière rend les Vtg solubles dans le plasma et leur structure demeure stable (Finn, 2007 ; Yilmaz et al., 2015). La Pv fournit l'essentiel des éléments minéraux nécessaires au développement osseux (Hiramatsu et al., 2006) et jouerait un rôle critique dans l'immunité des embryons du poisson zèbre en inactivant certains microbes auxquels elle se lie (Wang et al., 2011).

Le domaine β'-C et CT sont riches en cystéines qui forment des ponts disulfures, ce qui peut stabiliser le repliement et la dimérisation des Vtg, évitant ainsi des protéolyses inappropriées ou prématurées (Williams et al., 2014 ; Xu, 2016).

Trois formes de Vtg sont identifiées chez de nombreuses espèces (Schilling et al., 2015 ; Williams et al., 2014 ; Yilmaz et al., 2015). Elles sont reparties en deux groupes : l'une complète et l'autre incomplète (**Figure 27**). La Vtg complète comprend les cinq domaines à savoir la LvH, Pv, LvL, β'-C et CT. Elle compte deux variantes, la VtgA et la VtgB qui ont des poids moléculaires plus ou moins proches. La Vtg incomplète désignée par VtgC ne possède pas de Pv, de domaines β'-C et CT (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006 ; Yilmaz et al., 2015).

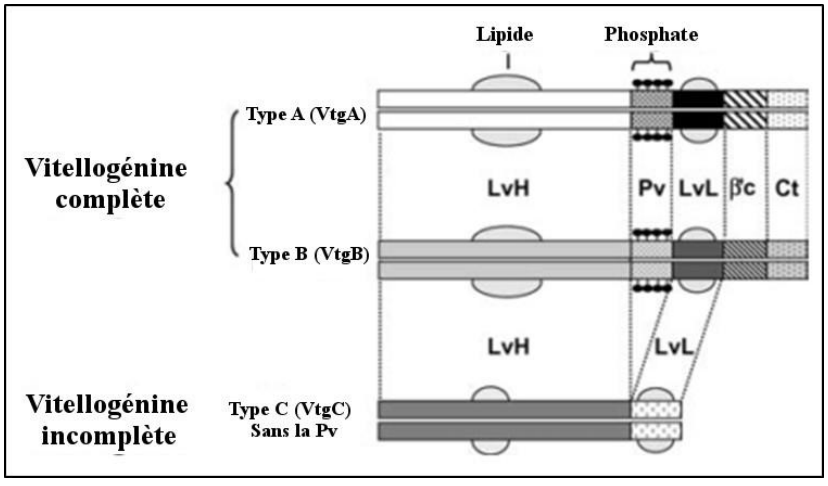


Figure 27 : Représentation de la structure des VtgA, VtgB et VtgC, d'après Hara et al. (2016) ; Hiramatsu et al. (2006). Les deux formes de Lipovitelline (LvH et LvL) sont présentes dans toutes les formes de Vtg. La phosvitine (Pv), la composante β'-C et la région non codante C-terminale (CT) sont absents dans la VtgC.

Ces trois formes de Vtg n'ont pas été détectées chez toutes les espèces (Finn & Kristoffersen, 2007 ; Hara et al., 2016 ; Williams et al., 2014) **(Tableau 10)**. Chez *A. gigas* par exemple, deux Vtg ont été purifiées par une méthode immuno enzymatique (Vtg1 de 184 kDa et Vtg2 de 112 kDa). La Vtg1 de *A. gigas* qui a un taux plus élevé dans le sang que la Vtg2 (Chu-Koo et al., 2009 ; Dugué et al., 2008) a été utilisée pour développer un anticorps spécifique anti Vtg d'*Arapaima* dans le but de sexer des femelles matures.

Tableau 10 : Masses moléculaires de divers types de vitellogénine chez les téléostéens.

Espèces de poisson	VtgA	VtgB	VtgC
Verasper moseri	500 – 520 kDa	520 – 550 kDa	-
Pagrus major	610 kDa	610 kDa	340 kDa
Acanthogobius flavimanus	530 kDa	-	320 kDa
Gambusia affinis	600 kDa	600 kDa	400 kDa
Oryzias latipes	570 kDa	-	410 kDa
Morone americana	532 kDa	532 kDa	426 kDa
Mugil cephalus	570 kDa	580 kDa	335 kDa

D'après Hara et al. (2016)

La nomenclature pour désigner les différentes variantes de Vtg est assez diversifiée (**Figure 28**) et a connu des évolutions (Finn & Kristoffersen, 2007 ; Hara et al., 2016 ; Williams et al., 2014 ; Yilmaz et al., 2016). Les correspondances entre nomenclatures largement adoptées actuellement sur la Vtg (Yilmaz et al., 2016) sont :

- vtgAa = VtgAa = vtg1 = vtgI = vga = Vtg1 = VtgI = VtgA ;
- vtgAb = VtgAb = vtg2 = vtgII = vgb = Vtg2 = VtgII = VtgB ;
- VtgC.

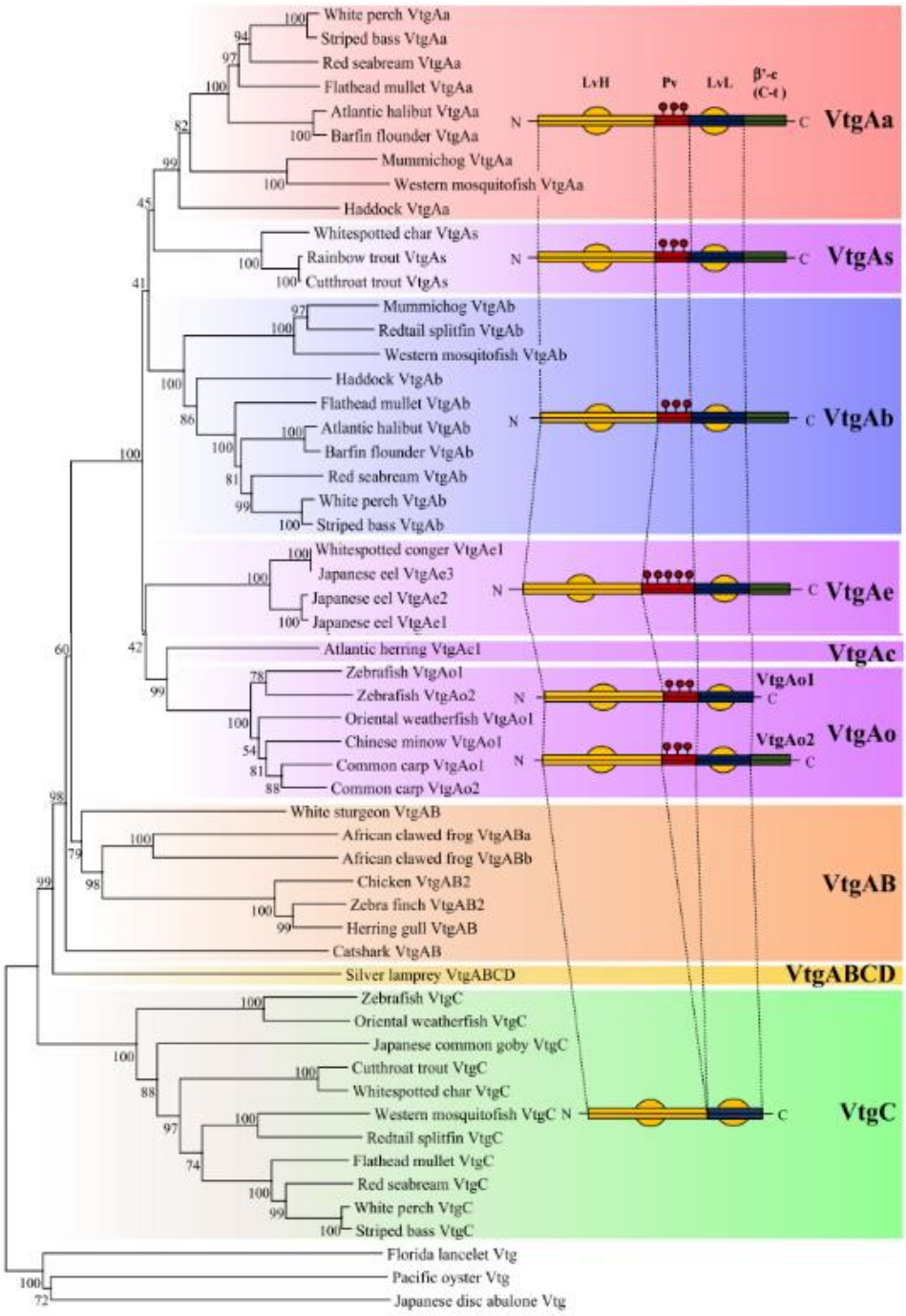


Figure 28 : Nomenclature de la Vtg chez divers espèces de téléostéens (Hara et al., 2016). LvH et LvL : Lipovitelline H et L, Pv : phosvitine, la composante β'C et la région non codante C terminale (CT).

5.3.3 Les familles de récepteurs à la vitellogénine

Les récepteurs de la vitellogénine (VtgR) des téléostéens, situés sur la membrane des ovocytes, d'environ 100 kDa, se classent parmi les récepteurs de lipoprotéines de très basse densité (VLDLR) appartenant à la superfamille des récepteurs de lipoprotéines de basse densité

(LDLR) (Li et al., 2003 ; Mizuta et al., 2013 ; Pousis et al., 2012 ; Xu, 2016). Les membres de la superfamille des LDLR (**Figure 29**) se lient à divers ligands et sont impliqués dans le métabolisme des lipides chez les vertébrés et les invertébrés (Mushirobira et al., 2015 ; Reading et al., 2014 ; Wang et al., 2017).

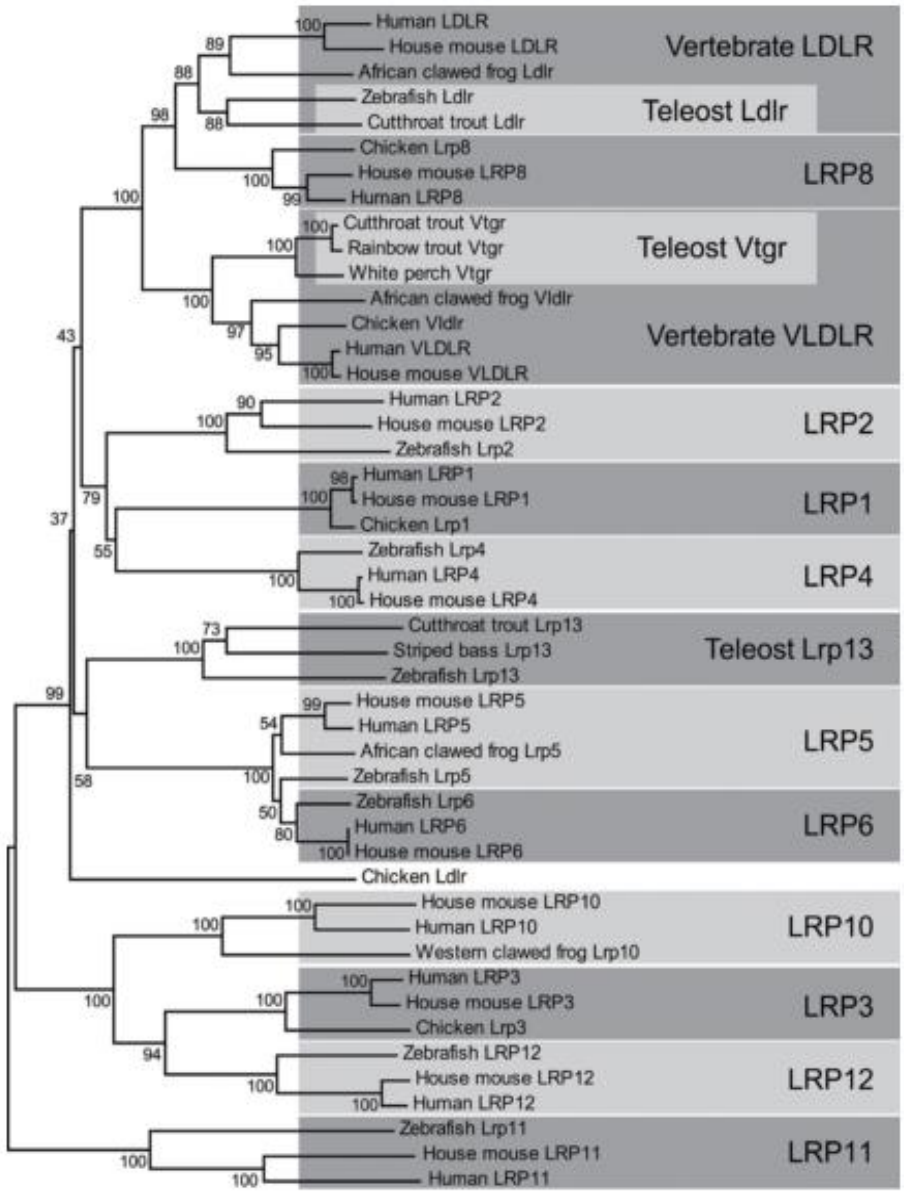


Figure 29 : Arbre phylogénétique présentant les récepteurs de la superfamille des LDLR (Mushirobira et al., 2015).
LDLR : récepteur de lipoprotéines de basse densité, VLDLR : récepteur de lipoprotéines de très basse densité, LRP : protéine liée au LDLR, Vtg : vitellogénine, VtgR : récepteur de la Vtg.

Les VtgR jouent un rôle important dans la reproduction des poissons. Ce récepteur a pour fonction de permettre l'incorporation de la Vtg dans les ovocytes par endocytose médiée (Dominguez et al., 2014 ; Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006). A la suite de l'endocytose, les VtgR sont recyclés (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006). C'est le domaine lipovitelline des Vtg qui sert de site de liaison aux récepteurs (Hiramatsu et al., 2001).

Les récepteurs de la vitellogénine sont conservés au niveau structural chez de nombreuses espèces (Dominguez et al., 2012 ; Li et al., 2003 ; Pousis et al., 2012 ; Prat et al., 1998 ; Xu, 2016). Ils ont un peptide signal suivi de huit domaines (**Figure 30**) : (i) les domaines de liaison du ligand ou LBD, (ii) les domaines précurseurs du facteur de croissance épidermique (EGF) avec trois répétitions EGF1 (A), EGF2 (B) et EGF3 (C) riches en cystéines, (iii) cinq motifs de quatre acides aminés de type YWTD (exemple de *Micropterus salmoides*) entre EGF2 et EGF3, (iv) le domaine de O-glycosylation riche en Sérine et Thréonine, (v) le domaine transmembranaire ou T et (vi) le domaine cytoplasmique. Le domaine O-glycosylation qui permet une stabilité des VtgR à la surface de la cellule (Magrané et al., 1999) n'est pas toujours présent dans tous les récepteurs de Vtg (Mizuta et al., 2013 ; Pousis et al., 2012).

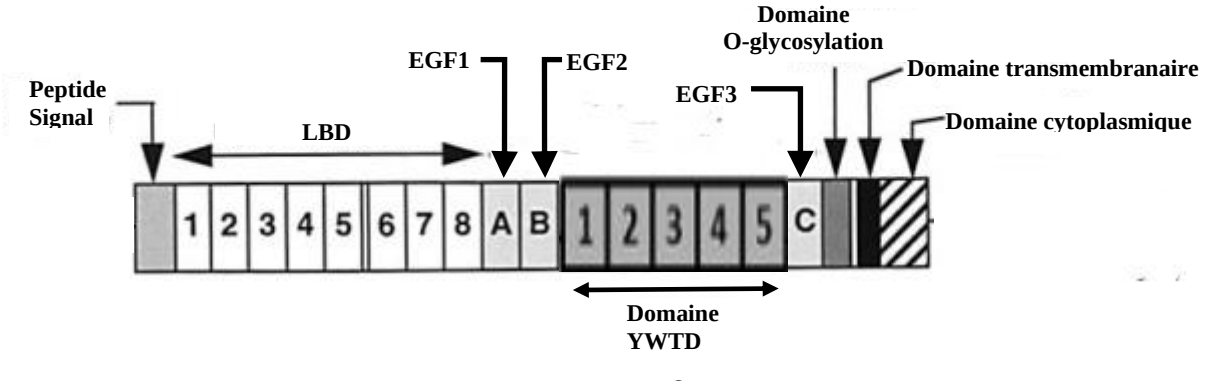


Figure 30 : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de vitellogénine, Modifiée d'après Dominguez et al. (2012) ; Prat et al. (1998).
EGF : facteur de croissance épidermique, LBD : Domaine de liaison au ligand.

Le Ligand Binding Domain (LBD), qui contrôle les interactions entre le récepteur et le domaine Lv de la Vtg, est composé de plusieurs répétitions se liant au ligand (LBR) riche en cystéines. Différentes formes de Lv impliquent différentes affinités pour les LBD. Par exemple, chez *Oreochromis aureus*, où la LBD compte 8 LBR, LBR 5 se lie à l'apolipoprotéine E (apoE), LBR 2-7 se lient à apoB et LBR 1-3 se lient à la Vtg (Li et al., 2003). Chaque LBR compte

environ 40 acides aminés (Li et al., 2003) dont 6 cystéines (Li et al., 2003 ; Luo et al., 2013). Le nombre de LBR varie selon les différents récepteurs. Le LDLR des poissons téléostéens comme chez *Oncorhynchus clarki* contient sept LBR (Luo et al., 2013), alors que le récepteur des lipoprotéines de très basse densité (VLDLR) ou VtgR chez les vertébrés ont huit LBR (Dominguez et al., 2012 ; Li et al., 2003 ; Mizuta et al., 2013 ; Prat et al., 1998 ; Xu, 2016). Certains LDLR ont plus de 30 LBR (Li et al., 2003).
Des espèces de poisson peuvent posséder jusqu'à quatre VtgR comme c'est le cas chez *Morone americana*. Les VtgR de cette espèce, situés sur la membrane des ovocytes, se lient à la VtgA et la VtgB et non à la VtgC (Reading et al., 2011).

La LR8, avec 8 LBR, a été longtemps considérée comme la seule VLDLR capable de se lier aux Vtg au niveau de la membrane des ovocytes des vertébrés (Reading et al., 2014). Ce récepteur compte deux sous types issus d'un épissage alternatif (Chen et al., 2016) : un sous type avec la présence du domaine O-glycosylation (LR8+) et l'autre sans le domaine O-glycosylation (LR8-).

Depuis quelques années, un nouveau VtgR appelé LRP13 ou LR13+1 a été identifié chez plusieurs espèces de téléostéens comme *Morone saxatilis*, *M. americana*, *Cynoglossus semilaevis*, *Oryzias latipes* et *Oncorhynchus clarki* (Mushirobira et al., 2015 ; Reading et al., 2014 ; Wang et al., 2017) avec 13 LBR dans le LBD au niveau de l'extrémité N-terminale et un LBR dans la LBD au niveau de l'extrémité C-terminale (Hiramatsu et al., 2013). Deux gènes de LRP13 ont été observés chez *Cynoglossus semilaevis* (Wang et al., 2017). Des LRP d'espèces initialement annotés LRP1, LRP1B et LRP2 ont été reannotés LRP13 dans la base de données NCBI au regard de leur séquence en acides aminés et de leur expression (**Figure 31**) (Wang et al., 2017).

Les VtgR sont exprimés de façon prédominante dans l'ovaire et de façon modérée dans les tissus non ovariens comme le cerveau, l'intestin et les branchies (Mizuta et al., 2013 ; Xu, 2016). LR8+ est exprimé fortement dans les tissus somatiques et LR8- est exprimé principalement dans l'ovaire (Mizuta et al., 2013 ; Pousis et al., 2012). LRP13 est exclusivement exprimé dans l'ovaire (Wang et al., 2017). Le taux de VtgR est élevé dans les ovocytes au cours de la prévitellogenèse, suivi d'une diminution progressive dans les ovocytes en vitellogenèse (Li et al., 2003 ; Luo et al., 2013 ; Mushirobira et al., 2015 ; Pousis et al., 2012 ; Xu, 2016). En fin de vitellogenèse, les VtgR deviennent à peine détectables (Mizuta et al., 2013) et les niveaux de E2 et Vtg augmentent (Pousis et al., 2012).

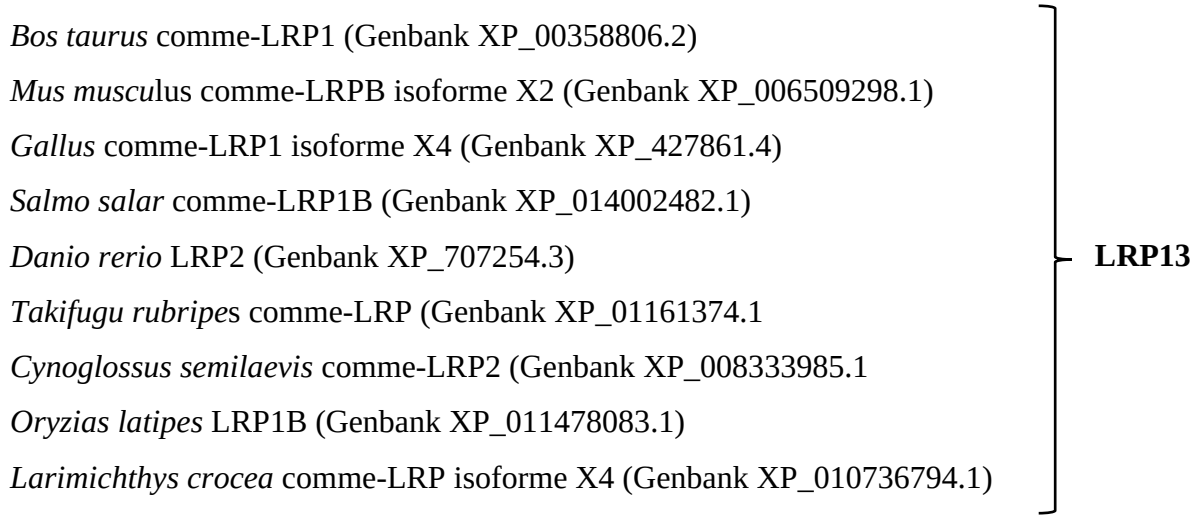


Figure 31 : LRP1, LRP1B et LRP2 re-annotés LRP13, d'après (Wang et al., 2017)
LRP : protéine liée au LDLR.

5.4 La choriogénine

L'enveloppe vitelline des téléostéens est composée de deux couches (**Figure 32**) : une couche externe (Zre) et une couche interne (Zri). La couche interne encore appelée chorion est formée de quatre sous couches L1, L2, L3 et L4 (Murata et al., 2014).

La Choriogénine (Chg) est une glycoprotéine (Lee et al., 2002) identifiée comme un nouveau précurseur (Hara et al., 2016) des glycoprotéines du chorion (ChG). Les composantes majeures de la ChG (ChG1, ChG2 et ChG4) jouent un rôle interactif important avec le sperme pendant la fécondation (Murata et al., 2014).

La Chg a été purifiée chez plusieurs espèces de poissons, entre autres, *Oryzias latipes* (Ishibashi et al., 2016 ; Lee et al., 2015 ; Yu et al., 2006), *Salmo salar* (Celius & Walther, 1998), *Oncorhynchus masou* (Fujita et al., 2002), *Gadus morhua* (Fujita et al., 2009) et *Menidia beryllina* (Brander et al., 2012). Elle comprend trois sous types : la ChgH de poids moléculaire beaucoup plus importante que la ChgL (Fujita et al., 2002 ; Yu et al., 2006) et la ChgH-minor (Ishibashi et al., 2016 ; Kawaguchi et al., 2010 ; Yamaguchi et al., 2015). ChgH et ChgH-minor sont les précurseurs de ChG1 et ChG2. ChgL est le précurseur de ChG4 (Yamaguchi et al.,

2015). La Chg est l'homologue de la protéine de la zone pellucide des mammifères (Fujita et al., 2002 ; Yu et al., 2006).

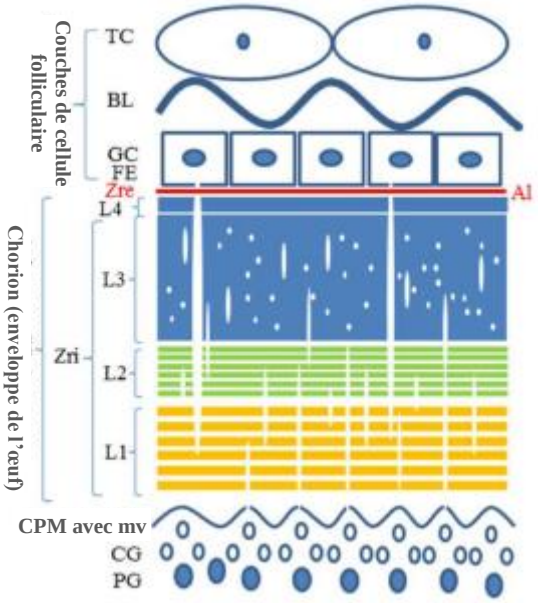


Figure 32 : Schématisation du chorion ovarien de *Acipenser transmontanus*, d'après Murata et al. (2014).
Zre : couche externe du chorion, Zri : couche interne du chorion, Al : couche adhésive probablement équivalent à Zre, TC : cellules de thèque, BL : lame basale, GC : cellules de la granulosa, FE : épithélium folliculaire, CPM : membrane cytoplasmique, mv : microvillosités, CG : granulés corticaux, PG : granulés de pigment.

Comme la Vtg, la Chg est synthétisée et sécrétée par le foie en réponse à la stimulation par l'E2. Elle est transportée dans le sang jusqu'à l'ovaire pour y être incorporée (comme indiqué précedemment dans la **Figure 26**) et former l'enveloppe interne des œufs (Hara et al., 2016 ; Yu et al., 2006). Il a été découvert chez *Acipenser transmontanus* que les glycoprotéines du chorion sont exprimées à la fois dans le foie, les ovocytes et les cellules folliculaires de l'ovaire (Murata et al., 2014).

Non seulement, la Chg joue un rôle clé dans le processus d'ovogenèse, mais au même titre que la Vtg elle est également utilisée comme biomarqueur de l'exposition aux estrogènes (Brander et al., 2012 ; Hara et al., 2016 ; Ishibashi et al., 2016). On détecte plus facilement la Chg que la Vtg chez des poissons mâles induits avec de faibles doses d'estradiol (Celius & Walther, 1998 ; Lee et al., 2002 ; Yu et al., 2006).

Les Chg possèdent un peptide signal, un domaine répétitif de séquence d'acides aminés et un domaine non répétitif (**Figure 33**). La ChgH de certaines espèces ne possède que le domaine non répétitif ; c'est le cas de *Danio rerio* et *Salmo salar* (Lee et al., 2002).

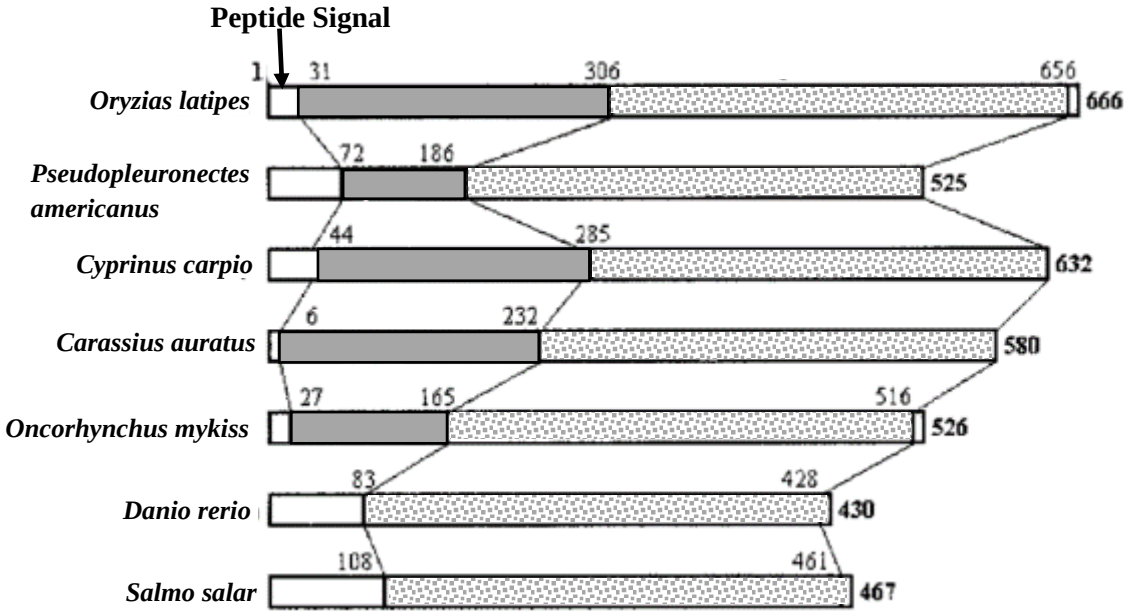


Figure 33 : Structure de la choriogénine H de certains téléostéens, d'après Lee et al. (2002). Les chiffres représentent la position des acides aminés. La choriogénine comprend deux domaines qui sont le domaine répétitif (en gris) et le domaine non répétitif (motifs en pointillés). Aucun domaine répétitif n'est observé chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) ou le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*)

6. Objectifs de la thèse

A. gigas (Schinz, 1822), dont la distribution est limitée au bassin amazonien, et *H. niloticus* (Cuvier, 1829), dont la distribution est limitée aux bassins hydrographiques d'Afrique tropicale, sont deux espèces phylogénétiquement sœurs à l'intérieur du clade des Ostéoglossomorphes. Ces deux espèces présentent un grand intérêt à la fois pour la compréhension de l'évolution des téléostéens, pour la pêche et la pisciculture. Depuis quelques années, les pêcheries de *A.* gigas et *H.* niloticus sont surexploitées et ces deux espèces se raréfient dans le milieu naturel. L'élevage en étang de ces deux espèces, à fort potentiel aquacole, apparaît donc comme la meilleure alternative pour leur permettre de continuer à contribuer à la sécurité alimentaire et économique des populations humaines dans leurs différentes aires de distribution.

Alors que la plupart des espèces de poissons d'élevage présentent un dimorphisme sexuel qui facilite leur gestion, aucune caractéristique externe n'est disponible pour distinguer le sexe de *A. gigas* et *H. niloticus* en dehors de la saison de reproduction. Par ailleurs, la variabilité génétique de leurs populations natives ou introduites est insuffisamment connue surtout pour *Heterotis*. Les pisciculteurs de ces deux espèces sont donc face à un défi : celui de mettre en place des cycles de reproduction en captivité alors que le sexage est compliqué, que la formation de couples de reproducteurs est difficile, sans oublier le choix de reproducteurs à fort potentiel génétique pour lequel les données sont absentes. Les verrous qui limitent la maîtrise de l'élevage de *A. gigas* et de *H. niloticus* seront probablement levés lorsqu'on aura mieux compris les stratégies de reproduction de ces deux espèces.

Dans le cadre de cette thèse, il s'agit de mieux connaitre la ressource génétique *Heterotis* et de comparer ses traits de reproduction avec *A. gigas* en situation expérimentale, afin d'identifier les caractéristiques génétiques, physiologiques et comportementales partagées ou différenciées entre les deux espèces sœurs et d'utiliser ces caractéristiques pour une meilleure maîtrise de leur reproduction et de leur élevage.

Une partie de ce travail vise à déterminer la structure génétique des populations de *H. niloticus* pour laquelle très peu de données sont disponibles. En effet, l'une des rares études réalisées par Hurtado et al. (2013) avec comme marqueur moléculaire les microsatellites a permis de caractériser les populations sauvages de trois bassins versants du Bénin. Alors que cette espèce

a fait l'objet de nombreuses introductions dans diverses zones de l'Afrique, aucune étude ne s'est intéressée à la génétique des populations introduites, en particulier celle du Sud de la Guinée, de la Côte d'Ivoire et du Sud du Cameroun. Il n'existe pas de données de génétique des populations sur les stocks d'élevage et utilisant comme marqueur l'ADN mitochondrial qui est une molécule à hérédité maternelle et qui se révèle intéressant pour étudier l'histoire démographique des populations. *H. niloticus* ayant été introduit en Côte d'Ivoire (Afrique de l'ouest), une comparaison avec les populations provenant d'autres pays (Guinée et Cameroun) permet de déterminer l'origine géographique des Heterotis de Côte d'Ivoire. L'échantillonnage de populations sauvages introduites et des stocks d'élevage de différents bassins versants est réalisé pour mieux appréhender la variabilité génétique (**Figure 34**).

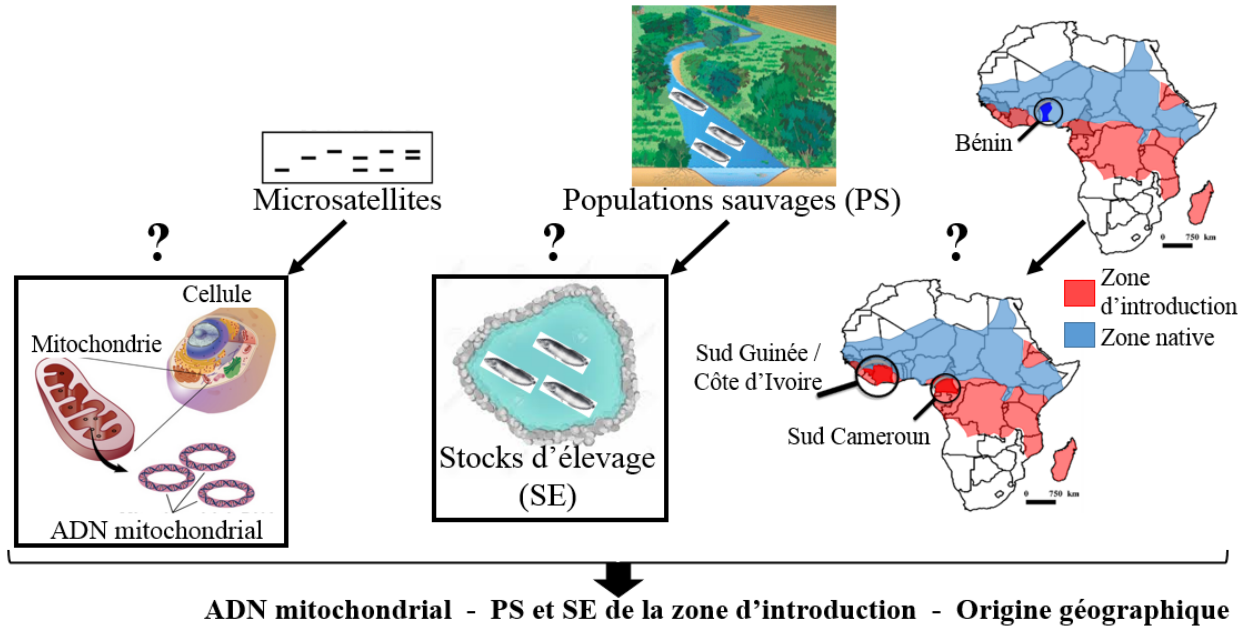


Figure 34 : Etat des lieux des études de génétiques des populations de *H. niloticus* et objectif de la thèse. Une des rares études réalisées par Hurtado et al. (2013) avec comme marqueur moléculaire les microsatellites a permis de caractériser les populations sauvages de trois bassins versants du Bénin (en bleu foncé). Les points d'interrogation indiquent qu'il n'existe aucune donnée sur la génétique des populations introduites (en particulier celle du Sud de la Guinée, de la Côte d'Ivoire et du Sud du Cameroun en rouge foncé) et les stocks d'élevage avec comme marqueur moléculaire l'ADN mitochondrial.

Les travaux de recherche s'intéressent aussi aux aspects de la reproduction de *A. gigas* et *H. niloticus* liés à la régulation endocrinienne et au comportement reproducteur. Il s'agit de réaliser des analyses transcriptomiques et protéomiques de différents organes et tissus qui visent principalement à identifier et caractériser la structure des vitellogénines (Vtg) et d'autres acteurs neuroendocriniens impliqués dans la reproduction de *A.* gigas et *H.* niloticus. Cela permet d'ouvrir la voie à l'étude de leur expression chez ces deux espèces. Une technique de sexage de *H. niloticus* est également mise au point. En effet, c'est grâce à une méthode peu invasive, qui a été développée par des chercheurs de l'IRD et leur partenaire sud-américain du IIAP (Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana) pour faire le sexage d'*Arapaima* à partir d'un prélèvement sanguin, qu'a été tenté le sexage de *H. niloticus*. Cette méthode se base sur la détection de Vtg plasmatique immunoréactive et n'est applicable que chez les individus adultes ayant acquis la maturité sexuelle. Il s'agit désormais de transférer cette méthode chez *Heterotis*. Le sexage va reposer aussi sur la détection de la Vtg dans le mucus qui est beaucoup plus facilement accessible que le sang. La compréhension du comportement reproducteur de *A. gigas*, pour lequel on dispose d'une méthode de sexage fiable, complète cet aspect de la thèse. Il s'agit de réaliser une étude en étang de pisciculture par l'utilisation d'un système de positionnement par émetteurs ultrasoniques afin d'identifier les mécanismes de formation des couples au sein d'un groupe de plusieurs reproducteurs de sexe connu.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

1. Etude de la variabilité génétique des populations de *H. niloticus*

1.1 Les échantillons de *H. niloticus* utilisés

Nous avons échantillonné des individus mâtures de *H. niloticus* collectés dans quatre bassins versants (BV) et 9 fermes piscicoles de la Côte d'Ivoire (**Figure 35**). Il s'agit du lac Buyo du BV de Sassandra, du lac Kossou, des rivières Kan et Bardikeli du BV de Bandama, de la rivière Besselê du BV de la Comoé et du lac Ayamé du BV de la Bia. En collaboration avec l'ONG APDRA (Association Pisciculture et Développement Rural en Afrique Tropical humide) qui réalise des projets piscicoles en Afrique de l'Ouest et du Centre, nous avons obtenu des échantillons provenant de la zone d'introduction de *H. niloticus* de deux autres pays. Ce sont le Cameroun (BV du Nyong et une ferme piscicole) et la Guinée (7 fermes piscicoles) (**Figure 35**). Au total 406 individus issus aussi bien du milieu naturel (fleuves, rivières et lacs) que des étangs de pisciculture ont été échantillonnés dans le but de comparer les populations sauvages introduites et de pisciculture (Lundrigan et al., 2005 ; Sekino et al., 2002 ; Wang et al., 2012). Les échantillons ont été collectés auprès de pêcheurs et pisciculteurs de novembre 2015 à août 2017.

L'obtention d'échantillons natifs de l'aire de distribution de *H. niloticus* n'a pas été possible malgré les nombreuses sollicitations formulées auprès des acteurs locaux impliqués dans la gestion des ressources halieutiques des pays concernés (Cameroun, Guinée, Burkina). Ces échantillons auraient permis d'analyser des paramètres démographiques et l'histoire évolutive de cette espèce.

Aussitôt après capture, sur chaque individu, des échantillons de nageoires ou de muscles (environs 100 mg) ont été prélevés pour être conservés dans de l'éthanol à 95°C. Après 24 heures, l'éthanol a été renouvelé et les échantillons ont été conservés à -20°C avant l'extraction de l'ADN. Tous les poissons échantillonnés issus de la pisciculture étant vivant, après le prélèvement d'une partie de la nageoire anale, les poissons ont été relâchés dans les étangs.

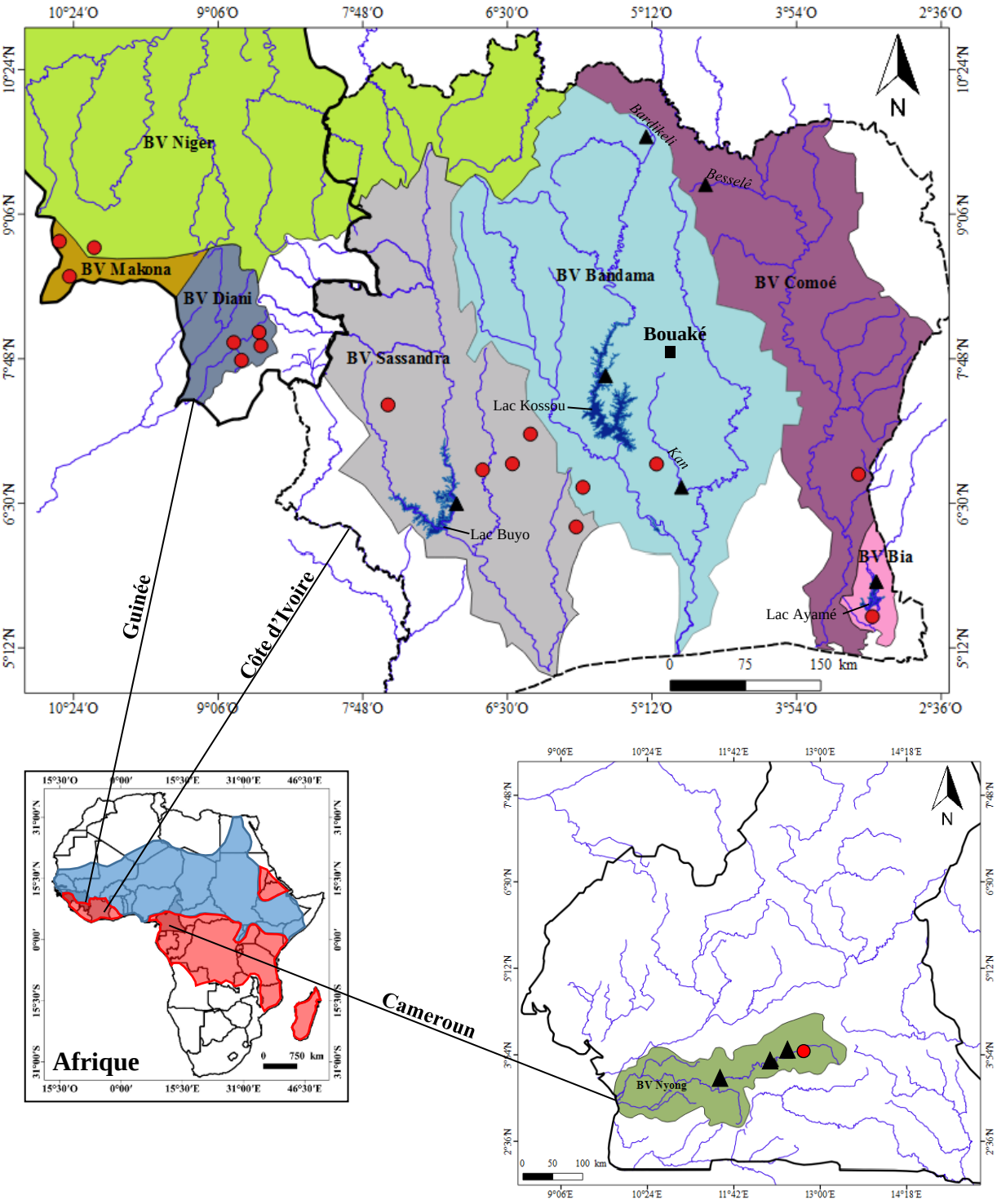


Figure 35 : Sites de collecte d'échantillons de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun. Les ronds rouges représentent les sites de collecte des poissons de pisciculture et les triangles noirs représentent ceux du milieu naturel dans quatre bassins versants (BV) de la Côte d'Ivoire et dans le bassin du Nyong au Cameroun. Les lignes bleues désignent les cours d'eau principaux et les zones bleu foncé sur la carte de la Côte d'Ivoire représentent les lacs de barrages hydroélectriques où *Heterotis* a fait l'objet d'introduction. Sur la carte de l'Afrique où figurent les limites des différents pays en trait noir, la couleur bleue représente les zones d'origine de *H. niloticus* et la couleur rouge représente les zones d'introduction.

1.2 Extraction, amplification et séquençage d'ADN

Les principales étapes au laboratoire en Bolivie ont concerné l'extraction de l'ADN et son amplification ; le séquençage a ensuite été réalisé par prestation de service par GenoScreen.

1.2.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN a commencé avec le kit de purification de l'ADN génomique Wizard (Promega) et s'est poursuivie avec le protocole CTAB (Doyle & Doyle, 1987) qui après sa mise au point a nécessité moins de matériel biologique, soit 2 mg contre 25 mg avec le kit Wizard.

a) Avec le Kit Wizard

Concernant le kit Wizard, 25 mg de nageoire ou de muscle ont été découpés et mélangés à 144 µl d'EDTA (0,5 M pH 8), 600 µl de solution de lyse nucléaire et 17,5 µl de protéinase K (20 mg/ml). Le mélange obtenu est homogénéisé et incubé à 55°C pendant une nuit. Après ajout de 3 µl de RNAse et une incubation à 37°C pendant 20 min., on laisse reposer pendant 5 min. à température ambiante. La précipitation des protéines est réalisée avec l'ajout de 200 µl de solution de précipitation de protéines. Le tout est homogénéisé, centrifugé à vitesse maximale pendant 20 s et passe 5 min. dans la glace avant d'être centrifugés à nouveau à 14000 g pendant 5 min. Les protéines précipitent et le surnageant qui contient de l'ADN est transféré dans un nouveau tube auquel on ajoute 600 µl d'isopropanol maintenu à température ambiante pour permettre à l'ADN de former une pelote. Après centrifugation à 14000 g pendant 1 min., l'ADN est précipité et le surnageant est éliminé. Un lavage avec 600 µl d'éthanol à 70% suivi d'une centrifugation à 14000 g pendant 1 min. sont répétés 3 fois. L'éthanol est éliminé et l'ADN est repris dans 100 µl de solution de réhydratation suivi d'une incubation à 65°C pendant une heure avant d'être conservé à -20°C.

b) Avec la méthode CTAB

Le tampon d'extraction est composé d'un mélange de CTAB 5%, de NaCl 5M, de EDTA 0,5 M pH 8 et de de Tris 1 M. Pour favoriser la lyse cellulaire, un volume de 500 µl de ce tampon

porté à 59°C et 5 µl de protéinase K (20 mg/ml) sont ajoutés à l'échantillon de nageoire ou de muscle et le tout est incubé dans un bain marie à 95°C pendant une nuit. En ajoutant 500 µl de Chloroforme et après avoir mélangé délicatement pendant 5 min., les tubes sont centrifugés pendant 5 min. à 8000 rpm. Au surnageant recueilli dans un nouveau tube Eppendorf, 600 µl d'isopropanol réfrigéré sont ajoutés, le tout est mélangé délicatement pendant 2 min. et conservé pendant une heure à -20°C. Il s'en suit une centrifugation à 14000 rpm pendant 15 min. L'observation d'un pellet au fond du tube présage que l'ADN est présent. L'isopropanol est éliminé délicatement du tube et deux séries de lavage/centrifugation du pellet sont réalisées avec 600µl d'éthanol 70% à 14000 rpm. L'ADN, obtenu après élimination de l'éthanol, est repris dans 100 à 150 µl d'eau MilliQ et conservé à -20°C.

Quelle que soit la méthode utilisée, l'efficacité de l'extraction d'ADN a été vérifiée au moyen d'un spectrophotomètre. L'intégrité a été mesurée par le ratio d'absorbance 260/230, la pureté par le ratio 260/280 et la concentration est exprimée en µg/g. Une électrophorèse en gel d'agarose 1% a été réalisée en utilisant du tampon TBE 1x et 4 µl SYBR (Invitrogen, 10 000 X concentré dans du DMSO) dont le rôle est de permettre la détection par fluorescence de l'ADN dans l'agarose. Un mélange de 4 µl d'extrait d'ADN et 1 µl de Loading buffer 10X est déposé dans les puits du gel. La migration a été réalisée à 100 V pendant 25 à 30 min. Le résultat a été observé avec un transilluminateur de lumière UV.

1.2.2 Choix des marqueurs moléculaires et PCR

a) Les gènes utilisés

Un marqueur génétique est considéré idéal pour faire de la phylogéographie lorsqu'il est polymorphe (variable entre individus), discriminant (différencie les individus ou populations apparentés), co-dominant (les hétérozygotes sont visibles), non épistatique (indépendant de l'expression des autres marqueurs) et varie de façon neutre (quel que soit l'allèle présent au locus, la valeur sélective de l'individu est la même), reproductible d'une expérience à l'autre, manipulable à grande échelle et économique (Nikolic, 2009).

Il existe plusieurs marqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés pour déterminer la variabilité génétique des populations de *H. niloticus*. Les analyses réalisées ont porté principalement sur l'ADN mitochondrial (ADNmt). Faute de temps, les travaux concernant les microsatellites déjà définis pour cette espèce (**Annexe 1**) (Carrera et al., 2011 ; Hurtado et al., 2013), se sont limités dans cette thèse à la mise au point de panels (**Annexe 2**).

Diverses parties du génome mitochondrial sont employées pour comprendre l'histoire et la démographie des espèces vivantes (Hrbek & Farias, 2008). Les amorces mitochondriales développées pour *A. gigas* concernant les gènes Cyt b, ATPase et NADH1 (**Annexe 3**) ont été testées sans succès sur *H. niloticus*. Sur diverses régions de l'ADN mitochondrial de *H. niloticus* testées, deux ont permis d'obtenir correctement des amplificats dans le cadre de cette étude. Il s'agit du gène cytochrome b (Cyt b) de 1141 paires de base (Genbank AB035240) et d'une région incluant le rRNA 16S, le tRNA-Leu, le NADH1 et le tRNA-Ile (segment NADH1) de 2813 paires de bases (Genbank NC_015081). Les gènes Cyt b et NADH1 ont été utilisés dans de nombreuses études (Buathong et al., 2015 ; Hrbek & Meyer, 2003 ; Hrbek et al., 2005 ; Kumazawa & Nishida, 2000 ; Lavoué & Sullivan, 2004; Page & Hughes, 2010 ; Skibinski, 2000) et ont permis d'établir les caractéristiques phylogéographiques de certaines espèces d'*Osteoglossidae* (Mu et al., 2012).

b) Amplification

Les PCR d'ADNmt ont été réalisées au laboratoire PROVETSUR de l'UAGRM en Bolivie, en utilisant le kit Qiagen pour obtenir un produit final de 25 µl à partir de 12,5 µl de Mix tag 2X, 2,5 µl de Q-solution, 3µl d'ADN, des volumes d'amorces et de H_2O pure respectivement de 0,62 µl et 5,76 µl pour le Cyt b, 1µl et 5 µl pour le segment NADH1. Les couples d'amorces utilisés sont présentés dans le **Tableau 11**. L'amplification de l'ADNmt a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf) sous les conditions suivantes : première dénaturation à 95°C pendant 1 min. (Cyt b) et 3 min. (NADH1) suivie de 40 cycles à 94 °C en 30 s (2^{e} dénaturalisation), 54°C en 1 min. 30 s (Cyt b) et 50°C en 30 s (NADH1) pour l'hybridation, 72°C en 1 min. 30 s (Polymérisation), 72°C en 10 min. (renaturalisation) et 4°C pour l'extension finale. Pour valider l'efficacité de l'amplification, chaque produit a été examiné par électrophorèse sur gel d'agarose dans les mêmes conditions que l'ADN comme indiqué précédemment avec comme marqueur de taille du PBR 322. Les produits de PCR attendus sont

respectivement de 1027 et 1323 paires de bases respectivement pour le Cyt b et le segment NADH1.

Tableau 11 : Amorces utilisées pour la PCR du gène Cyt b et du segment NADH1 de *H. niloticus*.

Gènes ADNmt	Genbank	Taille du gène (pb)	Amorces	Produit PCR (pb)
Cyt b	AB035240	1141	F 5'-TCCACATGATGAAACTTTGG-3' R 5'-TTGTTAGTGGGGCGAGTAGG-3'	1027
Segment NADH1	NC_015081	2813	F 5'-GACCCTATGGCTTACTACAACC-3' R 5'-TCAGATGCTTTCTTGAGTGG-3'	1323

1.2.3 Séquençage

Les produits de PCR de Cyt b et du segment NADH1 de *H. niloticus* ont été séquencés en prestation par GenoScreen suivant la méthode Sanger également appelée « méthode de terminaison de chaîne » (Sanger et al., 1977). Cette méthode comprend trois étapes principales (https://www.sigmaaldrich.com/).

La première étape consiste à générer n fragments d'ADN de différentes longueurs, chacun terminé par un nucléotide marqué, où n est le nombre de bases de nucléotides dans la séquence d'ADN cible. Ceci est fait en combinant amorce ADN, nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ADN polymérase, la séquence d'ADN d'intérêt et des di-désoxynucléotides marqués (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Les di-désoxynucléotides ne possédant pas le groupe 3'-OH nécessaire pour poursuivre la chaîne, aucun nucléotide ne peut être ajouté à la chaîne d'ADN une fois les di-désoxynucléotides incorporés, de sorte que chaque fragment se termine par un nucléotide marqué.

La deuxième étape consiste à séparer les n séquences d'ADN par la longueur en utilisant une électrophorèse sur gel capillaire. Les fragments les plus courts se déplacent plus rapidement

que les fragments les plus longs. Le résultat est que les fragments d'ADN sont introduits dans la troisième étape, de la séquence la plus courte à la plus longue.

Dans la troisième étape, un laser excite le marqueur sur le nucléotide à la fin de chaque séquence. Chaque base est marquée avec un marqueur différent, de sorte que la lumière émise par chaque nucléotide excité peut être liée à la base correcte. Le laser génère un chromatogramme montrant le pic fluorescent de chaque nucléotide. Le chromatogramme contient les nucléotides dans le bon ordre en raison de l'électrophorèse.

Le nombre d'échantillons collectés et séquencés selon le pays de provenance est présenté dans le **Tableau 12**. 106 individus ont pu être séquencés pour le Cyt b et 99 pour le segment NADH1. Certains individus n'ont pu être séquencés à la fois pour ces deux groupes de gènes. La matrice concaténée comporte donc 64 séquences complètes.

Tableau 12 : Provenance et nombre d'échantillons collectés et séquencés pour les gènes Cyt b et NADH1 de l'ADNmt de *H. niloticus*. Le nombre d'individus séquencés à la fois pour Cyt b et le segment NADH1 est indiqué entre parenthèses.

	Provenance des échantillons			
	Côte d'Ivoire	Cameroun	Guinée	Total
Echantillons populations sauvages	85	28	-	113
Cyt b	17	14	-	31
Segment NADH1	19 (8)	13 (7)	-	32 (15)
Echantillons stocks d'élevage	213	10	70	293
Cyt b	36	5	34	75
Segment NADH1	40 (22)	3 (3)	24 (24)	67 (49)
Total échantillons collectés	298	38	70	406
Total Cyt b	53	19	34	106
Total Segment NADH1	59 (30)	16 (10)	24 (24)	99 (64)

1.3 Analyse des données

1.3.1 Alignement des séquences

Pour l'édition de données de séquences d'ADN issues du séquençage, l'exploration de bases de données web, la réalisation d'alignements de séquence automatique et manuel, le logiciel Mega 7 a été utilisé (Kumar et al., 2016). Ces analyses ont permis de définir les différents haplotypes de Cyt b, du segment NADH1 et des deux gènes concaténés.

1.3.2 Biogéographie des haplotypes

Une cartographie des haplotypes par zone de collecte a été réalisée avec le logiciel QGIS 2.18 (Equipe de développement QGIS, 2016. Système d'information géographique QGIS. Projet Open Source Geospatial Foundation. Http://www.qgis.org/).

Pour tester les hypothèses sur la distribution de fréquences des haplotypes, des tests exacts de Fisher ont été réalisés à l'aide du package R Commander (Fox, 2005) du logiciel R ver 3.5.3.

1.3.3 Diversité nucléotidique et haplotypique

Pour l'analyse du polymorphisme des séquences, la diversité nucléotidique (π) et la diversité haplotypique (Hd) ont été déterminées en utilisant le logiciel DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). La diversité nucléotidique ($\pi = \frac{moyenne(\delta ij)}{L}$) est le nombre moyen de différence nucléotidique par site entre 2 séquences avec δij représentant la différence nucléotidique entre deux séquences i et j, et L la longueur des séquences (Lynch & Crease, 1990). Les résultats attendus se présentent comme suit : π = 0, pas de divergence nucléotidique (mêmes haplotypes) ; $\pi \leq 0{,}05$, divergence faible ; à partir de $\pi > 0{,}10$, divergence forte ; π = 1, divergence maximal, aucun nucléotide en commun (Grant & Bowen, 1998). La diversité haplotypique ($Hd = 1 - \sum pi^2$) avec *pi* la probabilité de tirer l'haplotype de rang *i* (Nei, 1987). Les résultats attendus se présentent comme suit : *Hd* = 0, diversité la plus faible (1 seul haplotype) ; *Hd* = 1, diversité maximale (1 haplotype différent pour chaque séquence).

Le nombre de sites polymorphiques, le nombre de transitions, de transversions et d'insertions-délétions ont été décrites avec le logiciel Arlequin ver 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

1.3.4 Relation phylogéographique entre les haplotypes

Pour aligner les séquences, pour estimer les distances génétiques et construire les phylogénies (Tamura et al., 2007), le logiciel Mega 7 a été utilisé (Kumar et al., 2016). Les séquences de Cyt b et du segment NADH1 ont été concaténées afin d'obtenir l'arbre de Maximum de vraisemblance (ML) phylogéographique le plus informatif et robuste possible. Puis, pour chaque marqueur un arbre ML avec le modèle Tamura-Nei a été réalisé afin de déceler les informations apportées par chacun d'eux. La robustesse des nœuds de chaque embranchement à était testée à l'aide de la méthode du bootstrap avec 1000 réplicas.

Afin de mettre en évidence la généalogie d'haplotypes et son lien avec la géographie, des réseaux d´haplotypes ont été construits en utilisant la méthode de « Median Joining » (MJ) (Bandelt et al., 1999) suivi par un traitement de Maximum de Parcimonie implémentés dans le logiciel Network 5.0.1.1 (Fluxus Technology).

1.3.5 Analyse de variance moléculaire (AMOVA)

Le test exact de Fisher compare uniquement des distributions de fréquences d'haplotypes. Pour intégrer aussi les degrés de divergence nucléotidique entre haplotypes dans les comparaisons de distribution, l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) a été réalisée (Excoffier & Slatkin, 1995) avec le logiciel Arlequin ver 3.5.2.2. La différentiation entre les zones de distribution prises deux à deux a été estimée en utilisant la statistique de l'estimateur de Fst (Wright, 1978) avec le logiciel Arlequin ver 3.5.2.2 tenant compte aussi de la divergence nucléotidique. L'index de fixation Fst mesure la différenciation des populations à partir du polymorphisme génétique. Si le Fst est égal ou très proche de 0, cela signifie qu'il y a peu de différenciation génétique entre les populations comparées. A l'inverse, plus le Fst tend vers 1, plus la différenciation génétique entre les populations est forte.

2. Approches transcriptomiques et protéomiques

2.1 Echantillonnage et prélèvements tissulaires

Les tissus étudiés sont l'hypophyse, l'ovaire et le foie de *A. gigas* et *H. niloticus* pour les analyses transcriptomiques et pour les analyses protéomiques, ce sont le sang et le mucus de *H. niloticus* qui ont été prélevés (**Tableau 13**). Les échantillons de *H. niloticus* proviennent d'une ferme piscicole située au centre de la Côte d'Ivoire (5°08,713' W ; 6°50,929' N) à proximité de la capitale politique Yamoussoukro. Pour *A. gigas*, les échantillons ont été prélevés à la station expérimentale de l'Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) située à Iquitos au Pérou. Les prélèvements tissulaires ont été réalisés sur des poissons anesthésiés dans de l'eau contenant de l'éthanol à 96° (dilution au 10^{e}) (Bhanu & Philip, 2011). Les prélèvements ont été réalisés sur des individus mâles et femelles (sexe connu après dissection) en période de reproduction (mois de mai et juin).

Pour le séquençage en RNAseq du foie, de l'ovaire et de l'hypophyse, des pools d'échantillons prélevés sur trois femelles ont été conservés dans du RNAlater (Sigma) à 4°C. Pour les analyses protéomiques du sang et du mucus, le milieu d'extraction est composé de PBS 200 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM et PMSF 400 mM et les échantillons sont conservés à -80°C en attendant l'extraction.

Tableau 13 : Organes prélevés chez *A. gigas* et *H. niloticus* pour le transcriptome et le protéome. Les tirets indiquent que l'organe n'a pas fait l'objet d'analyse.

Organes	Pour les transcrits	Pour les protéines
Hypophyse	♀	-
Ovaire	♀	-
Foie	♀	-
Mucus	-	♂♀
Sang	-	♂♀

2.2 Approches transcriptomiques

2.2.1 Extraction des ARN

Les ARN totaux de chaque pool de tissus sont extraits séparément. Les organes sont broyés dans de l'azote liquide et 50 à 100 mg de poudre de tissus sont mélangés à 1 ml de TRizol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et l'extraction est réalisée selon les recommandations du fabriquant. Les concentrations en ARN totaux sont déterminées au moyen d'un dosage spectrophotométrique (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La qualité et l'intégrité des ARN totaux sont vérifiées respectivement à partir du ratio des absorbances A260/A280 et A260/A230. La concentration des ARN est ajustée à 50 ng/µl avec de l'eau stérile et 20 µl de cette solution (1µg) sont déposés dans des tubes RNA stable (Sigma) et séchés au speed vac.

2.2.2 Séquençage et traitement bioinformatique

a) Séquençage Illumina, assemblage et annotation

Les échantillons d'ARN ont été séquencés par la plateforme Génome Québec (http://www.genomequebec.com/ressources-et-plateformes-technologiques.htlm) sur un séquenceur Illumina HiSeq4000 en mode pairé 2 x 100pb.

Les lectures brutes ont été nettoyées et filtrées et les traces d'adaptateurs ont été éliminés à l'aide de Trimmomatic v.0.33 (http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic). Les lectures ont été filtrées en utilisant un seuil de qualité de 30 et une taille minimale de 50 paires de bases. SortMeRNA v2.1 a été utilisé pour filtrer les ARN ribosomaux à partir des reads (Kopylova et al., 2012). Enfin, le processus de nettoyage a été vérifié à l'aide de fastQC v.0.11.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

Les lectures nettoyées provenant des différentes librairies ont été par la suite assemblées conjointement en utilisant l'assembleur de transcriptomes *de novo* Trinity v.2.5.1 (Grabherr et al., 2011). Les abondances relatives ont été estimées à l'aide de kallisto v.0.43.1 (Bray et al., 2016). Pour obtenir la valeur d'expression (FPKM : Fragments Per Kilobase of exon per

Million fragments mapped) pour l'identification des contigs à faible couverture (FPKM <1) et des isoformes rares (<1%) exclus ultérieurement de l'analyse les deux logiciels ont été lancés via les scripts du package Trinity. La prédiction peptidique a été réalisée à l'aide de Transdecoder v.3.0.0 (Haas et al., 2013). Une recherche de similarité (blastx des transcrits assemblés et blastp des peptides prédits) a été effectuée contre la base de données uniprot-swissprot (version 09-2013). La prédiction des peptides signaux a été réalisée à l'aide de signalP v4.0 (Petersen et al., 2011). La détection des domaines transmembranaires a été réalisée en utilisant TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001). Enfin, l'annotation fonctionnelle du transcriptome a été réalisée à l'aide du pipeline Trinotate v.3.0.1 (http://trinotate.github.io) décrit par Bryant et al. (2017).

b) Prédiction des produits de gènes par analyse *in silico* des transcrits

Les analyses *in silico* des transcrits de foie, d'ovaire et d'hypophyse de *H. niloticus* issus de l'assemblage sont principalement réalisées avec le logiciel Peptraq développé en interne (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Peptraq est un logiciel dédié à l'analyse de fichiers de séquences aux formats fasta ou txt. Il permet de traduire et de filtrer les transcrits et les précurseurs protéiques sur la base de l'annotation en utilisant des mots clés ou par l'utilisation de critères structuraux liés à la présence de subséquences particulières. Peptraq est aussi capable d'assigner le peptide signal, de le cliver pour passer de la preproprotéine à la proprotéine, de réaliser les clivages des convertases et de repérer les répétitions de séquences caractéristiques des neuropeptides.

Les domaines transmembranaires sont prédits par TMHMM v2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). Les structures secondaires sont obtenues par alignement avec des protéines d'espèces dont les domaines sont connus ou en recherchant les domaines conservés sur le site de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgir). La modélisation des structures tertiaires est réalisée sous I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Les sites de N-glycosylation sont identifiés sous NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Les séquences nucléiques et protéiques sont alignées sur Show translation (https://www.bioinformatics.org/sms/show_trans.html). Les alignements de séquences protéiques de différentes espèces sont réalisés sous CLC Sequence Viewer 7.6.1

(http://www.clcbio.com). Les identités en acides aminés entre séquences protéiques sont déterminées par Protein Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.3 Approches protéomiques ciblée sur la recherche de Vtg

2.3.1 Préparation d'échantillons pour analyse par spectrométrie de masse

Les échantillons soumis à l'analyse protéomique ont d'abord été décongelés dans l'eau glacée et centrifugés pendant plusieurs minutes. Les protéines sont précipitées à raison de 20 µl pour 120 µl d'acétone réfrigérée. Après une nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés à 20 000 g pendant 20 minutes. Le culot protéique est resuspendu dans un tampon bicarbonate d'ammonium (50 mM, pH 7). Les protéines sont digérées pendant une nuit à 37°C en utilisant 0,25 µg de trypsine porcine (Promega, Madison, USA). Les digestats sont dessalés et concentrés sur un ZipTip µC18 Omix (Agilent) avant analyse.

2.3.2 NanoLC – MS/MS

L'étape de chromatographie est réalisée sur un système de nano chromatographie à ultra-haute pression (NanoElute, Bruker Daltonics). Les peptides sont concentrés sur une précolonne C18 pepmap 100 (5 mm x 300 µm) (Thermo Scientific) et séparés à 50 °C sur une colonne en phase inverse Reprosil (25 cm x 75 µm, 1,6 µm, C18) (Ionopticks). Les phases mobiles sont constituées de 0,1% d'acide formique, 99,9% d'eau (v/v) (A) et 0,1% d'acide formique dans 99,9% d'ACN (v/v) (B). Le débit est fixé à 400 nl/min. et le profil de gradient est le suivant : de 2 à 15% de B en 60 min., suivi d'une augmentation à 25% de B en 30 min. et à 37% en 10 min., suivi d'une étape de lavage à 95% de B et d'un rééquilibrage à 2% de B.

Les analyses MS sont réalisées sur un spectromètre de masse TIMS-TOF (Bruker Daltonics) avec une source ionique de type nano electrospray (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). Le système est étalonné chaque semaine et la précision de la mesure de masse est supérieure à 1 ppm. Une tension capillaire de 1400 volts est utilisée pour l'ionisation. Les spectres MS sont

acquis en mode positif dans la plage de masse de 100 à 1700 m/z. Dans les expériences décrites ici, le spectromètre de masse est utilisé en mode PASEF (Parallel Accumulation-Serial Fragmentation) (Meier et al., 2015), à l'exclusion des peptides monochargés. Dix balayages PASEF MS/MS sont réalisés en 1,25 seconde à partir de la plage de charge 2-5.

2.3.3 Séquençage des peptides et identification des protéines

Le spectre de fragmentation est utilisé pour déterminer la séquence du peptide. La recherche dans la base de données est effectuée à l'aide du programme Mascot 2.6.1 (Matrix Science). Deux bases de données locales de *H. niloticus* ont été utilisées : une base de données de protéines ovariennes (437 476 entrées) et une base de protéines hépatiques (244 234 entrées), l'une et l'autre construites à partir des transcriptomes correspondants grâce au logiciel Peptraq. Les modifications variables autorisées sont les suivantes : C-carbamidométhyle, K-acétylation, oxydation et di-oxydation de la méthionine. La «trypsine» a été sélectionnée avec un mode tolérant incluant deux sites de clivage manquants (Šlechtová et al., 2015). La précision de masse a été fixée à 20 ppm et 0,05 Da pour les modes MS et MS/MS respectivement. Les données de Mascot ont ensuite été transférées vers le logiciel de validation Proline (http://www.profiproteomics.fr/proline/) pour un filtrage des données selon un seuil de signification inférieur à 0,05 et l'élimination de la redondance des protéines.

2.4 Approches fonctionnelles

Une expérimentation visant à vérifier la capacité de la Vtg à diffuser dans l'eau à partir du mucus a été réalisée. La Vtg et ses produits de clivage ont été recherchés en MS. Le mucus de 5 femelles et 5 mâles matures en période de reproduction ont été collectés et centrifugés pendant 2 min. à 15000 g. Le culot d'impuretés est éliminé et deux aliquotes de 500 µl de mucus pour chaque poisson sont déposés dans des tubes Eppendorf 1.5 ml dans lesquels 1 ml de H_2O ultra pure est ajouté. Une centrifugation de 2 min. à 15000 g permet d'obtenir deux phases dans les tubes, une phase inférieure contenant le mucus et une phase supérieure contenant de l'eau. L'ensemble est incubé pendant 2h à 26°C ± 1°C dans un bain marie. 800 µl de surnageant par aliquote sont récupérés soit un total de 1,6 ml par poisson. Les surnageants

sont complétés et acidifiés par ajout de 3,4 ml d'acide acétique (HPLC) à 0,1 % pour obtenir une solution finale de 5 ml. Cette solution acidifiée a été concentrée sur des micro-colonnes C4 pour l'identification ultérieure des petites protéines et polypeptides et l'éluât a été ensuite concentré sur des micro-colonnes C18 pour l'identification des peptides. L'éluât final est préservé dans des tubes Eppendorf avec un mélange de 1 ml d'éluât et 1 ml d'une solution de TrisHCl EDTA pH 7,6 ; PMSF (400 mM), DTT (1 mM) et le tout est conservé à -20°C.

3. Sexage des individus mâtures de *H. niloticus* et étude du comportement reproducteur de *A. gigas*

3.1 Sexage des individus matures de *H. niloticus*

H. niloticus ne présente pas de dimorphisme sexuel. Ainsi, la possibilité de déterminer le sexe des poissons par des méthodes non invasives constitue la meilleure solution pour le développement de son aquaculture. Il a été testé sur *H. niloticus* le kit de sexage de *A. gigas*. Un croisement immunologique entre la Vtg d'*Heterotis* et les anticorps anti Vtg de *A. gigas* et de *O. bicirrhosum* a été également recherché en vue de l'utilisation pour le sexage d'*Heterotis* avant d'envisager une méthode plus spécifique.

3.1.1 Test du kit de sexage de *A. gigas*

Le kit commercial de détermination du sexe de *A. gigas* est basé sur la capacité d'un anticorps à se lier spécifiquement à l'antigène pour lequel il a été développé. Le test permet de détecter des concentrations faibles de Vtg dans le sang (0,04 mg/ml). Ce kit a été testé sur 24 individus matures de *H. niloticus* de plus de 2 kg en période de reproduction issus de quatre pisciculture du centre et de l'ouest de la Côte d'Ivoire. Les opérations qui se sont réalisés aux abords des étangs à température ambiante durent environ 2 heures 30.

Des prélèvements sanguins sont réalisés au niveau de la veine caudale de chaque poisson et conservés dans des tubes contenant de l'héparine. Les échantillons de sang sont dilués par ajout de 10 ml de tampon de dilution. 1 ml de sang dilué est déposé sur une membrane Mini Array (**Figure 36)** disposée délicatement à l'aide d'une pince dans un puit de microplaque. Durant toute l'opération, on évite de toucher avec les instruments utilisés la membrane Mini Array qui contient l'anticorps anti Vtg de *A. gigas*.

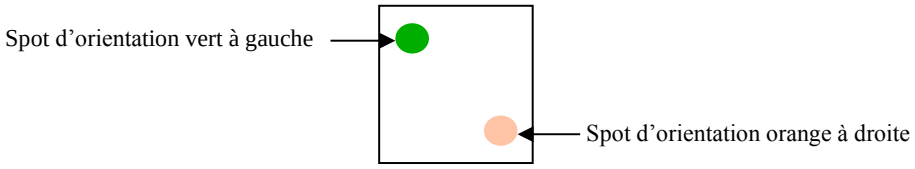


Figure 36 : Membrane mini Array du kit de sexage de *A. gigas*.

La plaque et son contenu sont incubés et agités manuellement de temps en temps pendant 1 h à température ambiante. Le sang contenu dans les puits est éliminé à l'aide d'une pipette en plastique. Entre deux puits, la pipette est rincée. Deux séries de lavage de la membrane sont réalisées avec 2 ml de tampon de lavage. Pour la révélation de l'anticorps, 1 ml de solution d'anticorps de révélation est ajouté sur la membrane suivi d'une deuxième incubation dans les mêmes conditions que la première. La solution d'anticorps de révélation est éliminée, deux séries de lavage sont réalisées comme précédemment et le tampon de lavage est éliminé.

Pour la détection de la Vtg par colorimétrie, la solution développeur est diluée dans le tampon de développement (1/135) et 1 ml est déposé dans chaque puit. Après 5 à 10 min., 1 ml de tampon d'arrêt est déposé dans chaque puits. Il apparait un spot de contrôle négatif de coloration noir-violet qui permet de valider le test et l'apparition du spot de contrôle positif de même coloration révèle la détection de la Vtg (**Figure 37**).

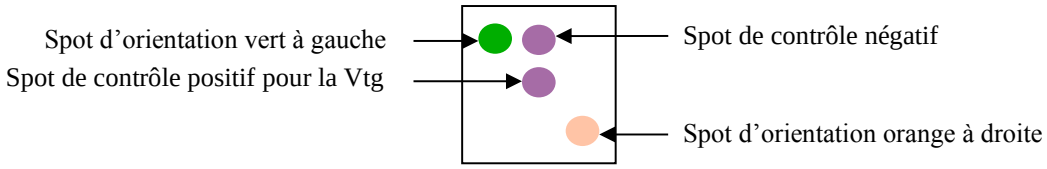


Figure 37 : Membrane Mini Array montrant la détection de la Vtg.

3.1.2 Test de l'anti corps anti Vtg de *A. gigas* et *O. bicirrhosum*

Les plasmas d'individus matures mâles et femelles de *H. niloticus* et *A. gigas* en période de reproduction ont été utilisés pour tester les anticorps anti Vtg de *A. gigas* et *O. bicirrhosum* suivant la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Ces anticorps sont disponibles dans l'équipe IRD du LMI EDIA qui les a développés. Les solutions stocks utilisées sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Solutions stocks utilisés pour les tests ELISA.

Solution stock	Composition
Tampon carbonate (0,05 M ; pH 9,6)	Phosphate monobasique (0,05 M ; pH 4,8) + phosphate dibasique (0,05 M ; pH 8,9)
Tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4)	Carbonate (0,01 M ; pH 11,2) + Bicarbonate (0,01 M ; pH 8,5)
Tampon citrate (0,2 M ; pH 5)	Acide citrique (0,1 M ; pH 2) + Phosphate dibasique (0,2 M ; pH 8,9)
PBS-T	Tampon carbonate (0,05 M ; pH 9,6) + NaCl (154 mM) + 0,05 % Tween® 20 (Sigma Aldrich)
PBS-T-NPS	PBS-T + 5% de sérum de porc (NPS)

Les étapes décrites par Chu-Koo et al. (2009) ; Ndiaye et al. (2006) ont été réalisées au cours de cette expérimentation.

1. Greffage de l'Antigène

Une série de dilutions de plasma (1000^{e}, 5000^{e}, 10000^{e}, 20000^{e}, 40000^{e}, 80000^{e} et 160000^{e}) dans du tampon carbonate (0,05 M ; pH 9,6) est distribuée dans une plaque de 96 puits et incubée pendant une nuit à 4°C.

2. Saturation

100 µl de PBS-T-NPS est ajouté dans chaque puit et la plaque est incubée pendant 30 min. à 37°C. Le contenu de la paque est vidé et chaque puits est rincé trois fois avec 100 µl de PBS-T.

3. 1ère Incubation de l'anticorps anti Vtg

Après avoir vidé le PBS-T, 100 µl d'une solution d'anticorps anti Vtg dilué au 10000e dans du PBS-T-NPS sont ajoués à chaque puits. La plaque est incubée pendant 90 min. à 37°C ou à température ambiante pendant 4 h, son contenu est vidé et chaque puits est rincé 3 fois avec 100 µl de PBS-T.

4. 2e Incubation de l'anticorps anti Vtg

Après avoir vidé le PBS-T, 100 µl d'une solution de peroxydase dilué au 3000e dans du PBS-T-NPS sont ajoutés à chaque puits. La plaque est incubée pendant 1 h à 37°C et chaque puits est rincé 3 fois avec 100 µl de PBS-T.

5. Révélation

L'activité du peroxydase est revélée à l'obscurité en ajoutant dans chaque puits 100 µl d'une solution contenant 20 ml de Tampon citrate (0,2 M ; pH 5) + 10 mg de o-PD (Thermo Fisher) + 30µl de H_2O_2. La réaction est stoppée après 30 min. en ajoutant dans chaque puits 50 µl de H_2SO_4 à 4M.

6. Mesure de l'absorbance

L'absorbance de chaque puits est mésuré à l'aide d'un lecteur de DO à 490 nm.

3.1.3 Mise au point d'un anticorps anti-Vtg spécifique de *H. niloticus*

Induction des poissons immatures à l'estradiol

Douze individus immatures de *H. niloticus* de 800 g environ ont été induits avec une solution contenant de l'estradiol (2 mg/ml), du PBS 20mM et de l'huile d'arachide 1%. Chaque poisson identifié à l'aide d'une puce électronique a reçu 7 injections (280 µl/injection) espacées de 48 h. 2 ml de sang ont été prélevés sur chaque poisson avant l'induction et 48 h après la 7e injection. Le sang a été conservé dans des tubes contenant 25 µl d'héparine avant d'être centrifugés pendant 3 min. à vitesse maximale. Deux gouttes de PMSF (10 mM) ont été ajoutées au plasma recueilli et les échantillons ont été conservés à -20°C.

Purification de la Vtg

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée avec les 12 plasmas induits à l'estradiol à 80 V / 100 min. / TA / 0,75 mm d'épaisseur à 7,5 % + SDS 0,1%. Les bandes correspondant à la Vtg (environ 10 µg/bande) sont découpées, homogénéisées au potter à piston et conservées à -80°C par aliquote de 100 µg.

Production d'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*

La production d'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* a été réalisée au laboratoire PROVETSUR de l'UAGRM de Bolivie.

Deux lapins communs d'élevage ont été immunisés avec des solutions émulsifiées de Vtg (50% de Vtg à 200 mg / ml dans du NaCl à 9%, adjuvant complet de Freund (Sigma) à 50%). Chaque lapin a reçu une injection toutes les semaines pendant 4 semaines, puis deux injections de solutions de Vtg et d'adjuvant incomplet de Freund toutes les 2 semaines. Le sang a été prélevé avant l'immunisation et une semaine après chaque injection. Le sérum a été obtenu après 6 h de coagulation sanguine à 16°C et conservé à -20°C.

Test ELISA et sexage des individus matures

La présence d'anticorps anti-Vtg de *H. niloticus* dans les sérums recueillis sur les lapins immunisés a été testée par la méthode ELISA sur du sang d'individus mâles et femelles matures de *H. niloticus* et de *A. gigas* en période de reproduction dans les mêmes conditions que les tests des anticorps anti-Vtg de *A. gigas* et de *O. bicirrhosum* décrits précédemment.

3.1.4 Détection de la Vtg par MS/MS et sexage des individus matures

A partir de prélèvements sanguins d'individus matures de sexe inconnu de *H. niloticus* en période de reproduction, des extractions protéiques et des analyses en nanoLC et MS/MS ont été réalisées pour rechercher la protéine d'intérêt (la Vtg) ou ses produits de clivage.

3.2 Suivi télémétrique pour l'étude du comportement reproducteur

3.2.1 Site expérimentale et poissons utilisés

L'étude du comportement reproducteur s'est réalisée uniquement sur *A. gigas* à la station de l'IIAP à Pucallpa au Pérou. Prévue pour être réalisée également sur *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, cette étude n'a pas pu se faire en raison des difficultés d'acquisition du matériel expérimental.

Plusieurs reproducteurs de *A. gigas* de sexe inconnu au départ (une trentaine environ) ont été capturés et mis ensemble dans un étang. Pour permettre leur identification permanente, une puce électronique de 11 mm a été implantée dans la partie médiane du muscle antérieur dorsal de chaque poisson à l'aide d'une seringue particulière.

L'étude du comportement reproducteur envisagé dans le cadre de cette étude nécessite une connaissance du sexe des individus utilisés. Ainsi, un échantillon de sang a été prélevé dans la veine caudale de chaque individu et conservé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml hépariné. Toutes les procédures de marquage et de prélèvement de sang ont duré environ 1,30 min. L'échantillon de sang a ensuite été centrifugé pendant 3 min à 10 000 g et le plasma surnageant a été collecté et conservé congelé jusqu'à son utilisation ultérieure pour la détermination du sexe.

Les *Arapaima* ont été sexés grâce à l'anticorps anti Vtg1 mis au point par l'équipe de l'IRD (Chu-Koo et al., 2009). A l'issu du sexage, un lot de 20 poissons dont 10 mâles et 10 femelles a été constitué.

Tous les reproducteurs utilisés dans le cadre de cette expérimentation sont mâtures et mesurent entre 144 et 188 cm LT pour un poids compris entre 26 et 65 kg.

L'étang d'expérimentation a une superficie de 4500 m^2 (8°24,002″ S – 74°38026″ W) et la profondeur est en moyenne de 1 m. Les pentes des berges ne sont pas raides et une végétation herbacée y est présente. Ce type d'étang correspond à ceux utilisés par les pisciculteurs de la zone de distribution de l'espèce pour assurer la reproduction en captivité.

3.2.2 Système de suivi des *Arapaima*

Le suivi du comportement reproducteur de *A. gigas* est réalisé suivant le système de télémétrie acoustique Lotek MAP (positionnement UMAP) qui utilise le code CDMA (code accès multiple par répartition) qui permet la détection simultanée et le décodage de plusieurs émetteurs co-localisés. Ce système combine la détection, la transmission du mouvement et des paramètres de l'eau (température, pression, etc.) au sein du même code. Les utilisateurs finaux sont capables de traiter les données brutes et calculer des trajets continus à partir de positions en deux dimensions d'animaux marqués sans assistance ou traitement chez Lotek.

3.2.3 Pose des émetteurs ultrasoniques sur les poissons

Des émetteurs (16 x 80 mm, 76 KHz) pesant 35 g (MM-M-16-50 PM, LOTEK Inc.) ont été fixés à l'extérieur des poissons sous la partie antérieure de la nageoire dorsale (**Figure 38a**) selon la technique décrite par Nuñez-Rodriguez et al. (2015) pour les émetteurs radio de taille et de poids similaires. En bref, un câble recouvert de plastique en acier inoxydable a été inséré à l'aide d'une aiguille adaptée près de la nageoire dorsale après une anesthésie locale avec 0,5% de lidocaïne (0,5 ml de chaque côté) et un émetteur a été fixé au câble à l'aide de colliers de serrage en plastique. Les aiguilles et les câbles étaient préalablement stérilisés avec 70% d'éthanol et une solution antibactérienne (10% de povidone) était appliquée sur les points d'injection. L'ensemble de la procédure de marquage a duré moins de 2 min. La manipulation n'a pas modifié le comportement des poissons, car ceux-ci ont retrouvé une nage normale et étaient calmes immédiatement après leur remise dans l'étang expérimental.

3.2.4 Disposition des hydrophones dans l'étang expérimental

Huit hydrophones (WHS 3250D, LOTEK Inc.) (**Figure 38b**) placés à environ tous les 25 m ont été immergés dans l'étang expérimental à 1 m du rivage. Pour les rendre immobiles, ils sont fixés sur des poteaux métalliques (de 3 cm de diamètre et de 2 m de long). La profondeur moyenne de l'étang variait de 0,8 m sur le rivage à 1,20 m dans la zone centrale avec un fond relativement lisse et boueux. Les antennes des hydrophones ont été placées à environ 50 cm

au-dessus du fond de l'étang et à 30–50 cm de la surface de l'eau, en fonction de la profondeur de l'eau à chaque endroit. Les coordonnées exactes de chaque hydrophone ont été déterminées à l'aide d'un GPS (Trimble GeoExplorer 6000 XH 3.5G) donnant une précision de position d'environ 30 cm selon les indications du fabricant.

(a) **(b)**

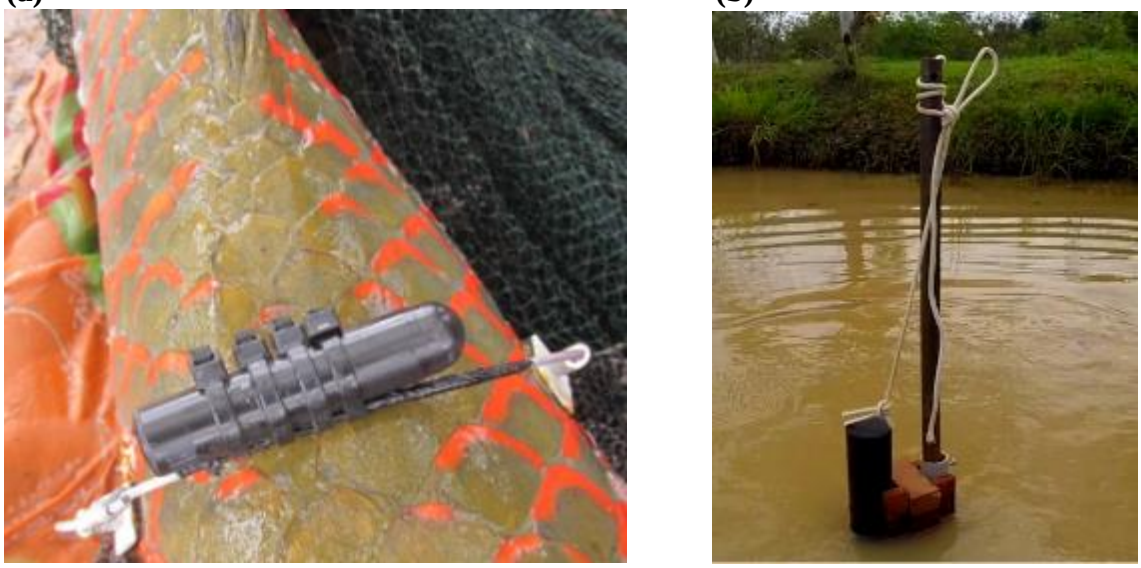


Figure 38 : *A. gigas* équipé d'un émetteur ultrasonique (16 x 80 mm, 76 KHz) de 35 g (MM-M-16-50 PM, LOTEK Inc.) (a) et hydrophone (WHS 3250D, LOTEK Inc.) fixé sur un poteau métallique et immergé à la périphérie de l'étang expérimental (b).

Troisième partie

Première approche de la caractérisation de la ressource génétique d'*Heterotis* en Côte d'Ivoire, par comparaison du polymorphisme haplotypique de l'ADNmt (Cyt b et NADH) selon l'origine géographique des échantillons sauvages (capturés dans la nature) ou cultivés (élevés en pisciculture)

1. Introduction

Heterotis niloticus est une espèce d'Ostéoglossiformes native de la province ichtyologique nilo-soudanienne (figure 15 page 49) excepté les sous-provinces éburnéo-ghanéenne et abyssinienne (Bard, 1973 ; Lemasson, 1957 ; Lévêque & Paugy, 2006 ; Lévêque et al., 1990 ; Moreau & Moreau, 1982 ; Reizer, 1964 ; Stiassny et al., 2007). L'intérêt économique et les performances zootechniques de cette espèce (Adite et al., 2006 ; Ezekiel & Abowei, 2013 ; Moreau, 1982 ; Odo et al., 2009) ont favorisé l'étendue artificielle de son aire de distribution, à la suite d'introduction par l'Homme dans le bassin du Congo (Lemasson, 1957), les sous-provinces éburnéo-ghanéenne et abyssinienne (Lévêque & Paugy, 2006), la haute et à la basse Guinée (Stiassny et al., 2007). Son élevage en étang de pisciculture a démarré dans les années 1955 à Bangui en Centrafrique (Tillon, 1959) et depuis lors cette espèce est présente dans plusieurs stations piscicoles de pays africains (Moreau & Moreau, 1982 ; Stiassny et al., 2007).

H. niloticus, initialement méconnu des bassins hydrographiques de la Côte d'Ivoire (Gourène et al., 1995), a été mis en essai dans la station piscicole de Bouaké à partir de 1957 avec des alevins provenant d'une pisciculture de Yaoundé au Cameroun (Lazard, 1990 ; Reizer, 1964) et de la localité de Bérégadougou au Burkina Faso (Reizer, 1964). Les alevins obtenus à la suite des reproductions dans cette station ont servi à enrichir la faune de certains lacs et cours d'eau. Il s'agit entre autres du lac d'Ayamé (sur le fleuve Bia) de 1962 à 1965, du lac de Kossou (sur le fleuve Bandama) de 1971 à 1972 (Bernacsek & Powles, 1992 ; Doudet, 1979 ; Moreau, 1982), du lac de Buyo (sur le fleuve Sassandra) en 1980 (Lazard, 1990) et des barrages agropastoraux construits sur des affluents secondaires du fleuve Bandama au nord de la Côte d'Ivoire à partir de 1985 (Da Costa et al., 1998 ; Tito De Morais et al., 2007) (voir **Figure 35**).

H. niloticus est actuellement présent dans les principaux fleuves de la Côte d'Ivoire et fait partie des espèces principalement pêchées (Da Costa et al., 2000 ; Kouakou et al., 2016 ; Tah et al., 2009). Sa pisciculture s'est également développée et est pratiquée dans des étangs ou dans de petits barrages (Kimou et al., 2016).

A l'instar des autres espèces de poissons, l'avenir des pêcheries et des fermes piscicoles de *H. niloticus* dépend en grande partie de la gestion adéquate des ressources génétiques avec la mise en place d'un suivi génétique pour le maintien d'un niveau approprié de diversité génétique en

lien avec un effectif efficace suffisant pour garantir la disponibilité de poissons nécessaires à la consommation humaine (Santos et al., 2014).

Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la génétique des populations de *H. niloticus* contrairement à l'espèce sœur *A. gigas*. Au Bénin par exemple où *H. niloticus* est natif, une étude a été réalisée uniquement sur des populations sauvages de trois bassins hydrographiques et s'est plutôt appuyée sur des microsatellites comme marqueurs moléculaires (Hurtado et al., 2013). Les résultats obtenus montrent que les individus de certains BV ont une diversité allélique et une hétérozygotie élevées (9,25 et 0,60 respectivement) et pour d'autres BV, les valeurs sont faibles (3,5 et 0,34 respectivement). Les études réalisées chez *A. gigas* avec les marqueurs microsatellites révèlent également que selon les zones de distribution de l'espèce, on observe une diversité allélique et une hétérozygotie élevées (8,54 et 0,72 respectivement) (Araripe et al., 2013) ou faibles (1.52 et 0,08 respectivement) (Watson et al., 2016).

Alors que le génome mitochondrial de *H. niloticus* est complètement séquencé (16 551 paires de bases, Genbank AP009498) (Lavoué et al., 2011), aucune donnée relative à l'utilisation de marqueurs mitochondriaux pour évaluer la variabilité génétique n'est encore disponible. La variabilité génétique de nombreuses populations et sous-populations naturelles et piscicoles de cette espèce n'est pas connue contrairement à *A. gigas* et d'autres espèces de poisson où plusieurs études de variabilité génétique ont été réalisées à la fois sur les populations sauvages et de pisciculture (An et al., 2010 ; Oliveira et al., 2017 ; Glover et al., 2011 ; Santos et al., 2014 ; Shen et al., 2009 ; Skaala et al., 2006).

La présente étude est la première à aborder la variabilité génétique de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire depuis son introduction en utilisant des marqueurs mitochondriaux. Son objectif est d'évaluer la variation génétique de *H. niloticus* de populations transloquées par l'homme dans des bassins versants (populations sauvages) ou dans des stations de pisciculture (stocks d'élevage) et de comparer les résultats obtenus avec ceux de *A. gigas* disponibles dans la bibliographie. Il s'agit aussi d'essayer de fournir un état de référence pour un suivi ultérieur de la ressource génétique que constitue ces deux espèces et en particulier *H. niloticus* en Afrique de l'ouest.

2 Démarche expérimentale

Dans le but de caractériser la ressource génétique d'*Heterotis* en Côte d'Ivoire, notre étude s'est basée sur des marqueurs mitochondriaux du Cytochrome b (Cyt b) et une région incluant le 16S rRNA, tRNA-Leu, NADH1 et tRNA-Ile (segment NADH1). Les échantillons utilisés proviennent également d'autres zones géographiques que la Côte d'Ivoire où l'espèce a été introduite.

Les échantillons de Côte d'Ivoire sont issus de populations sauvages (populations introduites) et de stocks d'élevage de quatre bassins versants (Sassandra, Bandama, Comoé et Bia).

Des échantillons ont été collectés au sein de populations sauvages, là aussi introduites, et des stocks d'élevage du bassin du Nyong au Cameroun et de stocks d'élevage dans trois bassins versants de la Guinée. Nous n'avons pas pu obtenir d'échantillons de populations natives (non introduites).

Les protocoles d'extraction de l'ADN, d'amplification des fragments de gènes mitochondriaux (Cyt b et segment NADH1), de séquençage et d'analyse des séquences sont mentionnés dans le chapitre Matériel et Méthodes.

L'échantillonnage au sein de populations sauvages et de stocks d'élevage de différentes zones géographiques a pour but d'essayer de préciser l'origine géographique des bonytongues de Côte d'Ivoire et aussi de réaliser les comparaisons suivantes :

- populations sauvages et stocks d'élevage des zones d'introduction selon les pays échantillonnés ;
- populations sauvages selon les bassins versants de Côte d'ivoire ;
- stocks d'élevage selon les pisciculturesde Côte d'ivoire ;
- populations sauvages et stocks d'élevage d'un même bassin versant de Côte d'Ivoire.

A partir des études antérieures réalisées sur *A. gigas* dont les résultats sont disponibles dans la bibliographie, il a été possible de comparer cette espèce avec *H niloticus* en ce qui concerne la diversité génétique ; qu'elle soit haplotypique ou nucléotidique et aussi concernant l'information portée par les phylogéographies. Les différentes étapes de ce travail sont schématisées dans la **Figure 39**.

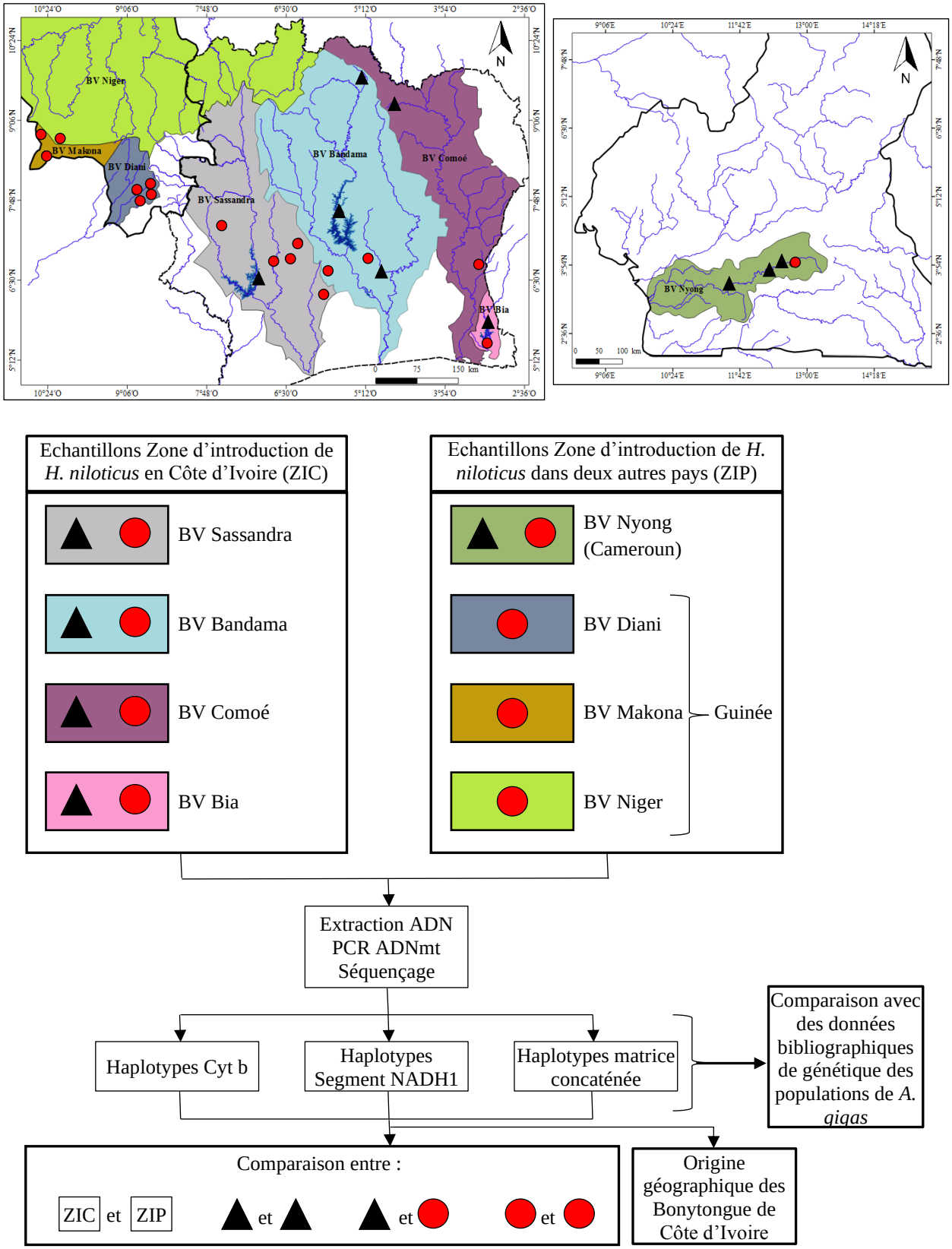


Figure 39 : Echantillonnage et analyse génétique de populations sauvages (triangle noir) et stocks d'élevage (rond rouge) dans la zone d'introduction de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire (ZIC) et dans deux autres pays (ZIP). Les échantillons de Côte d'Ivoire, du Cameroun et de la Guinée sont issus de différents bassins versants (BV).

3. Caractérisation de la ressource génétique en Côte d'Ivoire

3.1 Variation de séquences des gènes mitochondriaux de *H. niloticus*

3.1.1 Matrice concaténée des marqueurs mitochondriaux

L'analyse des fragments de gènes mitochondriaux concaténés du segment NADH1 (16S rRNA + tRNA-Leu +NADH1 + tRNA-Ile) et du Cyt b de *H. niloticus* qui représentent chacun 2384 paires de bases (pb) a permis d'identifier quatre haplotypes pour 64 échantillons séquencés sur les 2 marqueurs avec les fréquences absolues présentées dans le **Tableau 15**. L'haplotype le plus fréquent HpA est présent en Côte d'Ivoire et en Guinée, l'haplotype HpB est observé uniquement au Cameroun où il est le seul dans cette région et l'haplotype HpD et l'haplotype rare HpC sont observés uniquement en Côte d'Ivoire.

Tableau 15 : Fréquences absolues des quatre haplotypes concaténés des gènes mitochondriaux NADH1 et Cyt b d'échantillons de *H. niloticus* collectés dans les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun.

	Côte d'Ivoire			Guinée	Cameroun			Total		
Haplotypes	PS	SE	Total	SE	PS	SE	Total	PS	SE	Total
HpA	3	10	13	24	0	0	0	3	34	37
HpB	0	0	0	0	7	3	10	7	3	10
HpC	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2
HpD	5	10	15	0	0	0	0	5	10	15
Total	8	22	30	24	7	3	10	15	49	64

L'alignement des séquences des haplotypes des gènes mitochondriaux concaténés présenté en **Annexe 4** met en relief une insertion-délétion (indel) et 13 sites polymorphiques dont 2 sites

pour le segment NADH1 et 11 sites pour Cyt b. La composition nucléotidique montre une dominance de A et T (~55%).

Les résultats des indices de diversité présentés dans le **Tableau 16** montrent que les petits échantillons du Cameroun et de la Guinée avec un seul haplotype identifié ne présentent pas de diversité haplotypique ou nucléotidique.

Pour les échantillons de la Côte d'Ivoire, tous les indices de diversité des stocks d'élevage (SE) sont plus élevés que ceux des populations sauvages (PS), la diversité haplotypique (Hd=0,577) est moyenne et la diversité nucléotidiques (π=0,0019) est faible. Les mutations sont constituées uniquement de transitions, qui sont les mutations les plus probables. La moyenne des différences nucléotidiques entre les haplotypes est K = 4,61 substitutions si l'on considére uniquement les échantillons provenant de la Côte d'ivoire et K = 3,52 si l'on considére les échantillons collectés dans les trois pays. Toutefois aucune de ces variations n'est significative en raison de la petite taille de l'échantillonnage de séquences.

Tableau 16 : Indice de diversité génétique pour un fragment du gène concaténé de l'ADNmt de *H. niloticus* pour les échantillons collectés dans les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun.

	Côte d'Ivoire			Cameroun	Guinée	Total
	PS	SE	Total	PS et SE	SE	
Nombre de séquences	13	17	30	10	24	64
Nombre d'haplotypes	2	3	3	1	1	4
Transitions	8	12	12	0	0	12
Transversions	0	0	0	0	0	0
Indel	1	1	1	0	0	1
Sites polymorphiques	9	13	13	0	0	13
Diversité haplotypique (Hd)	0,538	0,632	0,577	0	0	0,595
Diversité nucléotidique (π)	0.0020	0,0023	0,0021	0	0	0,0015
Différence nucléotidique (K)			4,61	0	0	3,52

3.1.2 Gène Cyt b

Le séquençage des produits de PCR du gène mitochondrial Cyt b a permis d'obtenir des fragments de 1061 pb. L'analyse de ces fragments a permis d'identifier 6 haplotypes pour 106 échantillons séquencés avec les fréquences absolues présentées dans le **Tableau 17**. L'haplotype Hp1 avec le plus grand nombre d'individus (66) est présent en Côte d'Ivoire et en Guinée. Il est le seul à être partagé entre deux régions. Les haplotypes Hp3 et Hp4 sont observés uniquement au Cameroun et les haplotypes Hp2, Hp5 et Hp6 sont observés uniquement en Côte d'Ivoire. Les haplotype Hp2, Hp3 et Hp6 sont rares (1 à 2 individus).

Tableau 17 : Fréquences absolues des six haplotypes d'un fragment du gène mitochondrial Cyt b d'échantillons de *H. niloticus* collectés dans les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun.

	Côte d'Ivoire			Guinée	Cameroun			Total		
Haplotypes	PS	SE	Total	SE	PS	SE	Total	PS	SE	Total
Hp1	8	24	32	34	0	0	0	8	58	66
Hp2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Hp3	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Hp4	0	0	0	0	13	5	18	13	5	18
Hp5	8	10	18	0	0	0	0	8	10	18
Hp6	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2
Total	17	36	53	34	14	5	19	31	75	106

L'alignement des séquences des haplotypes du gène Cyt b présenté en **Annexe 5** met en relief 14 sites polymorphiques avec une indel. La composition nucléotidique montre une dominance de A et T (~56%).

Les résultats des indices de diversité présentés dans le **Tableau 18** montrent que les échantillons de la Guinée avec un seul haplotype identifié ne présentent pas de diversité haplotypique ou nucléotidique. Les diversités haplotypiques et nucléotidiques des échantillons du Cameroun sont faibles (Hd = 0,105 et π = 0,0002). Les SE avec un seul haplotype ne présentent pas de diversité haplotypique ou nucléotidique.

Pour les échantillons de la Côte d'Ivoire, les PS et SE ont le même nombre d'haplotypes (3) avec un haplotype spécifique à chacun. Les SE présentent plus de mutations et de sites polymorphiques que les PS. Cependant, les diversités haplotypiques et nucléotidiques des PS sont plus élevées que celles des SE avec respectivement Hd=0,588 / π=0,0038 et Hd=0,489 / π=0,0033. La diversité haplotypique (Hd=0,528) est moyenne et la diversité nucléotidiques (π=0,003) est faible. La moyenne des différences nucléotidiques entre les haplotypes est K = 3,18 substitutions pour les échantillons provenant de la Côte d'ivoire et K = 2,33 pour les échantillons provenant des trois pays. Là aussi ces différences ne sont pas significatives en raison de la faiblesse de l'échantillonnage.

Tableau 18 : Indice de diversité génétique pour un fragment du gène Cyt b de l'ADNmt d'échantillons de *H. niloticus* issus de populations sauvages (PS) et des stocks d'élevage (SE) de Côte d'Ivoire, du Cameroun et de Guinée.

	Côte d'Ivoire			Cameroun			Guinée	Total
	PS	SE	Total	PS	SE	Total	SE	
Nombre de séquences	17	36	53	14	5	19	34	106
Nombre d'haplotypes	3	3	4	2	1	2	1	6
Transitions	7	10	11	1	0	1	0	12
Transversions	1	0	1	1	0	1	0	2
Indel	1	1	1	1	0	1	0	1
Sites polymorphiques	9	11	13	3	0	3	0	14
Diversité haplotypique (Hd)	0,588	0,489	0,528	0,143	0	0,105	0	0,559
Diversité nucléotidique (π)	0,0038	0,0033	0,0035	0,0004	0	0,0003	0	0,0022
Différence nucléotidique (K)			3,18			0,21	0	2,33

3.1.3 Segment NADH1

Le séquençage des produits de PCR a permis d'obtenir 1323 pb d'un segment de l'ADNmt contenant un fragment du 16S rRNA (209 pb), la séquence complète de tRNA-Leu (74 pb), la séquence complète de NADH1 (972 pb) et un fragment de tRNA-Ile (68 pb). L'analyse de ce segment de l'ADNmt sur un échantillonnage de 99 individus beaucoup plus restreint que celui

de Cyt b qui en avait 106, a permis d'identifier seulement 2 haplotypes avec les fréquences absolues présentées dans le **Tableau 19**. L'haplotype HpI qui est le plus fréquent est partagé par les trois pays échantillonnés alors que l'haplotype HpII est observé uniquement en Côte d'Ivoire.

Tableau 19 : Fréquences absolues des haplotypes du segment NADH1 d'échantillons de *H. niloticus* collectés dans les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Cameroun.

	Côte d'Ivoire			Guinée	Cameroun			Total		
Haplotypes	PS	SE	Total	SE	PS	SE	Total	PS	SE	Total
HpI	8	24	32	24	13	3	16	21	51	72
HpII	11	16	27	0	0	0	0	11	16	27
Total	19	40	59	24	0	3	16	32	67	99

L'alignement des séquences des haplotypes du segment NADH1 présenté en **Annexe 6** met en relief 2 sites polymorphiques sans aucune indel. La composition nucléotidique montre une dominance de A et T (>54%).

Les résultats des indices de diversité présentés dans le **Tableau 20** montrent que les échantillons de la Guinée et du Cameroun avec un seul haplotype identifié ne présentent pas de diversité haplotypique ou nucléotidique.

Pour les échantillons de la Côte d'Ivoire, les diversités haplotypique et nucléotidique des SE sont plus élevées que celles des PS. La diversité haplotypique (Hd=0,505) est moyenne et la diversité nucléotidiques (π=0,0008) est faible. La moyenne des différences nucléotidiques entre les haplotypes est K = 1,01 substitutions pour les échantillons provenant de la Côte d'ivoire et K = 0,80 pour tous les échantillons

Tableau 20 : Indice de diversité génétique du segment NADH1 de l'ADNmt de *H. niloticus* pour les échantillons issus de populations sauvages (PS) et des stocks d'élevage (SE) de Côte d'Ivoire, du Cameroun et de Guinée.

	Côte d'Ivoire			Cameroun	Guinée	Total
	PS	SE	Total	PS et SE	SE	
Nombre de séquences	40	19	59	16	24	99
Nombre d'haplotypes	2	2	2	1	1	2
Transitions	2	2	2	0	0	2
Transversions	0	0	0	0	0	0
Indel	0	0	0	0	0	0
Sites polymorphiques	2	2	2	0	0	2
Diversité haplotypique (Hd)	0,492	0,515	0,505	0	0	0,401
Diversité nucléotidique (π)	0,0007	0,0008	0,0008	0	0	0,0006
Différence nucléotidique (K)			1,01	0	0	0,80

3.2 Phylogéographie des haplotypes

Les gènes mitochondriaux concaténés ont permis d'identifier quatre haplotypes ; ce qui est inférieur au nombre d'haplotypes du Cyt b qui est de six. Cette faible diversité observée au niveau des gènes concaténés est due au fait qu'à l'issu du séquençage, les séquences de segment NADH1 n'étaient pas disponibles pour les individus ayant les haplotypes Hp2 et Hp3 (gène Cyt b). Ces deux haplotypes ne font pas partie de la matrice de gènes concaténés. Il s'agit donc d'une fausse baisse de la diversité en raison d'un biais d'échantillonnage. Par ailleurs, un haplotype de segment NADH1 est associé à un seul haplotype Cyt b pour former la matrice concaténée (HpA=HpI+Hp1, HpB=HpI+Hp4, HpC=HpII+Hp5 et HpD=HpII+Hp6). Les arbres phylogénétiques des haplotypes de la matrice concaténée et du segment NAD1 (avec 2 haplotypes seulement) ne sont donc pas présentés ici.

L'arbre phylogénétique des séquences des haplotypes du gène Cyt b construit selon la méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle *Tamura-Nei* sélectionné selon le critère BIC a été enraciné sur les haplotypes des espèces *A. gigas* et *O. bicirrhosum* (**Figure 40**). Un clade fortement soutenu (bootstrap = 67%) se distingue avec les haplotypes Hp1, Hp2, Hp3 et Hp4 identifiés dans les trois pays échantillonnés. L'haplotype Hp3 est au nœud 56 et l'haplotype Hp4 est au nœud 67. L'haplotype Hp6 est observé uniquement en Côte d'Ivoire avec une longueur de branche plus importante et l'haplotype Hp5 également observé uniquement en Côte d'Ivoire se présente comme un haplotype frère des autres haplotypes.

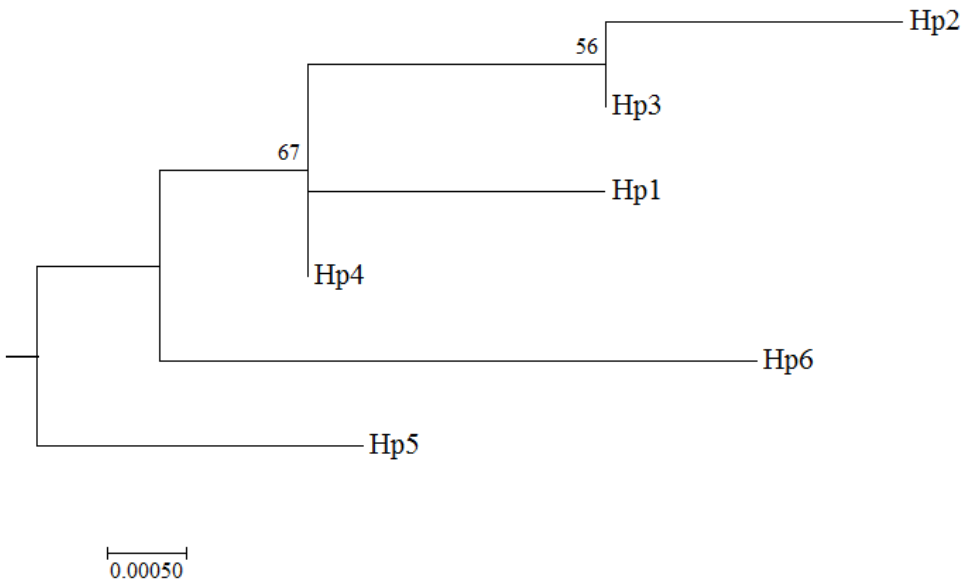


Figure 40 : Arbre phylogénétique des haplotypes du gène Cyt b de *H. niloticus* obtenu avec 2 espèces d'Ostéoglossiformes comme outgroup (*A. gigas* et *O. bicirrhosum*) construit avec Mega 7 en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle Tamura-Nei (log-likelihood = -1522,84). Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas et la longueur des branches est mesurée en nombre de substitutions par site.

3.3 Origine géographique des bonytongues de Côte d'Ivoire

Les haplotypes du gène Cyt b des individus échantillonnées au Cameroun, en Côte d'ivoire et en Guinée (**Figure 41a**) ont permis de construire un réseau d'haplotypes avec le gène Cyt b (**Figure 41b**) qui montre un positionnement de la racine entre mv3 et Hp5 avec à partir de mv3 un clade intégrant les haplotypes du Cameroun Hp3 et Hp4, desquels dérivent respectivement les haplotypes Hp2 de Côte d'Ivoire et Hp1 de Guinée et de Côte d'Ivoire par deux évènements mutationnels. Un haplotype a été identifié par zone échantillonnée, sauf pour l'haplotype Hp1 partagé entre le Guinée et la Côte d'Ivoire.

Avec les échantillons de Côte d'ivoire, le réseau d'haplotypes du gène Cyt b (**Figure 41c**) montre que les PS et SE du BV Comoé hébergent également des haplotypes différents (Hp1 et Hp2 pour les PS et Hp6 pour les SE) qui dérivent d'un ancêtre commun par 1 à 6 mutations. Pour les autres BV, les PS et SE hébergent dans certains cas le même haplotype (Hp1 pour BV Bandama et Hp5 pour BV Sassandra et Bia) et dans d'autres cas des haplotypes différents (Hp1 et Hp5 pour BV Bandama et Sassandra, Hp5 et Hp6 pour BV Bia) qui dérivent d'un ancêtre commun par 3 à 4 mutations.

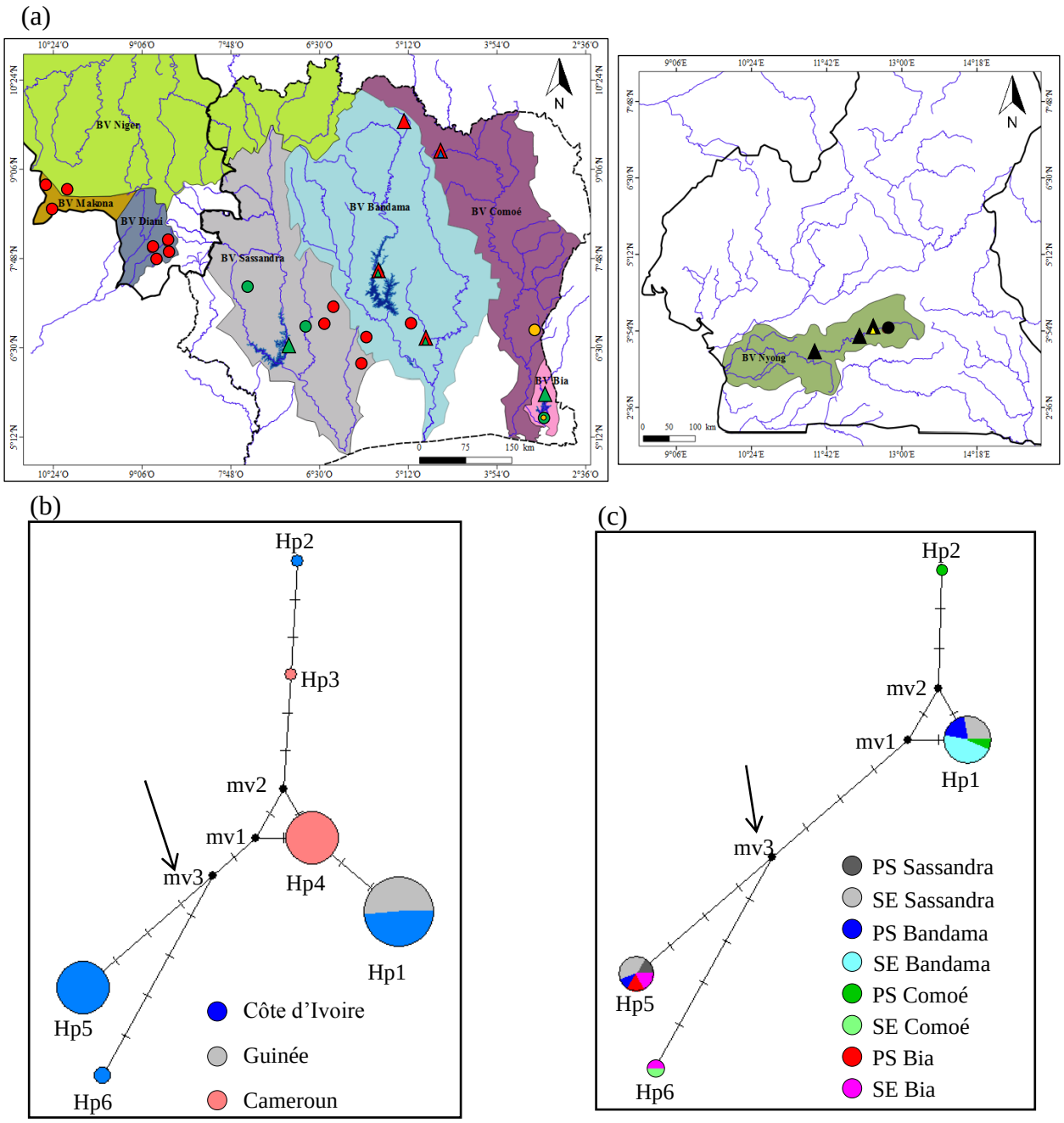


Figure 41 : Carte de distribution des haplotypes (a) des gènes Cyt b de *H. niloticus* échantillonnés dans des bassins versants (BV) de Côte d'Ivoire (BV Sassandra, Bandama, Comoé et Bia), de Guinée (BV Diani, Makona et Niger) et du Cameroun (BV Nyong) et réseau d'haplotypes des échantillons des trois pays (b) et des échantillons de Côte d'Ivoire uniquement selon les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) de quatres bassins versants (c). Sur la carte de distribution des haplotypes, les triangles et les ronds désignent respectivement les haplotypes d'individus collectés au sein de PS et de SE avec l'haplotype Hp1 en rouge, l'haplotype Hp2 en bleu, l'haplotype Hp3 en jaune, l'haplotype Hp4 en noir, l'haplotype Hp5 en vert et l'haplotype Hp6 en orange. L'existence de deux haplotypes sur un site de collecte est indiquée par la juxtaposition de deux couleurs. Sur le réseau d'haplotypes, les vecteurs médians (mv) représentent les ancêtres potentiels. Les flèches indiquent le positionnement de la racine selon l'arbre ML réalisé précédemment. La longueur des segments reliant les haplotypes tient compte du nombre de mutations représentées par les barres transversales. La taille des nœuds est proportionnelle à la fréquence des haplotypes.

3.4 Comparaison de distribution géographique des haplotypes entre populations sauvages et stock d'élevage de la Côte d'Ivoire et du Cameroun

A partir des fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 (**Tableau 21),** le test exact de Fisher (**Tableau 22**) n'a pas mis en évidence des différences significatives entre les populations sauvages (PS) et les stocks d'élevage (SE) de la Côte d'Ivoire et entre les PS et SE du Cameroun.

Tableau 21 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 d'échantillons de *H. niloticus* collectés au sein de populations sauvages (PS) et de stocks d'élevage (SE) en Côte d'Ivoire et au Cameroun.

		Côte d'Ivoire		Cameroun	
		PS	SE	PS	SE
Matrice concaténée (NADH1 et Cyt b)	HpA	7	8	0	0
	HpB	0	0	7	3
	HpC	0	2	0	0
	HpD	3	10	0	0
Cyt b	Hp1	8	24	0	0
	Hp2	1	0	0	0
	Hp3	0	0	1	0
	Hp4	0	0	13	5
	Hp5	8	10	0	0
	Hp6	0	2	0	0
Segment NADH	HpI	8	24	13	3
	HpII	11	16	0	0

Tableau 22 : Test exact de Fisher entre populations sauvages et stocks d'élevage de *H. niloticus* de Côte d'Ivoire et du Cameroun.

	Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Côte d'Ivoire	0,319	0,164	0,266
Cameroun	1	1	1

L'analyse moléculaire de variance (AMOVA) (**Tableau 23**) révèle tout comme le test exact de Fisher des différences faibles (Fst<0,05 et participation à la variance <3,31%) non significatives entre les PS et SE de *H. niloticus* de la Côte d'Ivoire. L'essentiel de la variation moléculaire est expliqué par la variation entre individus au sein des PS et SE (>96%) quel que soit le gène considéré.

Pour les échantillons du Cameroun, les résultats de l'AMOVA de la matrice concaténée et du segment NADH1 ne montrent aucune différenciation entre PS et SE et entre individus. Avec le gène Cyt b, les valeurs de Fst et de la participation à la variance entre PS et SE sont négatives, indiquant ainsi une absence de structure génétique entre PS et SE.

Tableau 23 : Analyse moléculaire de variance (AMOVA) pour les populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) de *H. niloticus* de Côte d'Ivoire et du Cameroun. La p-value du Fst est entre parenthèses.

		Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Côte d'Ivoire	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	3,31	1,6	2,47
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS et SE	96,69	98,4	97,53
	Fst	0,033	0,016 (0,213)	0,025 (0,254)
Cameroun	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	0	-9,77	0
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS et SE	0	109,77	0
	Fst	0,000 (1)	-0,098 (1)	0,000 (1)

3.5 Comparaison de distribution des haplotypes entre populations sauvages selon les bassins versants de Côte d'Ivoire

A partir des fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 (**Tableau 24),** le test exact de Fisher (**Tableau 25**) a mis en évidence une différence significative au seuil de 5% seulement entre les populations sauvages (PS) des bassins versants (BV) Sassandra et Comoé pour le segment NADH1.

Tableau 24 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 d'échantillons de *H. niloticus* collectés au sein de populations sauvages (PS) de quatre bassins versants de Côte d'Ivoire.

		Sassandra	Bandama	Comoé	Bia
Matrice concaténée (NADH1 et Cyt b)	HpA	0	1	2	0
	HpD	3	0	0	4
Cyt b	Hp1	0	6	2	0
	Hp2	0	0	1	0
	Hp5	3	2	0	3
Segment NADH	HpI	0	5	3	0
	HpII	6	3	0	2

Tableau 25 : Test exact de Fisher entre les populations sauvages de *H. niloticus* échantillonnées dans quatre bassins versants de Côte d'Ivoire.

	Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra / Bandama	0,25	0,061	0,31
Sassandra / Comoé	0,1	0,1	**0,012***
Sassandra / Bia	1	1	1
Bandama / Comoé	1	0,321	0,491
Bandama / Bia	0,333	0,061	0,444
Comoé / Bia	0,067	0,1	0,1

* : P<0,05

L'AMOVA présentée dans le **Tableau 26** révèle tout comme le test exact de Fisher une forte différenciation (Fst~0,6) significative pour le segment NADH1 expliquant ~ 52% de la variation moléculaire entre PS des BV Sassandra et Comoé. On note aussi une forte différenciation significative (Fst = 1 et participation à la variance = 100%) entre PS des BV Sassandra et Bandama pour ce même gène. Entre PS des BV Sassandra et Bia et entre PS des BV Bandama et Comoé, les résultats montrent une faible différenciation non significative avec des valeurs de Fst égales ou proches de 0 et une participation à la variance <9,77%. Entre les autres BV, on observe une forte différentiation (Fst>0,25) expliquant l'essentiel de la variation moléculaire entre leurs PS sauf pour les BV Bandama et Bia où le segment NADH1 montre que l'essentiel de variation moléculaire est observé au sein des individus (~66%).

Tableau 26 : Analyse moléculaire de variance (AMOVA) pour l'ensemble des individus échantillonnés dans les populations sauvages (PS) de *H. niloticus* de quatre bassins versants de Côte d'Ivoire. La p-value du Fst est entre parenthèses.

		Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra / Bandama	Pourcentage de variation expliquée entre PS	100	59,32	52,48
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	40,68	47,52
	Fst	1 (0,233)	0,593 (0,070)	0,524 (**0,027***)
Sassandra / Comoé	Pourcentage de variation expliquée entre PS	100	86,96	100
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	13,04	0
	Fst	1 (0,099)	0,87 (0,092)	1 (**0,017***)
Sassandra / Bia	Pourcentage de variation expliquée entre PS	0	0	0
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	0	0
	Fst	0 (1)	0 (1)	0 (1)
Bandama / Comoé	Pourcentage de variation expliquée entre PS	0	1,8	9,77
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	98,2	90,23
	Fst	0 (1)	0,018 (0,327)	0,098 (0,472)
Bandama / Bia	Pourcentage de variation expliquée entre PS	100	59,32	34,25
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	40,68	65,75
	Fst	1 (0,196)	0,593 (0,065)	0,342 (0,459)
Comoé / Bia	Pourcentage variation expliquée entre PS	100	86,96	100
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS	0	13,04	0
	Fst	1 (0,059)	0,87 (0,096)	1 (0,099)

* : P<0,05

3.6 Comparaison de distribution des haplotypes entre stocks d'élevage selon les piscicultures de Côte d'Ivoire

A partir des fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 (**Tableau 27),** le test exact de Fisher (**Tableau 28**) n'a pas mis en évidence des différences significatives entre les stocks d'élevage (SE) des bassins versants (BV) Sassandra / Comoé et Comoé / Bia quels que soient les gènes considérés. Entre les BV Sassandra / Bandama et Bandama / Bia, les différences sont significatives pour tous les gènes considérés. Entre les BV Sassandra / Bia et Bandama / Comoé, les différences significatives se situent respectivement au niveau du Cyt b et du segment NADH1.

Tableau 27 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 d'échantillons de *H. niloticus* collectés au sein des stocks d'élevage de quatre bassins versants de Côte d'Ivoire.

		Sassandra	Bandama	Comoé	Bia
Matrice concaténée (NADH1 et Cyt b)	HpA	0	6	0	0
	HpC	0	0	1	1
	HpD	7	0	0	1
Cyt b	Hp1	9	15	0	0
	Hp5	7	0	0	3
	Hp6	0	0	1	1
Segment NADH	HpI	10	13	1	0
	HpII	8	0	4	4

Tableau 28 : Test exact de Fisher entre stocks d'élevage de *H. niloticus* échantillonnées dans quatre bassins versants de Côte d'Ivoire.

	Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra / Bandama	**0,000*** **	**0,007** **	**0,009** **
Sassandra / Comoé	0,125	0,059	0,317
Sassandra / Bia	0,222	**0,042***	0,096
Bandama / Comoé	0,143	0,063	**0,002** **
Bandama / Bia	**0,036***	**0,000*** **	**0,000*** **
Comoé / Bia	1	0,4	1

* : P<0,05 ; ** : P<0,01 ; *** : P<0,001

Les résultats de l'AMOVA présentés dans le **Tableau 29** montrent que seules les différentiations entre SE du BV Bandama et les autres BV sont significatives pour au moins l'un des gènes considérés conformément au test exact de Fisher. L'AMOVA n'a pas mis en évidence de différence significative entre SE des BV Sassandra et Bia contrairement au test exact de Fisher. Les valeurs de Fst montrent une forte différenciation (Fst>0,25) pour au moins l'un des gènes considérés quels que soient les SE des BV comparés. La variation entre individus au sein des SE du BV Sassandra et des autres BV est essentiellement à la base des différentiations moléculaires. Quant aux BV Bandama / Comoé et Bandama / Bia, la différentiation est expliquée essentiellement par la variation entre SE. Les valeurs négatives du Fst et de la participation à la variance entre SE des BV Comoé et Bia pour les gènes concaténés et le segment NADH1 indiquent une absence de structure génétique.

Tableau 29 : Analyse moléculaire de variance (AMOVA) pour l'ensemble des individus échantillonnés dans les stocks d'élevage de *H. niloticus* de quatre bassins versants de Côte d'Ivoire. La p-value du Fst est entre parenthèses.

		Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra / Bandama	Pourcentage de variation expliquée entre SE	51,56	39,03	36,64
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	48,44	60,97	63,36
	Fst	0,516 (**0,036***)	0,391 (**0,005****)	0,366 (**0,006****)
Sassandra / Comoé	Pourcentage de variation expliquée entre SE	43,37	51,4	11,14
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	56,63	48,6	88,86
	Fst	0,433 (0,092)	0,514 (0,053)	0,111 (0,309)
Sassandra / Bia	Pourcentage de variation expliquée entre SE	8,23	25,36	35,14
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	91,77	74,64	64,86
	Fst	0,082 (0,238)	0,254 (0,109)	0,351 (0,109)
Bandama / Comoé	Pourcentage de variation expliquée entre SE	100	100	86,23
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	0	0	13,77
	Fst	1 (0,141)	1 (0,070)	0,862 (**0,000*****)
Bandama / Bia	Pourcentage de variation expliquée entre SE	86,32	90,43	100
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	13,68	9,57	0
	Fst	0,863 (**0,026***)	0,904 (**0,000*****)	1 (**0,000*****)
Comoé / Bia	Pourcentage de variation expliquée entre SE	-100	33,33	-5,26
	Pourcentage de variation expliquée au sein des SE	200	66,67	105,26
	Fst	-1 (1)	0,333 (0,424)	-0,053 (1)

* : P<0,05 ; ** : P<0,01 ; *** : P<0,001

3.7 Lien entre piscicultures et populations sauvages d'un même bassin versant

A partir des fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 (**Tableau 30), l**e test exact de Fisher (**Tableau 31**) n'a pas mis en évidence de différences significatives entre les PS et SE des différents BV pour les gènes concaténés et Cyt b. Pour le segment NADH1, seuls les BV Sassandra et Bandama présentent des différences significatives.

Tableau 30 : Fréquences absolues des haplotypes de la matrice concaténée, du Cyt b et du segment NADH1 d'échantillons de *H. niloticus* collectés au sein des populations sauvages (PS) et stocks d'élevage (SE) de quatre bassins versants de Côte d'Ivoire.

		Sassandra		Bandama		Comoé		Bia	
		PS	SE	PS	SE	PS	SE	PS	SE
Matrice concaténée (NADH1 et Cyt b)	HpA	0	0	1	6	2	0	0	0
	HpC	0	0	0	0	0	1	0	1
	HpD	3	7	0	0	0	0	4	1
Cyt b	Hp1	0	9	6	15	2	0	0	0
	Hp2	0	0	0	0	1	0	0	0
	Hp5	3	7	2	0	0	0	3	3
	Hp6	0	0	0	0	0	1	0	1
Segment NADH	HpI	0	10	5	13	3	1	0	0
	HpII	6	8	3	0	0	4	2	4

Tableau 31 : Test exact de Fisher entre les populations sauvages et stocks d'élevage de *H. niloticus* d'un même bassin versant de Côte d'Ivoire.

	Matrice concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra	1	0,211	**0,024***
Bandama	1	0,111	**0,042***
Comoé	0,333	0,5	0,143
Bia	0,333	1	1

* : P<0,05

L'AMOVA présentée dans le **Tableau 32** montre tout comme le test Exact de Fisher des différenciations fortes (Fst>0,25) significatives pour le segment NADH1 expliquant plus de 60% de variation entre individus au sein des PS et SE des BV Sassandra et Bandama. Seul le BV Comoé présente une différentiation basée essentiellement sur la variation moléculaire entre PS et SE. Les valeurs négatives de Fst et de la participation de la variance entre PS et SE du BV Bia pour le gène Cyt b indiquent une absence de structure génétique.

Tableau 32 : Analyse moléculaire de variance (AMOVA) pour l'ensemble des individus échantillonnés dans les populations sauvages et stocks d'élevage de *H. niloticus* dans un même bassin versant de Côte d'Ivoire. La p-value du Fst est entre parenthèses.

		Matrice Concaténée	Cyt b	Segment NADH1
Sassandra	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	9,06	32,67	39,5
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS et SE	90,94	67,33	60,5
	Fst	0,09	0,327 (0,203)	0,395 (**0,048***)
Bandama	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	0	25,47	37,95
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS et SE	0	74,53	62,05
	Fst	0 (1)	0,255 (0,113)	0,379 (**0,042***)
Comoé	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	100	76,92	68,09
	Pourcentage variation expliquée au sein des PS et SE	0	23,08	31,91
	Fst	1 (0,312)	0,769 (0,252)	0,681 (0,129)
Bia	Pourcentage de variation expliquée entre PS et SE	38,48	-9,09	0
	Pourcentage de variation expliquée au sein des PS et SE	61,54	109,09	0
	Fst	0,384	-0,09 (1)	0 (1)

* : P<0,05

3.8 Discussion et conclusion

Pour la première fois, une l'exquise d'analyse de la ressource génétique *Heterotis* a été réalisée en Côte d'Ivoire à partir de l'analyse de séquences de gènes mitochondriaux. Cette étude s'est intéressée aux échantillons de populations sauvages introduites (PS) et de stocks d'élevage (SE) de ce pays mais également des échantillons provenant de la zone d'introduction de deux autres pays (Guinée et Cameroun).

Le séquençage des produits de PCR a permis d'identifier pour le fragment de gène Cyt b et le segment NADH1 (16S rRNA, tRNA-Leu, NADH1, tRNA-Ile) de *H. niloticus* respectivement 6 et 2 haplotypes. Les poissons échantillonnés ont une diversité haplotypique moyenne ($0,401<Hd<0,595$) et une diversité nucléotidique faible ($0,0006<\pi<0,0022$) avec 2 et 14 sites polymorphiques respectivement pour le segment NADH1 et le Cyt b. La plupart des PS et SE avec un seul haplotype identifié ne présentent pas de diversité haplotypique ou nucléotidique. Cette absence de variation entre les séquences de plusieurs individus a été également observée pour le gène NADH1 chez des PS de *Salmo trutta caspius* (Rezaei, 2015) et pour le gène Cyt b chez des PS de *O. ferreirai* (Olivares et al., 2013). Cependant, une étude réalisée par Hrbek et al. (2005) a permis d'identifier chez *A. gigas* 25 haplotypes séparés par 27 sites polymorphiques avec le gène NADH1 comme marqueur tandis que chez *Acanthurus tractus*, une étude a permis d'observer jusqu'à 61 haplotypes pour le gène Cyt b (Castellanos-Gell et al., 2012). La faible variation de séquences du Cyt b et du segment NADH1 des *Heterotis* étudiés pourrait être liée à un échantillon trop réduit et peu significatifs des zones géographiques où l'espèce est présente (Hurtado et al., 2013). On ne peut pas néanmoins exclure que le petit nombre de reproducteurs utilisés (en moyenne 4) ait contribué à réduire la variation génétique des populations introduites dans les pisciculture et les cours d'eau (Shen et al., 2009).

Le réseau d'haplotype construit par la méthode de « median joining » montre que les haplotypes du Cameroun sont en position centrale, donc au plus près de l'ancêtre commun, avec ensuite les haplotypes de Côte d'Ivoire dérivés de 1 à 6 mutations de l'ancêtre commun. En effet, les haplotypes Hp1 et Hp2 du Cyt b dérivent respectivement des haplotypes Hp4 et Hp3 du Cameroun par 2 évènements mutationnels chacun. Ce lien peut être expliqué par l'introduction de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire de 1957 à 1959 à partir d'alevins provenant d'une pisciculture située dans le BV du Nyong du Cameroun (Lazard, 1990 ; Reizer, 1964),

elle-même ayant été alimentée par des géniteurs prélevés sur l'aire de distribution de populations natives d'*Heterotis* (au nord du Cameroun). Ces résultats confortent l'histoire de la dispersion de l'espèce par l'homme à partir des bassins du nord du Cameroun, avec la mise en évidence de lignées génétiques de poissons présents en Côte d'Ivoire qui pourraient être originaires du Cameroun. Il manque cependant la preuve incontestable du partage de même haplotype entre le Cameroun et la Côte d'Ivoire.

La faiblesse de l'échantillonnage ne permet pas de discuter des différenciations de diversité haplotypique et nucléotidique. En revanche, considérant la distribution géographique des échantillons, les *Heterotis* de Côte d'Ivoire partagent plus d'haplotypes avec ceux de Guinée que ceux du Cameroun, contrairement à ce que laissait supposer l'histoire des translocations de cette espèce qui aurait sa source d'approvisionnement au Cameroun. De plus, des haplotypes ont été identifiés uniquement en Côte d'Ivoire sans lien direct avec ceux du Cameroun. Il s'agit des haplotypes HpC et HpD des gènes mitochondriaux concaténés et les haplotypes Hp5 et Hp6 du Cyt b. Cela pourrait suggérer que le trop faible échantillonnage réalisé au Cameroun n'a pas permis d'observer ces haplotypes dans ce pays ou que les *Heterotis* de Côte d'Ivoire sont d'origine géographique multiple. En effet, en 1960, des alevins provenant de la localité de Bérégadougou (Burkina Faso) sont venus compléter ceux du Cameroun arrivés quelques années plutôt. Il est donc possible qu'ils aient une « origine burkinabé ». De plus, ces haplotypes spécifiques de Côte d'Ivoire dans notre échantillonnage ont été identifiés dans des bassins versants (Sassandra, Comoé et Bia) dont les cours d'eau principaux prennent leur source dans les pays limitrophes de la Côte d'Ivoire (Guinée, Burkina Faso et Ghana) appartenant à la zone de distribution native de l'espèce.

La comparaison de distribution des haplotypes selon les fréquences (test exact de Fisher) et les divergences nucléotidiques (statistique Fst et AMOVA) n'a pas mis en évidence des différences significatives entre les poissons sauvages et de pisciculture de Côte d'Ivoire d'une part et entre ceux du Cameroun d'autre part. En considérant les échantillons de Côte d'ivoire par bassin versant, les valeurs de Fst et le test exact de Fisher ont montré généralement des différences non significatives entre PS et SE. L'AMOVA indique en dehors du BV Comoé, une variation génétique faible entre PS et SE des autres BV. Ces résultats montrent que génétiquement dans un même bassin versant, la plupart des SE sont assez proches des PS. Pour les échantillons étudiés, certains poissons d'élevage pourraient donc provenir des populations sauvages prélevées dans les cours d'eau environnants et vis-versa. Cela confirme des informations rapportées par certains pisciculteurs sur la provenance des poissons élevés. Dans

d'autres cas certaines fermes achètent les alevins à d'autres pisciculteurs tandis que d'autres produisent leurs propres alevins. Chez plusieurs espèces comme *A. gigas* (Santos et al., 2014), *Brycon amazonicus* (Oliveira et al., 2017), *Gadus morhua* (Glover et al., 2011) et *Acanthopagrus schlegelii* (An et al., 2010), la statistique Fst a mis en évidence une faible différenciation génétique significative entre poissons d'aquaculture et poissons sauvages. Les populations sauvages représentent la principale source de variabilité génétique pour les stocks aquacoles (Alarcón et al., 2004) et de ce fait les efforts de sélection de poissons sauvages pour l'aquaculture entraine le plus souvent une perte de diversité (An et al., 2010). Ainsi, pour l'espèce d'Ostéoglossiformes *H. niloticus* qui est en cours de domestication, si la faible variabilité génétique observée au sein des populations sauvages en Côte d'Ivoire est confirmée par un échantillonnage plus important, cela serait un handicap pour constituer une variance génétique additive afin d'améliorer les traits de vie des poissons d'élevage (Alarcón et al., 2004).

La comparaison des haplotypes des PS n'a pas mis en évidence des différences significatives entre les BV de Côte d'Ivoire excepté pour le segment NADH1 entre PS du BV Sassandra et les BV Bandama et Comoé. A travers une étude réalisée par Hurtado et al. (2013) au Bénin, les valeurs de Fst ont montré une différentiation significative entre PS de *H. niloticus* de trois bassins versants. Contrairement aux poissons sauvages, la statistique Fst a mis en évidence une forte différentiation significative entre les SE du BV Bandama et les autre BV. Le test exact de Fisher montre en plus une différence significative entre les SE des BV Sassandra et Bia pour le gène Cyt b uniquement. Chez une espèce de morue (Glover et al., 2010) et le poissons amazonien *Brycon amazonicus* (Oliveira et al., 2017), une différentiation génétique significative entre stocks d'élevage a été observée. Sur la base des niveaux de différenciation élevée et significative qui ont été observés entre certains BV de Côte d'Ivoire et la présence d'haplotypes rares, les PS et SE de *H. niloticus* de chaque BV concernés pourraient être considéré comme des unités de gestion et de conservation différentes (Hurtado et al., 2013). Ces informations doivent être prises en compte dans la politique de gestion de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, car la variabilité génétique est nécessaire pour la domestication et l'amélioration génétique (Alarcón et al., 2004).

Au regard des résultats obtenus dans cette étude, il existe un besoin de mieux connaitre et préserver la ressource génétique *Heterotis* en Côte d'Ivoire. Des analyses génétiques étendues, comprenant un échantillon plus important des BV et des zones de distribution natives, sont nécessaires pour établir si la faible diversité génétique est une caractéristique de *H. niloticus*

en Côte d'Ivoire et dans d'autres pays de sa zone de distribution (Hurtado et al., 2013). L'identification d'actions permettant de maintenir des populations variables et génétiquement viables (Boettcher et al., 2010 ; Santos et al., 2014) mérite d'être considérée. Il est aussi possible d'envisager de poursuivre cette étude en utilisant les microsatellites pour lesquels des panels ont été déjà définis pour *H. niloticus* car leur combinaison avec l'ADN mitochondrial offrirait des informations complémentaires sur l'histoire et la démographie des populations. En plus, l'emploi de la coalescence a montré l'importance d'associer l'ADNmt à d'autres marqueurs moléculaires (Castellanos-Gell, 2012).

Quatrième partie

La vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas* : Identification et caractérisation structurale des acteurs moléculaires

1. Introduction

H. niloticus et *A. gigas* sont d'excellents candidats pour la pisciculture en raison de leurs performances zootechniques et de leurs particularités anatomiques (Reizer, 1964 ; Santos et al., 2014; Schaefer et al., 2012). Cependant, ces deux espèces d'Ostéoglossiformes ne présentent pas de dimorphisme sexuel (Chu-Koo et al., 2009 ; Dugué et al., 2008 ; Carreiro et al., 2011 ; Oladosu et al., 2007) et leur reproduction en captivité demeure un défi majeur.

Leurs fonctions de reproduction (y compris la vitellogenèse et sa régulation) sont contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique comme chez la plupart des vertébrés (Maruska & Fernald, 2011 ; Takahashi et al., 2016). Ainsi, sous l'effet de stimuli sensoriels tels que les facteurs environnementaux (Plant, 2015 ; Yang et al., 2017) et sociaux (K. P. Maruska & Fernald, 2011), les gonadolibérines (GnRH) produites dans le cerveau stimulent au niveau de l'hypophyse l'expression et la synthèse de neurohormones telles que la prolactine (PRL), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Zohar et al., 2010). La 17β-estradiol (E2), signalée par l'intermédiaire de récepteurs œstrogéniques intracellulaires (ERs), est synthétisée par les cellules folliculaires des ovocytes sous le contrôle de la FSH (Hara et al., 2016 ; Norris & Lopez, 2011). L'E2 est la principale hormone stéroïdienne sexuelle qui stimule, chez les femelles, l'ovogenèse et la synthèse de la vitellogénine (Vtg) par le foie (Hara et al., 2016 ; Nelson & Habibi, 2013). La Vtg est une phospholipoglycoprotéine précurseur des protéines vitellines qui s'accumulent au cours de la vitellogenèse dans les ovocytes des femelles de presque toutes les espèces ovipares, y compris les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, la plupart des invertébrés et l'ornithorynque (Wallace et al., 1990 ; Zhang et al., 2015). Transportée par le sang, la Vtg est incorporée dans les ovocytes par endocytose médiée grâce à des récepteurs (VtgR) intégrés à la membrane des ovocytes (Dominguez &al., 2014; Le Menn, 1979; Mañanós&al., 2007; Stifani&al., 1990).

Certains acteurs moléculaires (PRL, LH et FSH) ont déjà été documentés chez *A. gigas* (Borella et al., 2009 ; Faria et al., 2013 ; Marcos & Adalberto, 2015 ; Sevilhano et al., 2017) alors que chez *H. niloticus*, aucune donnée n'est encore disponible sur la vitellogenèse.

On note également que la proximité phylogénétique de *H. niloticus* et *A. gigas*, soulignée par de nombreux auteurs (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ; Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969) ne prend pas encore en compte

les marqueurs moléculaires liés à la reproduction. Elle est actuellement basée sur l'analyse de caractères squelettiques, la dentition, la structure des arcs branchiaux, les os infra orbitaux, les approches bayésiennes de données morphologiques, de fossiles et de marqueurs moléculaires mitochondriaux.

Cette étude vise donc à identifier et caractériser chez *H. niloticus* la ou les Vtg et leur récepteur ovarien, les hormones hypophysaires et leurs récepteurs ainsi que les récepteurs à l'E2, et à tester une méthode de sexage d'individus matures à partir de la Vtg dans le mucus et le sang. Chez *A. gigas*, il s'agit de rechercher les données moléculaires non encore décrites. La proximité phylogénétique des deux espèces est également analysée à partir des molécules ou leurs séquences identifiées dans cette étude.

2. Démarche expérimentale

Pour identifier et caractériser les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez les deux espèces d'Ostéoglossiformes, *H. niloticus* et *A. gigas*, une combinaison d'approches a été utilisée : transcriptomique et protéomique (**Figure 42**).

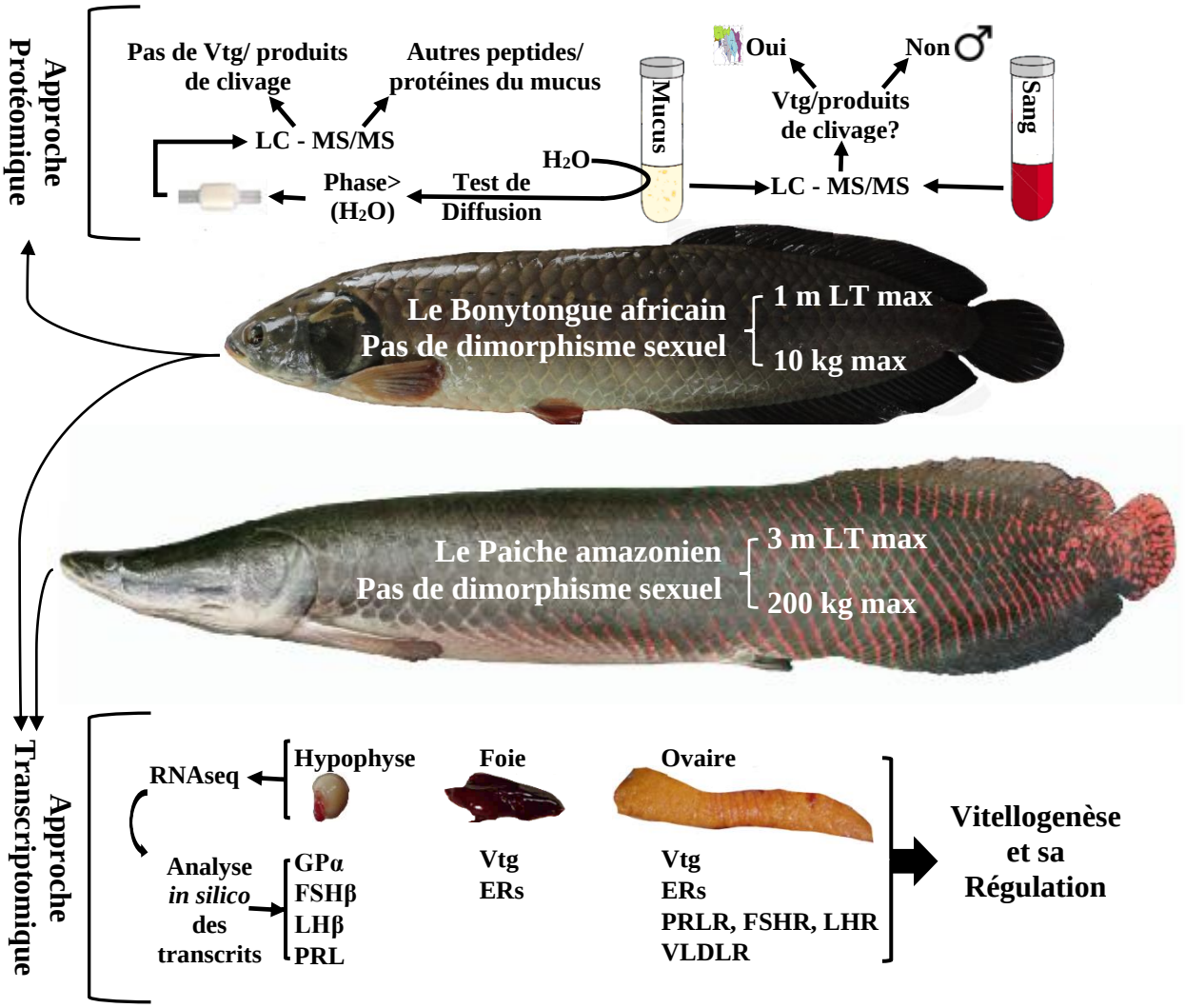


Figure 42 : Approche mise en œuvre pour caractériser les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas*. Une approche protéomique réalisée uniquement chez *H. niloticus* permet de tester la capacité de la Vtg du mucus à diffuser dans le milieu aqueux et d'autre part d'utiliser la Vtg circulante et celle présente dans le mucus comme biomarqueur de sexage.

2.1 Approche transcriptomique

L'objectif de l'approche transcriptomique est d'identifier et caractériser les gènes exprimés dans le foie, l'ovaire et l'hypophyse de femelles matures, qui sont impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation.

Après avoir prélevé les tissus et extrait les ARNm, l'étude transcriptomique comprend principalement :

- le séquençage en RNAseq réalisée par un séquenceur Illumina ;
- l'analyse bioinformatique qui a permis d'obtenir des banques de données transcriptomiques (transcrits de gènes) du foie, de l'ovaire et de l'hypophyse avec des annotations fonctionnelles ou non ;
- l'analyse *in silico* des transcrits avec des outils web et le logiciel Peptraq pour identifier et caractériser les gènes cibles dans les tissus échantillonnés.

2.2 Approche protéomique

L'approche protéomique a concerné uniquement *H. niloticus* pour lequel aucune méthode de sexage n'est encore disponible. Ainsi, la possibilité d'utiliser la Vtg du sang et du mucus comme biomarqueur de sexage a été testée. La Vtg ou ses produits de clivage ont été recherchés par spectrométrie de masse dans des extraits protéiques de sang et de mucus. Une approche fonctionnelle visant à vérifier la capacité de la Vtg du mucus à diffuser dans l'eau pour constituer un éventuel signal chimique pour les mâles a également été testée.

3. Les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *Heterotis niloticus*

L'étude menée sur les acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* a fait l'objet d'un article en cours de publication intitulé « Identification et caractérisation structurale des acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez l'Ostéoglossiformes d'intérêt aquacole, *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829) ».

Ces travaux s'appuient sur l'utilisation d'une approche RNAseq de novo qui a permis la création de 3 transcriptomes : hypophyse, ovaire et foie de femelles en vitellogenèse. Ces transcriptomes ont été analysés *in silico* afin d'identifier :

- Des hormones hypophysaires telles que la prolactine (PRL), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ainsi que leurs récepteurs ovariens (PRLR, FSHR, LHR) ;
- quatre récepteurs œstrogéniques beta (ERβ) issus d'un épissage alternatif et un récepteur gamma (ERγ) au niveau du foie et de l'ovaire ;
- les vitellogénines hépatiques (deux VtgB et une VtgC issues d'un épissage alternatif) et leurs récepteurs ovariens (VLDLR) ;
- un transcrit partiel d'une Vtg ovarienne.

Une approche protéomique réalisée à partir du mucus de *H. niloticus* révèle :

- la présence de l'une des Vtg exclusivement chez les femelles en vitellogenèse qui pourra donc être utilisée comme biomarqueur de sexage ;
- la non diffusion de la Vtg ou de ses produits de clivage dans le milieu aquatique pour jouer un rôle dans l'attraction chimique des mâles pour la formation des couples ayant été suspectés.

Identification et caractérisation structurale des acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez l'Ostéoglossiformes africain d'intérêt aquacole, *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829)

N'Zi Daniel Koua, Jésus Núñez-Rodriguez, Julie Orjuela, Céline Zatylny-Gaudin, Marie-Pierre Dubos, Benoît Bernay, Julien Pontin, Erwan Corre et Joël Henry

RESUME

Le bonytongue africain, *Heterotis niloticus*, est un excellent candidat pour la pisciculture en raison de ses particularités biologiques et de ses performances zootechniques. Cependant, l'absence de dimorphisme sexuel ne favorise pas sa reproduction en captivité et la compréhension de son comportement reproducteur. De plus, aucune donnée moléculaire liée à sa reproduction n'est encore disponible. Cette étude porte donc sur l'identification structurale des différents acteurs moléculaires de la vitellogenèse exprimés par l'hypophyse, le foie et l'ovaire chez *H. niloticus*. Une approche transcriptomique basée sur un séquençage en RNAseq *de novo* de l'hypophyse, de l'ovaire et du foie de femelle en vitellogenèse a permis de créer trois transcriptomes. L'analyse *in silico* de ces transcriptomes a permis d'identifier la séquence des hormones hypophysaires telles que la prolactine (PRL), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ainsi que leurs récepteurs ovariens (PRLR, FSHR, LHR). Au niveau du foie et de l'ovaire, ce sont les récepteurs œstrogéniques (ER) beta et gamma, les vitellogénines hépatiques (VtgB et VtgC) et leurs récepteurs ovariens (VLDLR) qui ont été identifiés. Enfin le transcrit partiel d'une Vtg ovarienne, Vtg faiblement exprimée par rapport aux Vtg hépatiques, a été identifié sur des critères structuraux. Par ailleurs, une approche protéomique réalisée à partir du mucus a révélé la présence de l'une des Vtg exclusivement chez les femelles en vitellogenèse. Chez ce poisson téléostéen qui ne présente pas de dimorphisme sexuel, la Vtg du mucus pourrait être utilisée comme biomarqueur de sexage détectable par une technique non invasive, compatible avec la mise en œuvre de protocoles expérimentaux *in vivo*. Par contre, l'hypothèse de l'implication de la Vtg du mucus ou de ses produits de clivage, lipovitellines, phosvitine, domaines beta et C-terminal, comme signaux chimiques à destination des mâles permettant ainsi la formation de couples a pu être écartée puisque nous avons démontré expérimentalement que ces protéines ne diffusaient pas dans le milieu aquatique à des niveaux détectables et ne pouvaient donc sans doute à ce titre jouer un rôle dans l'attraction chimique du mâle.

Mots clés : *Heterotis niloticu*s, Reproduction, Vitellogénine, Neurohormones, Hypophyse, Récepteurs à l'estradiol, Transcriptomes, Protéome.

1. INTRODUCTION

Chez les poissons téléostéens, comme chez tous les vertébrés, les fonctions de reproduction, depuis la gamétogenèse jusqu'au comportement sexuel lors de la formation des couples, sont pour la plupart contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Maruska & Fernald, 2011; Takahashi et al., 2016). Sous l'effet de stimuli sensoriels tels que les facteurs environnementaux (Plant, 2015 ; Yang et al., 2017) et sociaux (K. P. Maruska & Fernald, 2011), les gonadolibérines (GnRH) produites par le cerveau stimulent au niveau de l'hypophyse la synthèse de neurohormones telles que la prolactine (PRL), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Zohar et al., 2010). La PRL participe à la régulation de plusieurs processus physiologiques incluant la croissance, la reproduction et l'osmorégulation (Bu et al., 2015 ; Freeman et al., 2000 ; Manzon, 2002 ; Whittington & Wilson, 2013). La LH et la FSH stimulent la production de stéroïdes qui jouent un rôle dans la différentiation sexuelle en régulant le développement des gonades des deux sexes, le cycle reproducteur (gamétogenèse, caractères sexuels secondaires, comportement sexuel) et la croissance (Devlin & Nagahama, 2002 ; Taranger et al., 2010 ; Zohar et al., 2010). Ces gonadotropines (GTHs) sont utilisées en aquaculture comme inducteurs pour améliorer la reproduction de certaines espèces de poissons (Mehdi & Ehsan, 2013 ; Mylonas et al., 2010). Le 17β- estradiol (E2), synthétisé par les cellules folliculaires des ovocytes sous le contrôle de la FSH (Hara et al., 2016 ; Norris & Lopez, 2011), est la principale hormone sexuelle qui stimule, chez les femelles, l'ovogenèse et la synthèse de la vitellogénine (Vtg) par le foie (Hara et al., 2016 ; Nelson & Habibi, 2013). Cette hormone est signalée par l'intermédiaire de récepteurs œstrogéniques intracellulaires (ERs) principalement exprimés dans le foie (Nelson & Habibi, 2013 ; Unal et al., 2014).

La vitellogénine (Vtg) est une phospholipoglycoprotéine précurseur des protéines vitellines qui s'accumulent au cours de la vitellogenèse dans les ovocytes des femelles chez la majorité des espèces ovipares comme les poissons téléostéens, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, la plupart des invertébrés et l'ornithorynque (Wallace et al., 1990 ; Zhang et al., 2015). La Vtg est principalement exprimée dans le foie mais également dans des tissus non hépatiques (Zhong et al., 2014) où son niveau d'expression est alors beaucoup plus faible (Wang et al., 2005). D'une manière générale, la Vtg de poisson téléostéen comprend une chaîne lourde, la lipovitelline (LvH ou LvI), un domaine phosvitine riche en sérines phosphorylées (Pv), une chaîne légère de lipovitelline (LvL ou LvII), une composante β'-C et une région codante C-terminale (CT) (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006 ; Zhang et al., 2015). La Vtg joue un rôle essentiel dans le développement de l'embryon et la survie des larves. Des méthodes basées sur la

détection de Vtg plasmatique chez les individus adultes ayant acquis la maturité sexuelle permettent de sexer des poissons qui ne possèdent pas de dimorphisme sexuel.

Par exemple, chez *Arapaima gigas* de l'ordre des Ostéoglossiformes qui ne présente pas de dimorphisme sexuel (Chu-Koo et al., 2009; Dugué et al., 2008), l'utilisation de la Vtg comme marqueur de sexage a permis de constituer des couples de reproducteurs et d'optimiser leur reproduction en captivité (Carreiro et al., 2011 ; Chu-Koo et al., 2009 ; IRD, 2008 ; Nuñez, 2008). Transportée par le sang, la Vtg est incorporée dans les ovocytes par endocytose médiée grâce à des récepteurs (VtgR) intégrés à la membrane des ovocytes (Dominguez et al., 2014 ; Le Menn, 1979 ; Mañanós et al., 2007 ; Núñez-Rodríguez et al., 1996 ; Stifani et al., 1990). A la suite de l'endocytose, les VLDLR sont recyclés (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006).

L'espèce sur laquelle porte cette étude, *Heterotis niloticus*, a un intérêt économique car elle est importante pour la pêche continentale et l'aquaculture en Afrique. Elle présente une croissance exceptionnelle (Adite et al., 2006 ; Ezekiel & Abowei, 2013 ; Moreau, 1982 ; Odo et al., 2009). Plusieurs verrous techniques rendent actuellement difficile la mise en place d'un parcours zootechnique compatible avec une production de masse. L'absence de dimorphisme sexuel (Carreiro et al., 2011 ; Oladosu et al., 2007) observée également chez cette espèce d'Ostéoglossiformes proche phylogénétiquement de *A. gigas* (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ; Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969) ne favorise pas les reproductions en captivité et la compréhension du comportement reproducteur. Contrairement à *A. gigas*, espèce chez laquelle on dispose d'informations sur la Vtg (Chu-Koo et al., 2009; Dugué et al., 2008) et dont on connait la structure de la PRL (Borella et al., 2009; Marcos & Adalberto, 2015), la structure des sous unités α (Faria et al., 2013) et β (Sevilhano et al., 2017) des LH et FSH, chez *H. niloticus*, aucune donnée moléculaire n'est encore disponible sur la vitellogenèse et sa régulation.

L'objectif de cette étude vise donc à caractériser chez *H. niloticus* par la combinaison de plusieurs approches « omiques », le ou les Vtg et leur récepteur ovarien, les neurohormones hypophysaires et leurs récepteurs ainsi que les récepteurs à l'E2. Une méthode de sexage basée sur la présence de vitellogénine sera en outre testée à partir du mucus et du sang d'individus matures en utilisant une approche protéomique.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Echantillonnage et prélèvements tissulaires

Les tissus étudiés sont l'hypophyse, l'ovaire, le foie, le sang et le mucus de *H. niloticus* prélevés sur des poissons d'une ferme piscicole située au centre de la Côte d'Ivoire (5°08,713' W ;

6°50,929' N) à proximité de la capitale politique Yamoussoukro. Cette espèce a été introduite pour la première fois dans ce pays en 1957 à partir de poissons provenant du Cameroun, (Lazard, 1990). Les prélèvements tissulaires ont été réalisés sur des poissons anesthésiés dans de l'eau contenant de l'éthanol à 96° (dilution au 10^{e}) (Bhanu & Philip, 2011). Les prélèvements ont été réalisés sur des individus mâles et femelles (sexe connu après dissection) en période de reproduction (mois de mai et juin).

Pour le séquençage en RNAseq du foie, de l'ovaire et de l'hypophyse, des pools d'échantillons prélevés sur trois femelles ont été conservés dans du RNAlater (Sigma) à 4°C. Pour les analyses protéomiques du sang et du mucus, le milieu d'extraction est composé de PBS 200 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1mM et PMSF 400mM et les échantillons sont conservés à -80°C en attendant l'extraction.

2.2. Extractions des ARN totaux

Les ARN totaux de chaque pool de tissus sont extraits séparément. Les organes sont broyés dans de l'azote liquide et 50 à 100 mg de poudre de tissus sont mélangés à 1 ml de TRizol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et l'extraction est réalisée selon les recommandations du fabriquant. Les concentrations en ARN totaux sont déterminées au moyen d'un dosage spectrophotométrique (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La qualité et l'intégrité des ARN totaux sont vérifiées respectivement à partir du ratio des absorbances A260/A280 et A260/A230. La concentration des ARN est ajustée à 50 ng/µl avec de l'eau stérile et 20 µl de cette solution (1µg) sont déposés dans des tubes RNA stable (Sigma) et séchés au speed vac.

2.3. RNAseq et approche *in silico*

Séquençage Illumina, assemblage et annotation

Les échantillons d'ARN ont été séquencés par la plateforme Génome Québec (http://www.genomequebec.com/ressources-et-plateformes-technologiques.htlm) sur un séquenceur Illumina HiSeq4000 en mode pairé 2 x 100pb.

Les lectures brutes ont été nettoyées et filtrées et les traces d'adaptateurs ont été éliminés à l'aide de Trimmomatic v.0.33 (http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic). Les lectures ont été filtrées en utilisant un seuil de qualité de 30 et une taille minimale de 50 paires de bases. SortMeRNA v2.1 a été utilisé pour filtrer les ARN ribosomaux à partir des

reads (Kopylova et al., 2012). Enfin, le processus de nettoyage a été vérifié à l'aide de fastQC v.0.11.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

Les lectures nettoyées provenant des différentes librairies ont été par la suite assemblées conjointement en utilisant l'assembleur de transcriptomes *de novo* Trinity v.2.5.1 (Grabherr et al., 2011). Les abondances relatives ont été estimées à l'aide de kallisto v.0.43.1 (Bray et al., 2016). Pour obtenir la valeur d'expression (FPKM : Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) pour l'identification des contigs à faible couverture (FPKM <1) et des isoformes rares (<1%) exclus ultérieurement de l'analyse les deux logiciels ont été lancés via les srcipts du package Trinity. La prédiction peptidique a été réalisée à l'aide de Transdecoder v.3.0.0 (Haas et al., 2013). Une recherche de similarité (blastx des transcrits assemblés et blastp des peptides prédits) a été effectuée contre la base de données uniprot-swissprot (version 09-2013). La prédiction des peptides signaux a été réalisée à l'aide de signalP v4.0 (Petersen et al., 2011). La détection des domaines transmembranaires a été réalisée en utilisant TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001). Enfin, l'annotation fonctionnelle du transcriptome a été réalisée à l'aide du pipeline Trinotate v.3.0.1 (http://trinotate.github.io) décrit par Bryant et al. (2017).

Analyse *in silico* des transcrits

Les analyses *in silico* des transcrits de foie, d'ovaire et d'hypophyse de *H. niloticus* issus de l'assemblage sont principalement réalisées avec le logiciel Peptraq développé en interne (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Peptraq est un logiciel dédié à l'analyse de fichiers de séquences aux formats fasta ou txt. Il permet de traduire et de filtrer les transcrits et les précurseurs protéiques sur la base de l'annotation en utilisant des mots clés ou par l'utilisation de critères structuraux liés à la présence de subséquences particulières. Peptraq est aussi capable d'assigner le peptide signal, de le cliver pour passer de la preproprotéine à la proprotéine, de réaliser les clivages des convertases et de repérer les répétitions de séquences caractéristiques des neuropeptides.

Les domaines transmembranaires sont prédits par TMHMM v2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). Les structures secondaires sont obtenues par alignement avec des protéines d'espèces dont les domaines sont connus ou en recherchant les domaines conservés sur le site de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgir). La modélisation des structures tertiaires est réalisée sous I-TASSER

(https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Les sites de N-glycosylation sont identifiés sous NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Les séquences nucléiques et protéiques sont alignées sur Show translation (https://www.bioinformatics.org/sms/show_trans.html). Les alignements de séquences protéiques de différentes espèces sont réalisés sous CLC Sequence Viewer 7.6.1 (http://www.clcbio.com). Les identités en acides aminés entre séquences protéiques sont déterminées par Protein Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.4. Approche protéomique ciblée sur la recherche de Vtg

Préparation d'échantillons pour analyse en MS

Les échantillons soumis à l'analyse protéomique ont d'abord été décongelés dans l'eau glacée et centrifugés pendant plusieurs minutes. Les protéines sont précipitées à raison de 20 µl pour 120 µl d'acétone réfrigérée. Après une nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés à 20 000 g pendant 20 minutes. Le culot protéique est resuspendu dans un tampon bicarbonate d'ammonium (50 mM, pH 7). Les protéines sont digérées pendant une nuit à 37°C en utilisant 0,25 µg de trypsine porcine (Promega, Madison, USA). Les digestats sont dessalés et concentrés sur un ZipTip µC18 Omix (Agilent) avant analyse.

NanoLC – MS/MS

L'étape de chromatographie est réalisée sur un système de nano chromatographie à ultra-haute pression (NanoElute, Bruker Daltonics). Les peptides sont concentrés sur une précolonne C18 pepmap 100 (5 mm x 300 µm) (Thermo Scientific) et séparés à 50 °C sur une colonne en phase inverse Reprosil (25 cm x 75 µm, 1,6 µm, C18) (Ionopticks). Les phases mobiles sont constituées de 0,1% d'acide formique, 99,9% d'eau (v/v) (A) et 0,1% d'acide formique dans 99,9% d'ACN (v/v) (B). Le débit est fixé à 400 nl/min. et le profil de gradient est le suivant : de 2 à 15% de B en 60 min., suivi d'une augmentation à 25% de B en 30 min. et à 37% en 10 min., suivi d'une étape de lavage à 95% de B et d'un rééquilibrage à 2% de B.

Les analyses MS sont réalisées sur un spectromètre de masse TIMS-TOF (Bruker Daltonics) avec une source ionique de type nano electrospray (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). Le système est étalonné chaque semaine et la précision de la mesure de masse est supérieure à 1 ppm. Une tension capillaire de 1400 volts est utilisée pour l'ionisation. Les spectres MS sont acquis en mode positif dans la plage de masse de 100 à 1700 m/z. Dans les expériences décrites

ici, le spectromètre de masse est utilisé en mode PASEF (Parallel Accumulation-Serial Fragmentation) (Meier et al., 2015), à l'exclusion des peptides monochargés. Dix balayages PASEF MS/MS sont réalisés en 1,25 seconde à partir de la plage de charge 2-5.

Séquençage des peptides et détection des vitellogénines

Le spectre de fragmentation est utilisé pour déterminer la séquence du peptide. La recherche dans la base de données est effectuée à l'aide du programme Mascot 2.6.1 (Matrix Science). Deux bases de données locales de *H. niloticus* ont été utilisées : une base de données de protéines ovariennes (437 476 entrées) et une base de protéines hépatiques (244 234 entrées), l'une et l'autre construites à partir des transcriptomes correspondants grâce au logiciel Peptraq. Les modifications variables autorisées sont les suivantes : C-carbamidométhyle, K-acétylation, oxydation et di-oxydation de la méthionine. La «trypsine» a été sélectionnée avec un mode tolérant incluant deux sites de clivage manquants (Šlechtová et al., 2015). La précision de masse a été fixée à 20 ppm et 0,05 Da pour les modes MS et MS/MS respectivement. Les données de Mascot ont ensuite été transférées vers le logiciel de validation Proline (http://www.profiproteomics.fr/proline/) pour un filtrage des données selon un seuil de signification inférieur à 0,05 et l'élimination de la redondance des protéines.

2.5. Approche fonctionnelle

Une expérimentation visant à vérifier la capacité de la Vtg à diffuser dans l'eau à partir du mucus a été réalisée. La Vtg et ses produits de clivage ont été recherchés en MS. Le mucus de 5 femelles et 5 mâles matures en période de reproduction ont été collectés et centrifugés pendant 2 min. à 15000 g. Le culot d'impuretés est éliminé et deux aliquotes de 500 µl de mucus pour chaque poisson sont déposés dans des tubes Eppendorf 1.5 ml dans lesquels 1 ml de H_2O ultra pure est ajouté. Une centrifugation de 2 min. à 15000 g permet d'obtenir deux phases dans les tubes, une phase inférieure contenant le mucus et une phase supérieure contenant de l'eau. L'ensemble est incubé pendant 2h à 26°C ± 1°C dans un bain marie. 800 µl de surnageant par aliquote sont récupérés soit un total de 1,6 ml par poisson. Les surnageants sont complétés et acidifiés par ajout de 3,4 ml d'acide acétique (HPLC) à 0,1 % pour obtenir une solution finale de 5 ml. Cette solution acidifiée a été concentrée sur des micro-colonnes C4 pour l'identification ultérieure des petites protéines et polypeptides et l'éluât a été ensuite concentré sur des micro-colonnes C18 pour l'identification des peptides. L'éluât final est

préservé dans des tubes Eppendorf avec un mélange de 1 ml d'éluât et 1 ml d'une solution de TrisHCl EDTA pH 7,6 ; PMSF (400 mM), DTT (1 mM) et le tout est conservé à -20°C.

3. RESULTATS

3.1. RNAseq et approche *in silico*

Un total de 1 003 989 936 lectures brutes pairées avec des longueurs de reads de 100 paires de bases ont été générés. Après le nettoyage des adaptateurs et des séquences de mauvaise qualité, 667 119 586 lectures pairées de haute qualité ont été utilisées pour générer un premier assemblage global de 257 484 transcrits (correspondant à 156 636 « gènes » Trinity). La longueur des transcrits varie entre 201 et 24 080 paires de bases, une longueur moyenne de 1008,5 paires de bases et une longueur médiane de 418 paires de bases. 90% des lectures nettoyées ont été pseudo-alignées avec succès sur le transcriptome complet global, indiquant un support puissant du transcriptome assemblé par les reads. Les transcrits faiblement exprimés (FPKM <1) et les isoformes rares (<1%) ont été exclus de l'assemblage initial, ce qui a abouti à un assemblage filtré de 62852 transcrits (correspondant à 40 302 « gènes » de Trinity), avec des longueurs comprises entre 201 et 18 966 paires de bases, une longueur moyenne de 1382,9 paires de bases et une longueur médiane de 807 paires de bases.

Vitellogénine (Vtg) hépatique et ovarienne

Trois Vtg hépatiques et une Vtg ovarienne ont été identifiées chez *H. niloticus*. Deux des Vtg exprimés dans le foie (HnVtg1 et HnVtg2) sont représentées par deux transcrits pour l'extrémité N-terminale de 3690 (N-ter1, **figure 1a**) et 3669 (N-ter2, **figure 1b**) paires de bases et par un transcrit en position C-terminale de 1518 paires de bases (C-ter, figure 1.c). Les séquences protéiques déduites montrent que N-ter1 (1230 acides aminés) et N-ter2 (1223 acides aminés) ont respectivement en fin de séquences 19 et 12 sérines représentées tous par le même codon AGC et correspondant au N-ter du domaine phosvitine (**figure 1a et 1b**). Le transcrit C-ter de 506 acides aminés présente en début de séquence 20 sérines provenant également du codon AGC (**figure 1c**). L'assemblage de transcrits au niveau du domaine phosvitine est donc irréalisable par Trinity dès lors que les codons correspondants au site polysérine sont identiques.

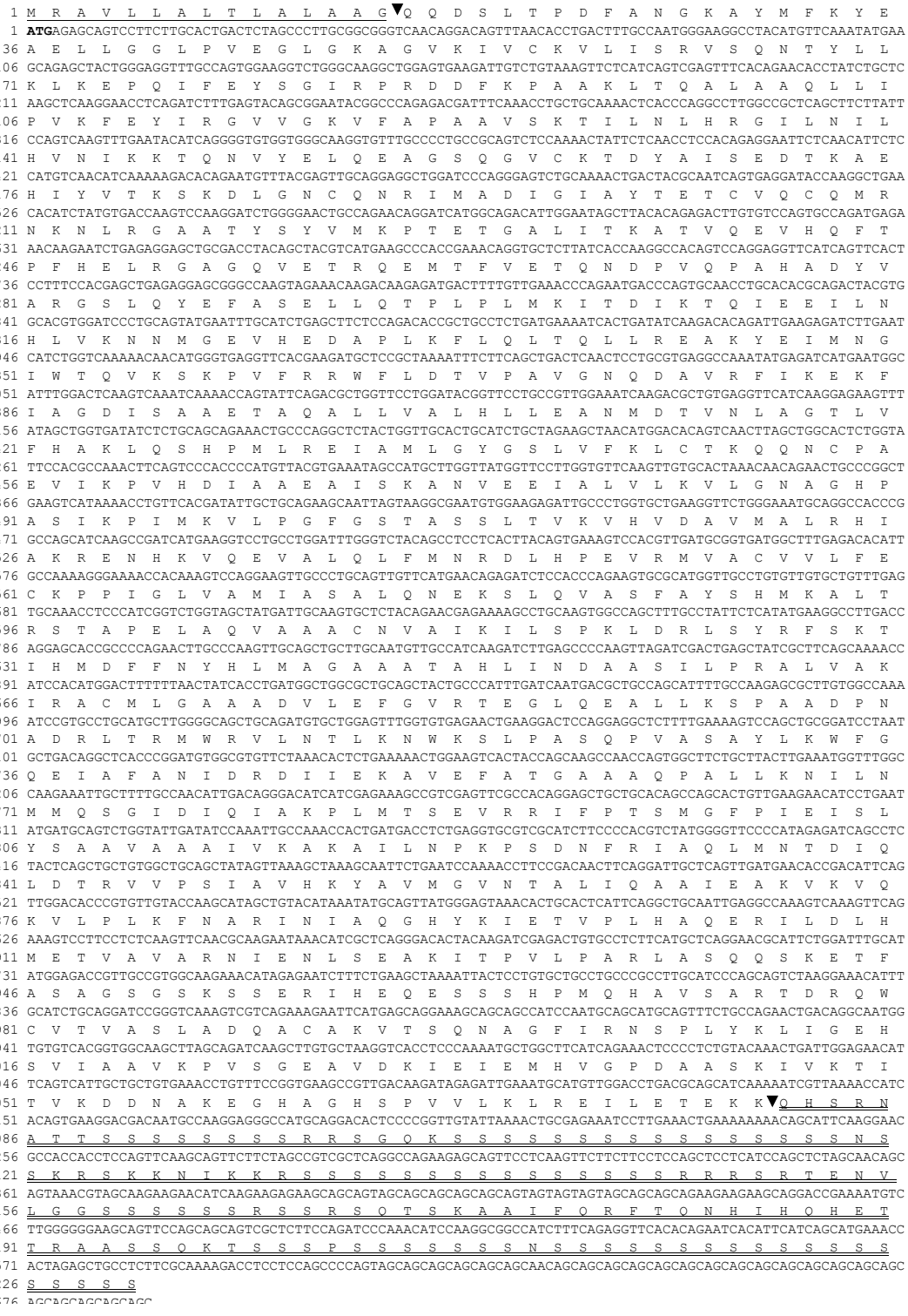


Figure 1a. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite de l'extrémité N-terminale de la Vtg1 identifiée dans le foie de *H. niloticus* (N-ter1 HnVtg1). Le codon d'initiation est en gras, le peptide signal est souligné, la lipovitelline I (LvI) est délimitée par deux triangles noirs et la phosvitine (Pv) qui est partielle est doublement soulignée.

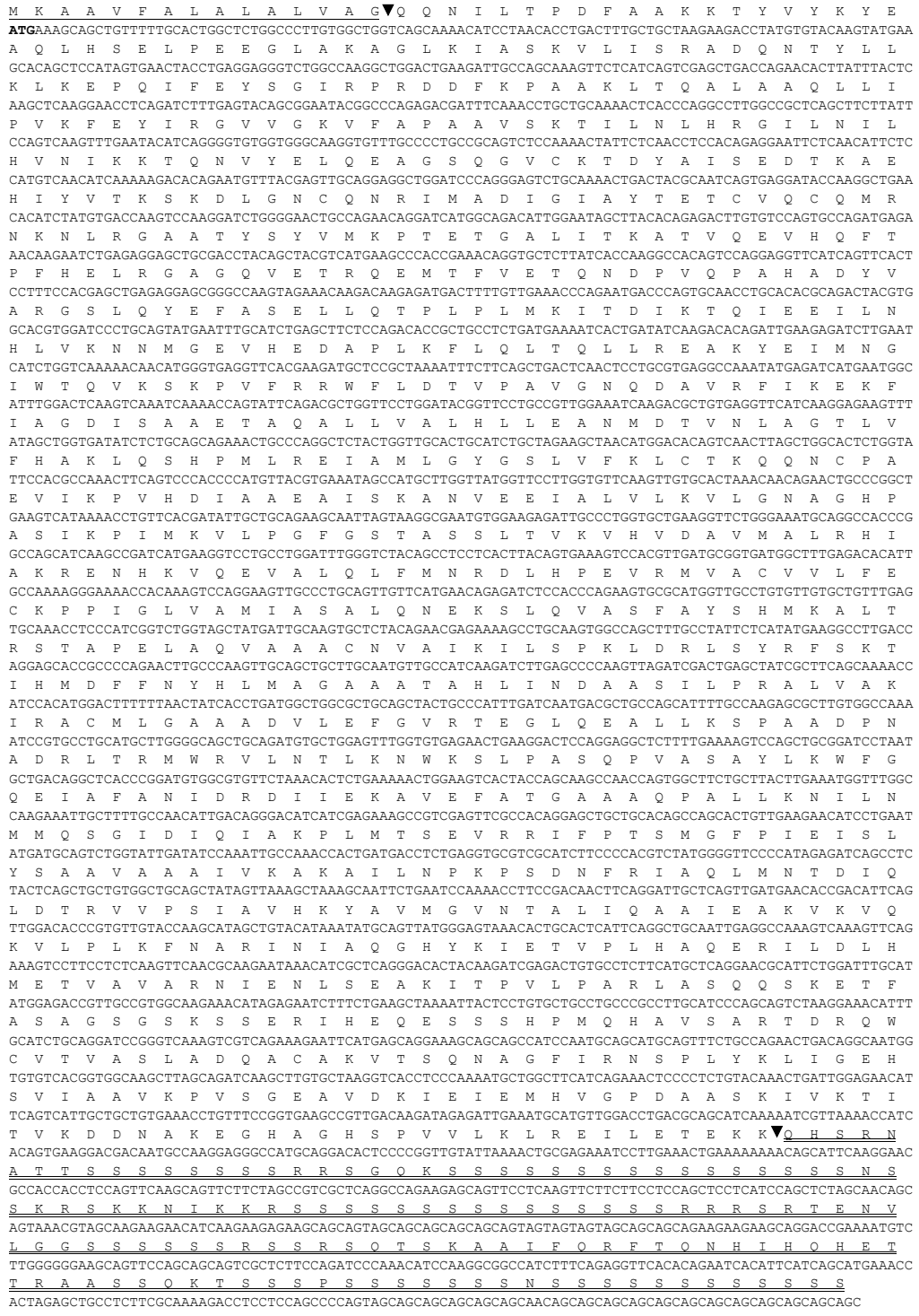


Figure 1b. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite de l'extrémité N-terminale de la Vtg2 identifiée dans le foie de *H. niloticus* (N-ter2 HnVtg2). Le codon d'initiation est en gras, le peptide signal est souligné, la lipovitelline I (LvI) est délimitée par deux triangles noirs et la phosvitine (Pv) qui est partielle est doublement soulignée.

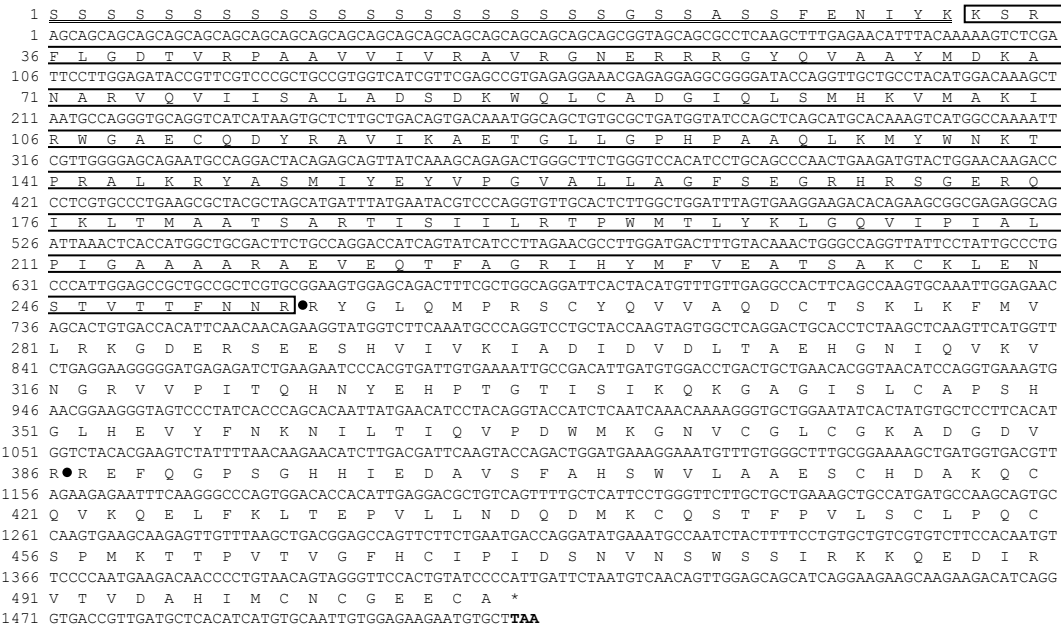


Figure 1c. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite de l'extrémité C-terminale (C-ter) de la Vtg1 et Vtg2 identifiée dans le foie de *H. niloticus*. Le codon stop sont indiqués en gras, la phosvitine (Pv) qui est partielle est doublement soulignée, la lipovitelline II (LvII) est située dans des encadrés, le domaine β'-C est délimité par deux ronds noirs et est suivi par la région codante C-terminale (CT).

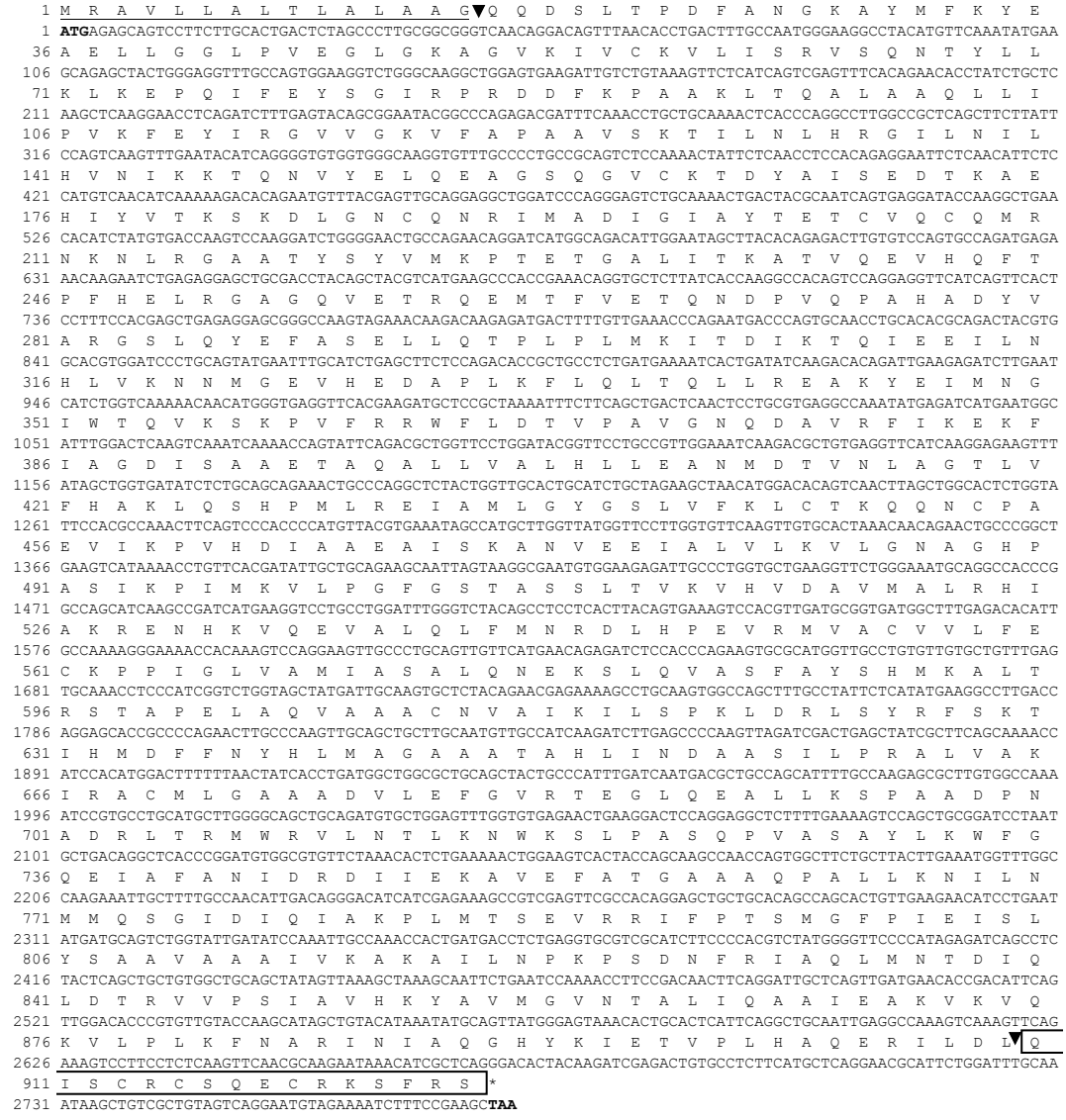


Figure 1d. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite de la Vtg3 identifiée dans le foie de *H. niloticus*. Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné, la lipovitelline I (LvI) est délimitée par deux triangles noirs et la LvII est située dans des encadrés.

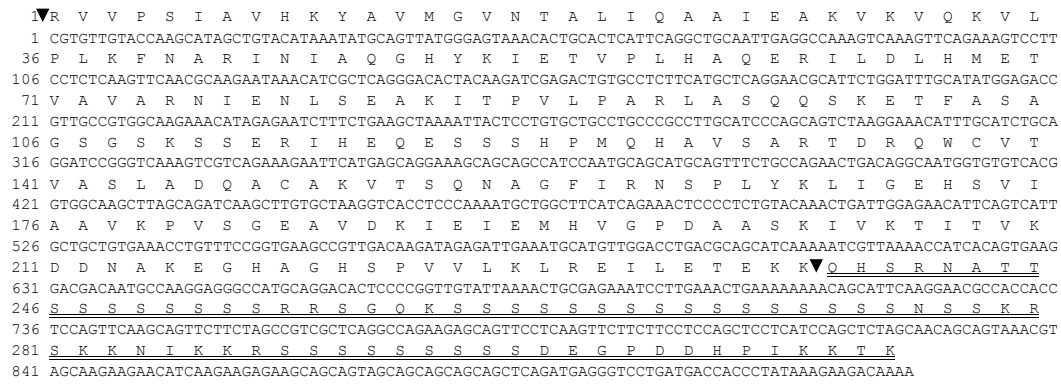


Figure 1e. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite de la Vtg ovarienne partielle de *H. niloticus* (HnVtg4). La lipovitelline I (LvI) est délimitée par deux triangles noirs et la phosvitine (Pv) est doublement soulignée.

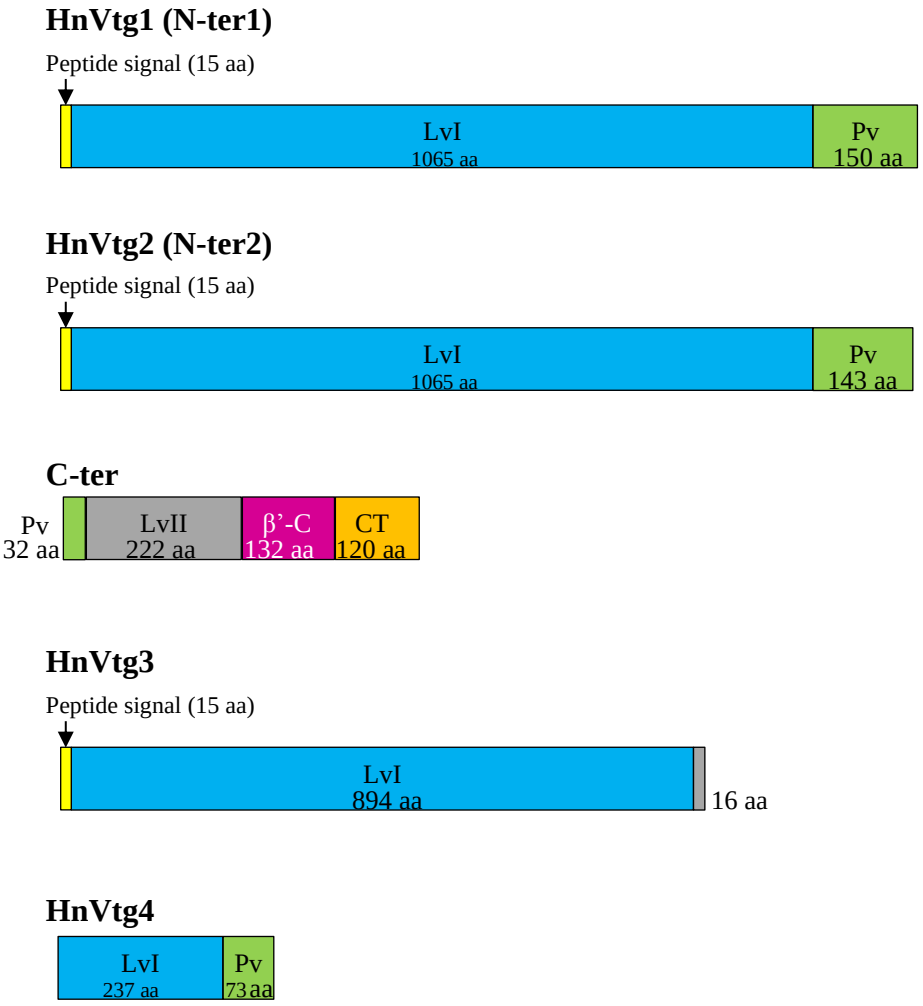


Figure 2. Constructions linéaires des différents domaines des Vtg de *H. niloticus* dont le nombre d'acides aminés (aa) est indiqué.

L'une des Vtg hépatiques (HnVtg3) a une séquence complète de 2775 paires de bases codant pour une protéine de 925 acides aminés (**figure 1d**). Quant à la Vtg de l'ovaire (HnVtg4), elle provient d'un transcrit partiel de 930 paires de bases codant pour 310 acides aminés (figure 1e). La structure secondaire des Vtg de *H. niloticus* (**figure 2**) montre que les Vtg hépatiques ont un peptide signal de 15 acides aminés suivi pour HnVtg3 des domaines lipovitellines uniquement (LvI et LvII) et pour HnVtg1 et HnVtg2 des domaines LvI, Pv, LvII, β'-C et CT. La Vtg incomplète de l'ovaire comprend les domaines LvI et Pv.

Les alignements réalisés montrent que la divergence entre N-ter1 et N-ter2 se situe en début de séquence avec un domaine Pv plus complet chez la HnVtg1 (**figure 3a**). Les domaines Met^{1} à Lys^{909} de HnVtg1 et HnVtg3 (correspondant au peptide signal et à la LvI de HnVtg3) sont identiques. Le domaine Arg^{1} à Ser^{297} de la Vtg ovarienne incomplète (HnVtg4) est identique au domaine Arg^{844} à Ser^{1140} de N-ter1 et N-ter2 des Vtg hépatiques ; la divergence se situe en fin de séquence dans le domaine Pv (**figure 3b**).

Figure 3a. Alignements des séquences protéiques déduites de l'extrémité N-terminale (N-ter) des Vtg hépatiques de *H. niloticus* (HnVtg1 et HnVtg2) avec les domaines peu conservés en gris.

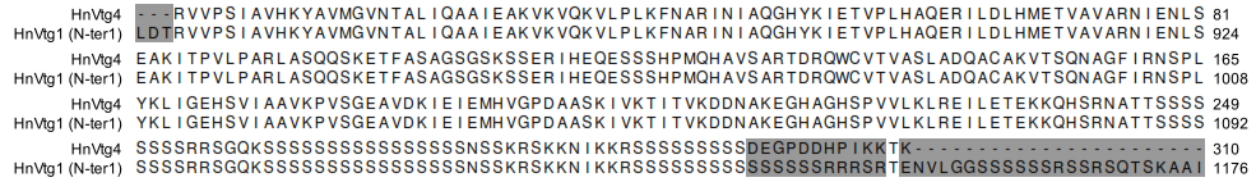


Figure 3b. Alignements des séquences protéiques déduites de l'extrémité N-terminale (N-ter) de la Vtg hépatique (HnVtg1) et de la Vtg ovarienne partielle (HnVtg4) de *H. niloticus* avec les domaines peu conservés en gris.

Lorsqu'on aligne successivement la Vtg de *Scleropages formosus* de 1745 acides aminés (AWG47880) avec le N-ter1 (**figure 3c**) puis avec le C-ter (**figure 3d**) de *H. niloticus*, il n'y a qu'une sérine orpheline (**figure 3e**). L'analyse de l'homologie entre la VtgC de *H. niloticus* (HnVtg3) et les VtgC d'autres espèces de poissons téléostéens (**figure 3f**) montre une identité en acides aminés de 34,08% avec *O. mykiss* (BBA57869) et de 31,41% avec *O. niloticus* (XP_005459969).

Figure 3c. Alignement des séquences protéiques déduites des N-ter de la Vtg1 de *H. niloticus* (HnVtg1) et de la Vtg de *S. formosus* (SfVtg) avec les domaines peu conservés en gris.

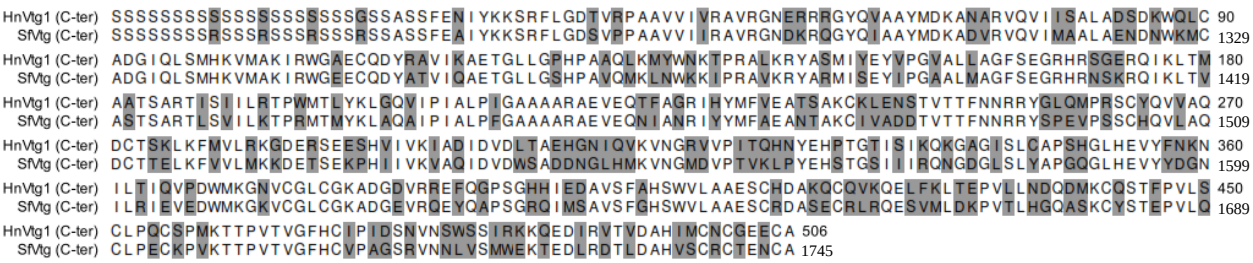


Figure 3d. Alignement des séquences protéiques déduites des C-ter de la Vtg1 de *H. niloticus* (HnVtg1) et de la Vtg de *S. formosus* (SfVtg) avec les domaines peu conservés en gris.

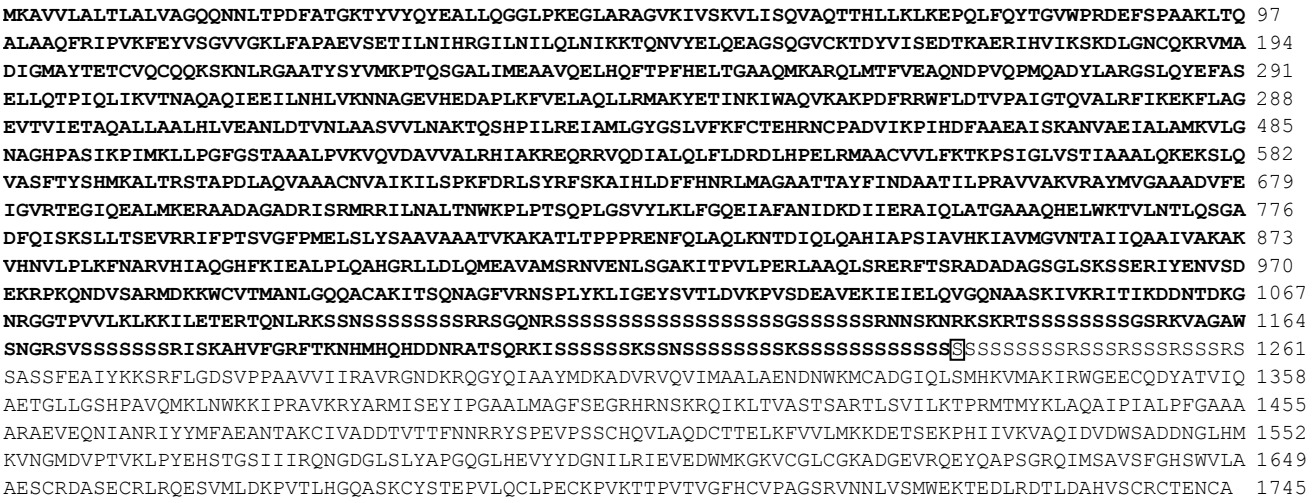


Figure 3e. Mise en évidence d'une sérine orpheline située dans un encadré entre le N-ter (en gras) et le C-ter de la Vtg de *S. formosus*. Ces deux domaines ont été définis à l'issu de l'alignement avec le N-ter et le C-ter de HnVtg1.

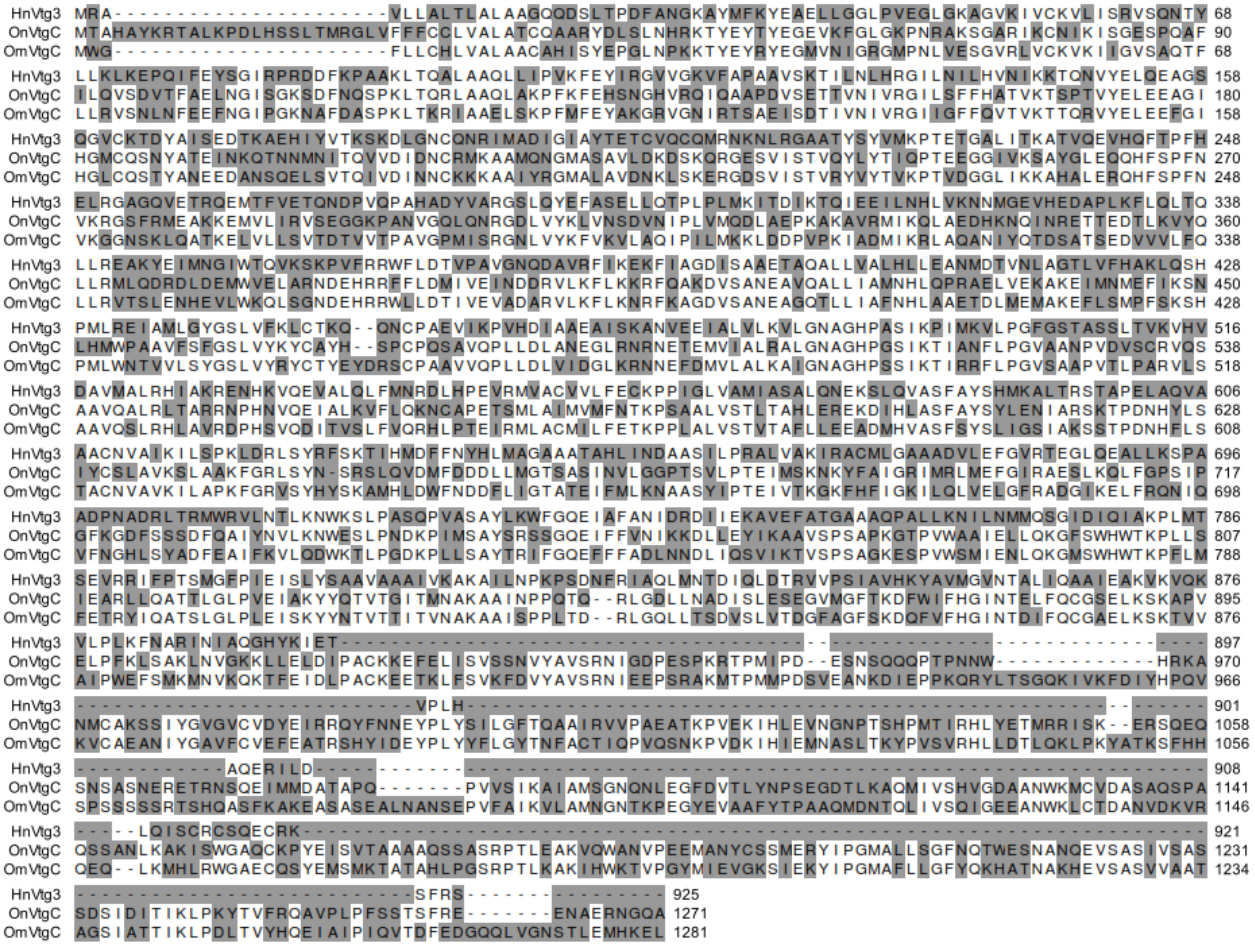


Figure 3f. Alignement entre la VtgC de *H. niloticus* (HnVtg3) et les VtgC de *O. mykiss* (OmVtgC) et *O. niloticus* (OnVtgC). Les domaines peu conservé sont en gris.

Récepteur de la vitellogénine

Les récepteurs de la vitellogénine (VtgR) des téléostéens se classent parmi les récepteurs de lipoprotéines de très basse densité (VLDLR) appartenant à la superfamille des lipoprotéines de basse densité (LDLR) (Li et al., 2003; Mizuta et al., 2013; Pousis et al., 2012).

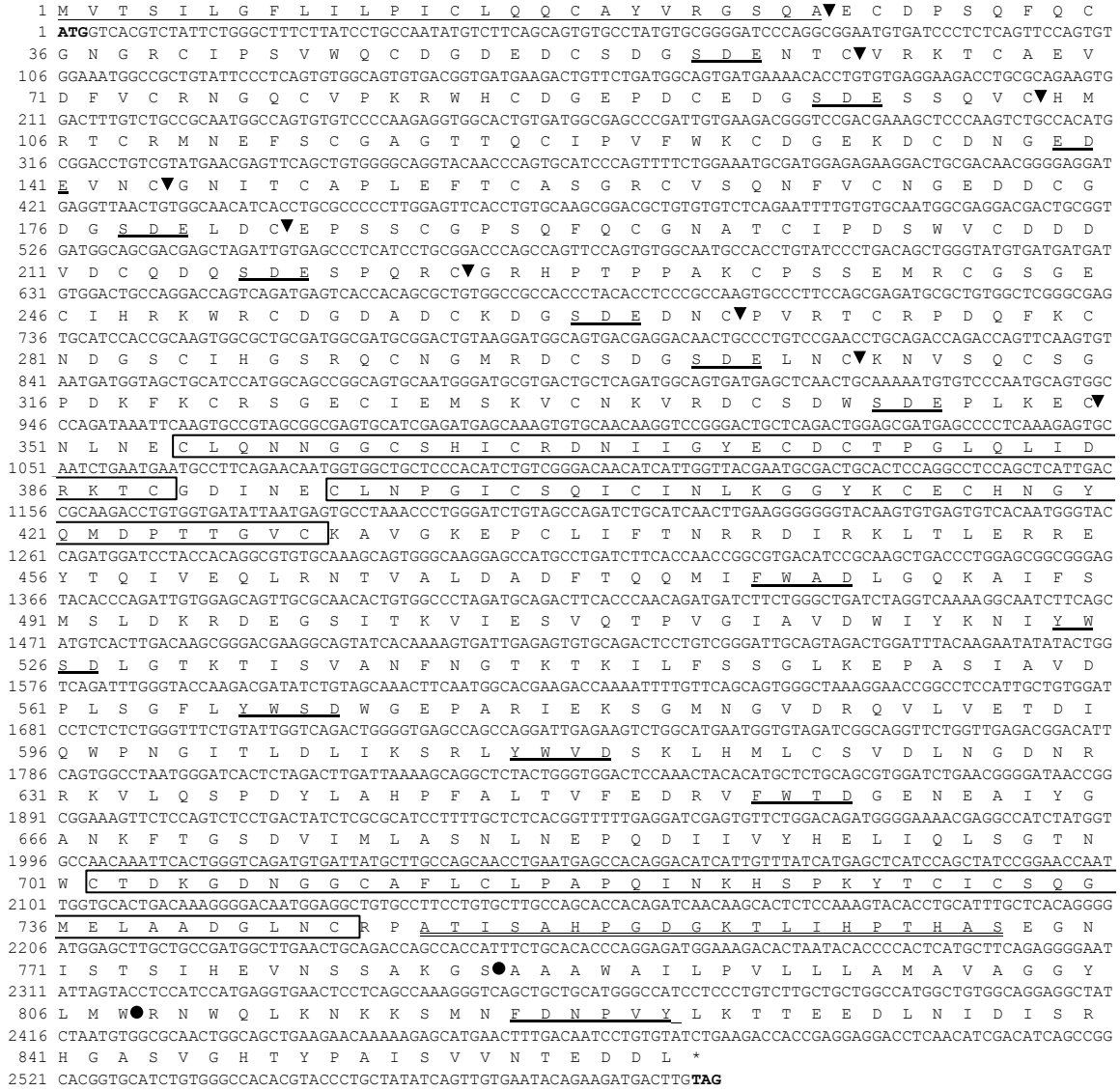


Figure 4a. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite du récepteur de la vitellogénine de *H. niloticus*. Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné, les huit répétitions se liant au ligand (LBR) sont délimitées par deux triangles noirs consécutifs, les trois domaines du facteur de croissance épidermique (EGF1, EGF2 et EGF3) sont successivement situés dans des encadrés, les séquences SDE, EDE, YWS(V)D, FWA(T)D et FDNPVY hautement conservées sont soulignées, le domaine O-glycosylé est doublement souligné, le domaine transmembranaire est délimité par deux ronds noirs et il est suivi du domaine cytoplasmique en position C-terminale.

Deux transcrits de 2583 et 2523 paires de bases codant pour deux VLDLR de 861 et 841 acides aminés ont été identifiés respectivement dans l'ovaire (**figure 4a**) et l'hypophyse. HnVLDLR comprend un peptide signal (Met^{1}-Arg^{26}) suivi de sept et huit domaines pour les formes hypophysaire et ovarienne respectivement (**figure 4b**). HnVLDLR exprimé dans l'ovaire possède un domaine O-glycosylé situé entre Ala^{748}et Ser^{767} qui est absent de la forme hypophysaire. En dehors du domaine O-glycosylé, les autres domaines des deux formes de HnVLDLR ont des séquences en acides aminés identiques.

Le Ligand Binding Domain (LBD) est composé de huit Ligand Binding Repeats (LBR) de 39 à 44 acides aminés riches chacun de six cystéines et de motifs SDE (dans LBR1-2, 4-7) et EDE (LBR3). Les domaines précurseurs du facteur de croissance épidermique (EGF) avec trois répétitions EGF1 (Cys^{355}-Cys^{389}), EGF2 (Cys^{395} - Cys^{429}) et EGF3 (Cys^{702}-Cys^{745}) comprennent chacun six cystéines.

Entre EGF2 et EGF3, il existe un domaine comprenant cinq séquences de quatre acides aminés de type YWS(V)D et FWA(T)D. Un unique domaine transmembranaire de 23 acides aminés (Ala^{786} à Trp^{808} pour la forme ovarienne) est présent et en position C-terminale, on rencontre un domaine cytoplasmique contenant la séquence FDNPVY.

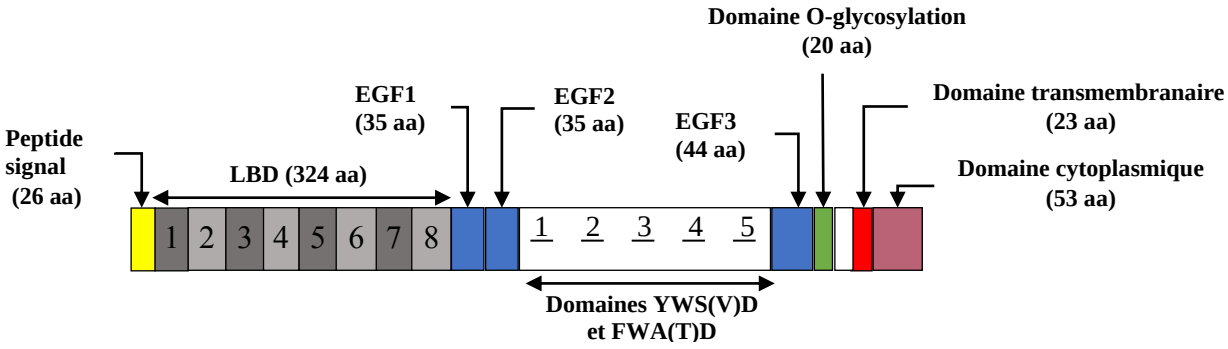


Figure 4b. Construction linéaire des différents domaines du récepteur de la Vtg de *H. niloticus*. Le nombre d'acides aminés (aa) est indiqué. EGF : Facteur de croissance épidermique.

L'analyse de l'homologie des séquences en acides aminés (**figure 4c**) montre qu'en dehors du domaine O-glycosylé qui est absent des VLDLR de certaines espèces, les séquences particulières (SDE, EDE, YWS(V)D, FWA(T)D et FDNPVY) sont hautement conservées et HnVLDLR partage une forte identité avec les VtgR ou VLDLR de *S. formosus*

(XP_018607358) (94%), *O. bicirrhosum* (AXN72824) (92%), *O. mykiss* (CAD10640) (88%), *C. carpio* (XP_018935318) (87%) et *O. aureus* (AAO27569) (85%).

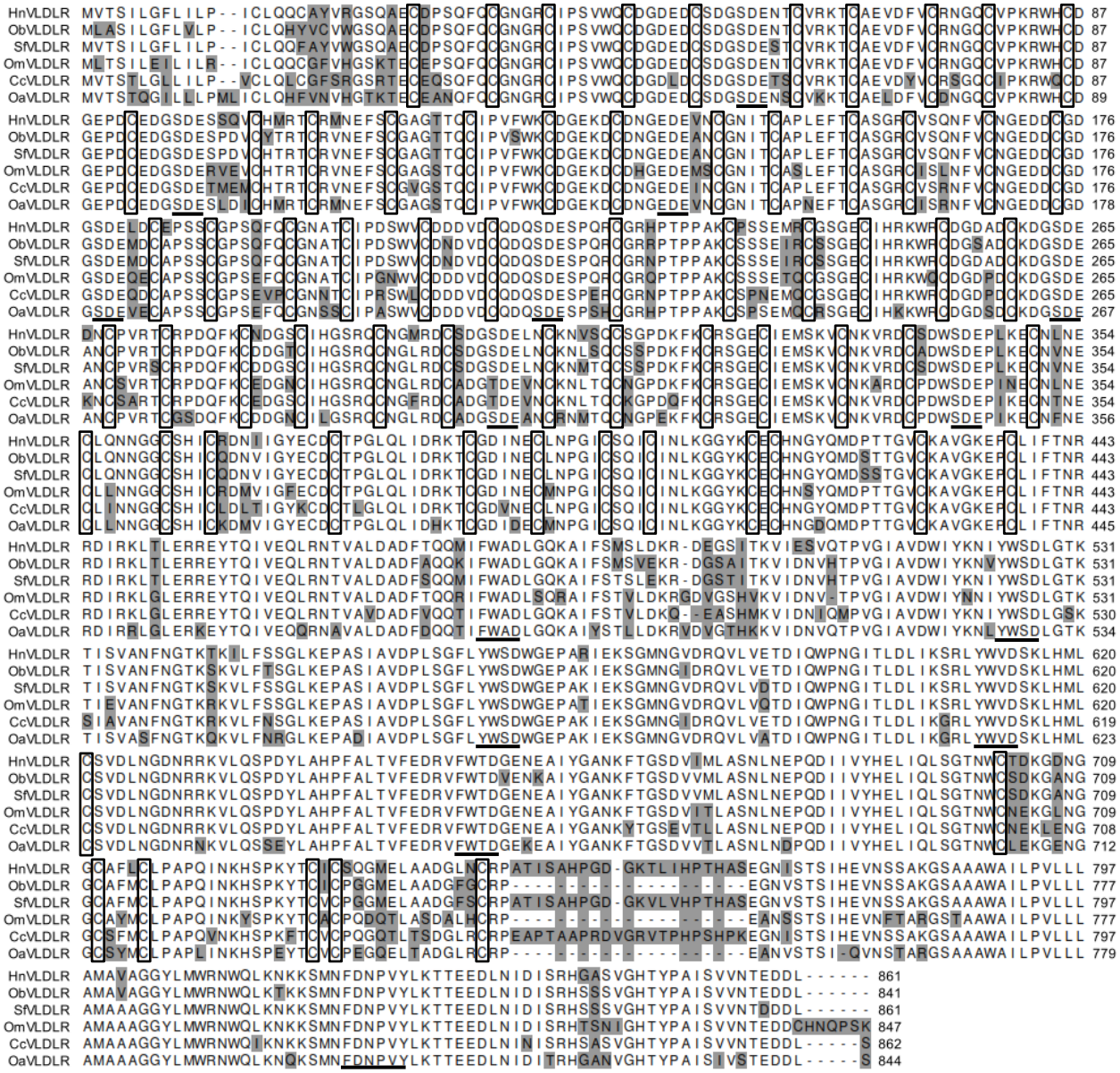


Figure 4c. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs de la Vtg ou récepteur de lipoprotéine de très basse densité (VLDLR) de *H. niloticus* (HnVLDLR) avec les VLDLR de *O. bicirrhosum* (ObVLDLR), *S. formosus* (SfVLDLR), *O. mykiss* (OmVLDLR), *C. carpio* (CcVLDLR) et *O. aureus* (OaVLDLR). Les cystéines conservées entre espèces sont encadrées, les séquences SDE, EDE, YWS(V)D, FWA(T)D et FDNPVY hautement conservées sont soulignées, les domaines peu conservés sont en gris.

Récepteurs du 17β-estradiol (ERs)

Dans cette étude, la nomenclature retenue pour les récepteurs du 17β-estradiol est pour le sous type alpha (ERα), pour le sous type béta ou béta 2 (ERβ) et pour le sous type gamma ou béta 1 (ERγ).
L'analyse *in silico* a permis d'identifier les transcrits de quatre ERβ et un ERγ : HnERβ_X1 de 1674 paires de bases dans le foie et l'ovaire (**figure 5a**), HnERβ_X2 de 1653 paires de bases et HnERβ_X3 de 1281 paires de bases uniquement dans le foie (**figure 5b**) et HnERβ_X4 de 1524 paires de bases et HnERγ de 1443 paires de bases uniquement dans l'ovaire (**figure 5c**). Aucun ERα n'a été identifié dans les tissus examinés.

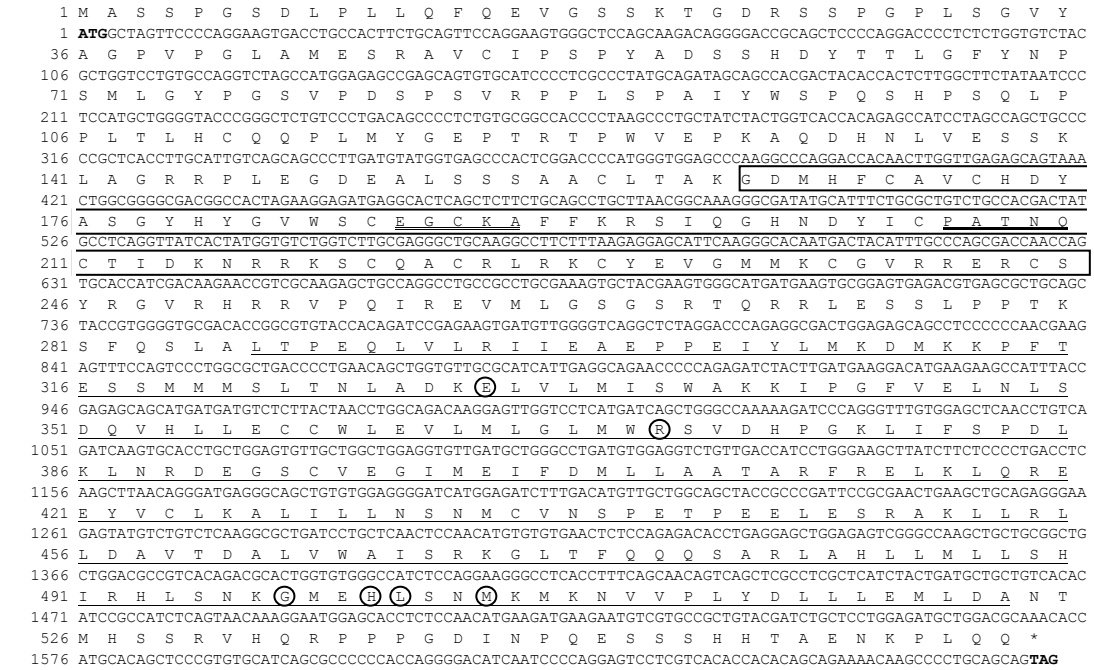


Figure 5a. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite du récepteur œstrogénique béta (ERβ_X1) identifié dans le foie et l'ovaire de *H. niloticus*. Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras. La région A/B en position N-terminale est suivie du domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé dans les encadrés et contenant la boite P soulignée doublement et la boite D en soulignement simple. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est souligné simplement suivi du domaine F en position C-terminale. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'estradiol sont encerclés.

Trois récepteurs apparentés aux récepteurs d'œstrogènes (ERRs) ont par ailleurs été identifiés : HnERRα de 1296 paires de bases dans le foie, HnERRγ_X1 de 1068 paires de bases et HnERRγ_X2 de 1101 paires de bases dans l'ovaire.

Les séquences protéiques déduites pour HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3, HnERβ_X4, HnERγ, HnERRα, HnERRγ_X1 et HnERRγ_X2 comportent respectivement 558 aa, 551 aa, 427 aa, 508 aa, 481 aa, 432 aa, 356 aa et 367 aa.

(ERβ_X2)

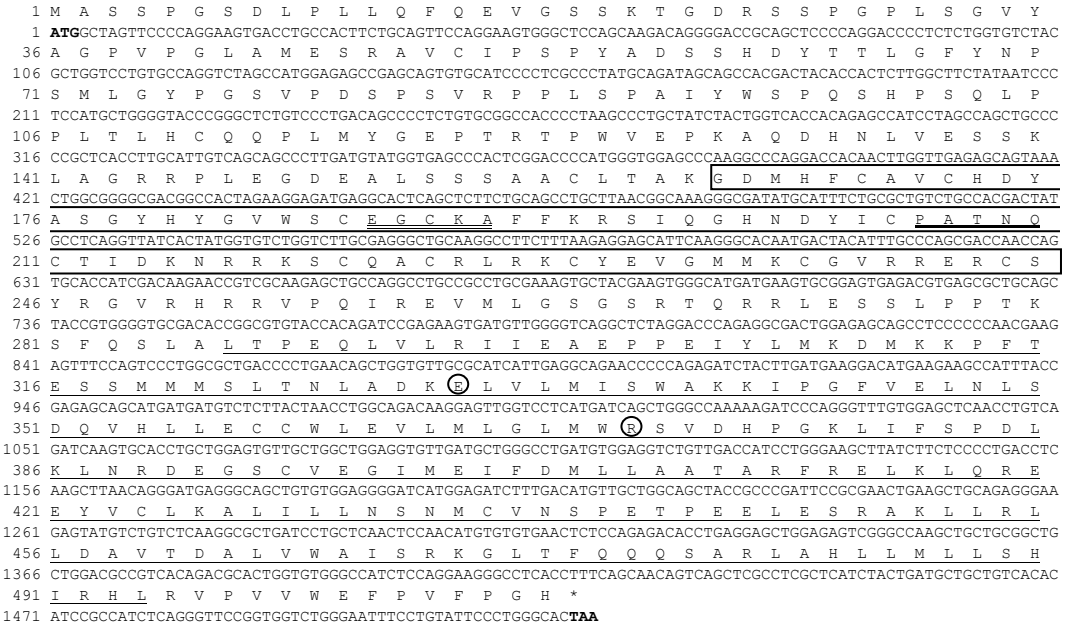
```
   1 M  A  S  S  P  G  S  D  L  P  L  L  Q  F  Q  E  V  G  S  S  K  T  G  D  R  S  S  P  G  P  L  S  G  V  Y
   1 ATGGCTAGTTCCCCAGGAAGTGACCTGCCACTTCTGCAGTTCCAGGAAGTGGGCTCCAGCAAGACAGGGGACCGCAGCTCCCCAGGACCCCTCTCTGGTGTCTAC
  36 A  G  P  V  P  G  L  A  M  E  S  R  A  V  C  I  P  S  P  Y  A  D  S  S  H  D  Y  T  T  L  G  F  Y  N  P
 106 GCTGGTCCTGTGCCAGGTCTAGCCATGGAGAGCCGAGCAGTGTGCATCCCCTCGCCCTATGCAGATAGCAGCCACGACTACACCACTCTTGGCTTCTATAATCCC
  71 S  M  L  G  Y  P  G  S  V  P  D  S  P  S  V  R  P  P  L  S  P  A  I  Y  W  S  P  Q  S  H  P  S  Q  L  P
 211 TCCATGCTGGGGTACCCGGGCTCTGTCCCTGACAGCCCCTCTGTGCGGCCACCCCTAAGCCCTGCTATCTACTGGTCACCACAGAGCCATCCTAGCCAGCTGCCC
 106 P  L  T  L  H  C  Q  Q  P  L  M  Y  G  E  P  T  R  T  P  W  V  E  P  K  A  Q  D  H  N  L  V  E  S  S  K
 316 CCGCTCACCTTGCATTGTCAGCAGCCCTTGATGTATGGTGAGCCCACTCGGACCCCATGGGTGGAGCCCAAGGCCCAGGACCACAACTTGGTTGAGAGCAGTAAA
 141 L  A  G  R  R  P  L  E  G  D  E  A  L  S  S  S  A  A  C  L  T  A  K  G  D  M  H  F  C  A  V  C  H  D  Y
 421 CTGGCGGGGCGACGGCCACTAGAAGGAGATGAGGCACTCAGCTCTTCTGCAGCCCTGCTTAACGGCAAAGGGCGATATGCATTTCTGCGCTGTCTGCCACGACTAT
 176 A  S  G  Y  H  Y  G  V  W  S  C  E  G  C  K  A  F  F  K  R  S  I  Q  G  H  N  D  Y  I  C  P  A  T  N  Q
 526 GCCTCAGGTTATCACTATGGTGTCTGGTCTTGCGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTTAAGAGGAGCATTCAAGGGCACAATGACTACATTTGCCCAGCGACCAACCAG
 211 C  T  I  D  K  N  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  L  R  K  C  Y  E  V  G  M  M  K  C  G  V  R  R  E  R  C  S
 631 TGCACCATCGACAAGAACCGTCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGCCTGCGAAAGTGCTACGAAGTGGGCATGATGAAGTGCGGAGTGAGACGTGAGCGCTGCAGC
 246 Y  R  G  V  R  H  R  R  V  P  Q  I  R  E  V  M  L  G  S  G  S  R  T  Q  R  R  L  E  S  S  L  P  P  T  K
 736 TACCGTGGGGTGCGACACCGGCGTGTACCACAGATCCGAGAAGTGATGTTGGGGTCAGGCTCTAGGACCCAGAGGCGACTGGAGAGCAGCCTCCCCCCAACGAAG
 281 S  F  Q  S  L  A  L  T  P  E  Q  L  V  L  R  I  I  E  A  E  P  P  E  I  Y  L  M  K  D  M  K  K  P  F  T
 841 AGTTTCCAGTCCCTGGCGCTGACCCCTGAACAGCTGGTGTTGCGCATCATTGAGGCAGAACCCCCAGAGATCTACTTGATGAAGGACATGAAGAAGCCATTTACC
 316 E  S  S  M  M  M  S  L  T  N  L  A  D  K  E  L  V  L  M  I  S  W  A  K  K  I  P  G  F  V  E  L  N  L  S
 946 GAGAGCAGCATGATGATGTCTCTTACTAACCTGGCAGACAAGGAGTTGGTCCTCATGATCAGCTGGGCCAAAAAGATCCCAGGGTTTGTGGAGCTCAACCTGTCA
 351 D  Q  V  H  L  L  E  C  C  W  L  E  V  L  M  L  G  L  M  W  R  S  V  D  H  P  G  K  L  I  F  S  P  D  L
1051 GATCAAGTGCACCTGCTGGAGTGTTGCTGGCTGGAGGTGTTGATGCTGGGCCTGATGTGGAGGTCTGTTGACCATCCTGGGAAGCTTATCTTCTCCCCTGACCTC
 386 K  L  N  R  D  E  G  S  C  V  E  G  I  M  E  I  F  D  M  L  L  A  A  T  A  R  F  R  E  L  K  L  Q  R  E
1156 AAGCTTAACAGGGATGAGGGCAGCTGTGTGGAGGGGATCATGGAGATCTTTGACATGTTGCTGGCAGCTACCGCCCGATTCCGCGAACTGAAGCTGCAGAGGGAA
 421 E  Y  V  C  L  K  A  L  I  L  L  N  S  K  T  P  E  E  L  E  S  R  A  K  L  L  R  L  L  D  A  V  T  D  A
1261 GAGTATGTCTGTCTCAAGGCGCTGATCCTGCTCAACTCCAAGACACCTGAGGAGCTGGAGAGTCGGGCCAAGCTGCTGCGGCTGCTGGACGCCGTCACAGACGCA
 456 L  V  W  A  I  S  R  K  G  L  T  F  Q  Q  Q  S  A  R  L  A  H  L  L  M  L  L  S  H  I  R  H  L  S  N  K
1366 CTGGTGTGGGCCATCTCCAGGAAGGGCCTCACCTTTCAGCAACAGTCAGCTCGCCTCGCTCATCTACTGATGCTGCTGTCACACATCCGCCATCTCAGTAACAAA
 491 G  M  E  H  L  S  N  M  K  M  K  N  V  V  P  L  Y  D  L  L  L  E  M  L  D  A  N  T  M  H  S  S  R  V  H
1471 GGAATGGAGCACCTCTCCAACATGAAGATGAAGAATGTCGTGCCGCTGTACGATCTGCTCCTGGAGATGCTGGACGCAAACACCATGCACAGCTCCCGTGTGCAT
 526 Q  R  P  P  P  G  D  I  N  P  Q  E  S  S  S  H  H  T  A  E  N  K  P  L  Q  Q  *
1576 CAGCGCCCCCCACCAGGGGACATCAATCCCCAGGAGTCCTCGTCACACCACACAGCAGAAAACAAGCCCCTGCAGCAGTAG
```

(ERβ_X3)

```
   1 M  H  A  S  L  C  P  S  K  L  A  G  R  R  P  L  E  G  D  E  A  L  S  S  S  A  A  C  L  T  A  K  G  D  M
   1 ATGCATGCTTCCCTGTGTCCCAGTAAACTGGCGGGGCGACGGCCACTAGAAGGAGATGAGGCACTCAGCTCTTCTGCAGCCTGCTTAACGGCAAAGGGCGATATG
  36 H  F  C  A  V  C  H  D  Y  A  S  G  Y  H  Y  G  V  W  S  C  E  G  C  K  A  F  F  K  R  S  I  Q  G  H  N
 106 CATTTCTGCGCTGTCTGCCACGACTATGCCTCAGGTTATCACTATGGTGTCTGGTCTTGCGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTTAAGAGGAGCATTCAAGGGCACAAT
  71 D  Y  I  C  P  A  T  N  Q  C  T  I  D  K  N  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  L  R  K  C  Y  E  V  G  M  M  K
 211 GACTACATTTGCCCAGCGACCAACCAGTGCACCATCGACAAGAACCGTCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGCCTGCGAAAGTGCTACGAAGTGGGCATGATGAAG
 106 C  G  V  R  R  E  R  C  S  Y  R  G  V  R  H  R  R  V  P  Q  I  R  E  V  M  L  G  S  G  S  R  T  Q  R  R
 316 TGCGGAGTGAGACGTGAGCGCTGCAGCTACCGTGGGGTGCGACACCGGCGTGTACCACAGATCCGAGAAGTGATGTTGGGGTCAGGCTCTAGGACCCAGAGGCGA
 141 L  E  S  S  L  P  P  T  K  S  F  Q  S  L  A  L  T  P  E  Q  L  V  L  R  I  I  E  A  E  P  P  E  I  Y  L
 421 CTGGAGAGCAGCCTCCCCCCAACGAAGAGTTTCCAGTCCCTGGCGCTGACCCCTGAACAGCTGGTGTTGCGCATCATTGAGGCAGAACCCCCAGAGATCTACTTG
 176 M  K  D  M  K  K  P  F  T  E  S  S  M  M  M  S  L  T  N  L  A  D  K  E  L  V  L  M  I  S  W  A  K  K  I
 526 ATGAAGGACATGAAGAAGCCATTTACCGAGAGCAGCATGATGATGTCTCTTACTAACCTGGCAGACAAGGAGTTGGTCCTCATGATCAGCTGGGCCAAAAAGATC
 211 P  G  F  V  E  L  N  L  S  D  Q  V  H  L  L  E  C  C  W  L  E  V  L  M  L  G  L  M  W  R  S  V  D  H  P
 631 CCAGGGTTTGTGGAGCTCAACCTGTCAGATCAAGTGCACCTGCTGGAGTGTTGCTGGCTGGAGGTGTTGATGCTGGGCCTGATGTGGAGGTCTGTTGACCATCCT
 246 G  K  L  I  F  S  P  D  L  K  L  N  R  D  E  G  S  C  V  E  G  I  M  E  I  F  D  M  L  L  A  A  T  A  R
 736 GGGAAGCTTATCTTCTCCCCTGACCTCAAGCTTAACAGGGATGAGGGCAGCTGTGTGGAGGGGATCATGGAGATCTTTGACATGTTGCTGGCAGCTACCGCCCGA
 281 F  R  E  L  K  L  Q  R  E  E  Y  V  C  L  K  A  L  I  L  L  N  S  N  M  C  V  N  S  P  E  T  P  E  E  L
 841 TTCCGCGAACTGAAGCTGCAGAGGGAAGAGTATGTCTGTCTCAAGGCGCTGATCCTGCTCAACTCCAACATGTGTGTGAACTCTCCAGAGACACCTGAGGAGCTG
 316 E  S  R  A  K  L  L  R  L  L  D  A  V  T  D  A  L  V  W  A  I  S  R  K  G  L  T  F  Q  Q  Q  S  A  R  L
 946 GAGAGTCGGGCCAAGCTGCTGCGGCTGCTGGACGCCGTCACAGACGCACTGGTGTGGGCCATCTCCAGGAAGGGCCTCACCTTTCAGCAACAGTCAGCTCGCCTC
 351 A  H  L  L  M  L  L  S  H  I  R  H  L  S  N  K  G  M  E  H  L  S  N  M  K  M  K  N  V  V  P  L  Y  D  L
1051 GCTCATCTACTGATGCTGCTGTCACACATCCGCCAATCTCAGTAACAAAGGAATGGAGCACCTCTCCAACATGAAGATGAAGAATGTCGTGCCGCTGTACGATCTG
 386 L  L  E  M  L  D  A  N  T  M  H  S  S  R  V  H  Q  R  P  P  P  G  D  I  N  P  Q  E  S  S  S  H  H  T  A
1156 CTCCTGGAGATGCTGGACGCAAACACCATGCACAGCTCCCGTGTGCATCAGCGCCCCCCACCAGGGGACATCAATCCCCAGGAGTCCTCGTCACACCACACAGCA
 421 E  N  K  P  L  Q  Q  *
1261 GAAAACAAGCCCCTGCAGCAGTAG
```

Figure 5b. Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques béta (ERβ_X2 et ERβ_X3) identifiés uniquement dans le foie de *H. niloticus*. Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras. La région A/B en position N-terminale est suivie du domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé dans les encadrés et contenant la boite P soulignée doublement et la boite D en soulignement simple. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est souligné simplement suivi du domaine F en position C-terminale. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'estradiol sont encerclés.

(ERβ_X4)



(ERγ)

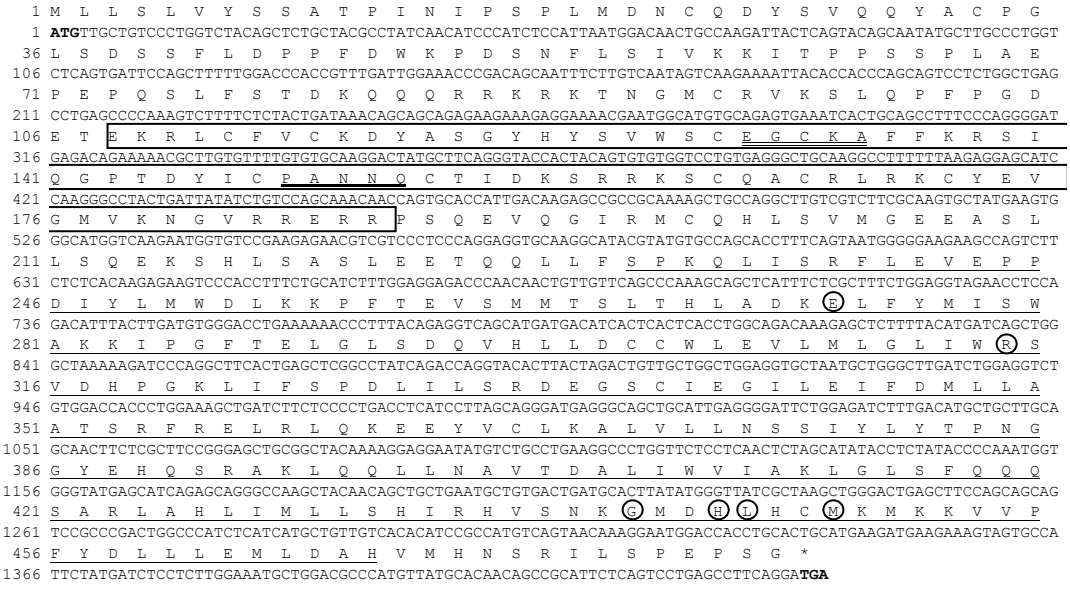


Figure 5c. Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques béta (ERβ_X4) et gamma (ERγ) identifiés uniquement dans l'ovaire de *H. niloticus*. Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras. La région A/B en position N-terminale est suivie du domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé dans les encadrés et contenant la boite P soulignée doublement et la boite D en soulignement simple. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est souligné simplement suivi du domaine F en position C-terminale. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'estradiol sont encerclés.

HnERs (**figure 6**) et HnERRs ont une structure secondaire composée de cinq domaines. Il s'agit du domaine situé à l'extrémité N-terminale (A/B) qui contient la première fonction d'activation AF-1, du domaine de liaison à l'ADN (DBD), de la séquence flanquante D qui favorise la rotation du DBD (Aranda & Pascual, 2001) et constitue un site d'interaction avec des protéines

corépresseurs (R. Kumar et al., 2011), du domaine de liaison au ligand (LBD) où le 17β-estradiol (E2) se lie à des acides aminés pour induire la seconde fonction d'activation AF-2 (Aranda & Pascual, 2001 ; Kato et al., 1995) et d'une région C-terminale F dont aucune fonction spécifique n'est encore connue chez les poissons (Aranda & Pascual, 2001 ; Nelson & Habibi, 2013).

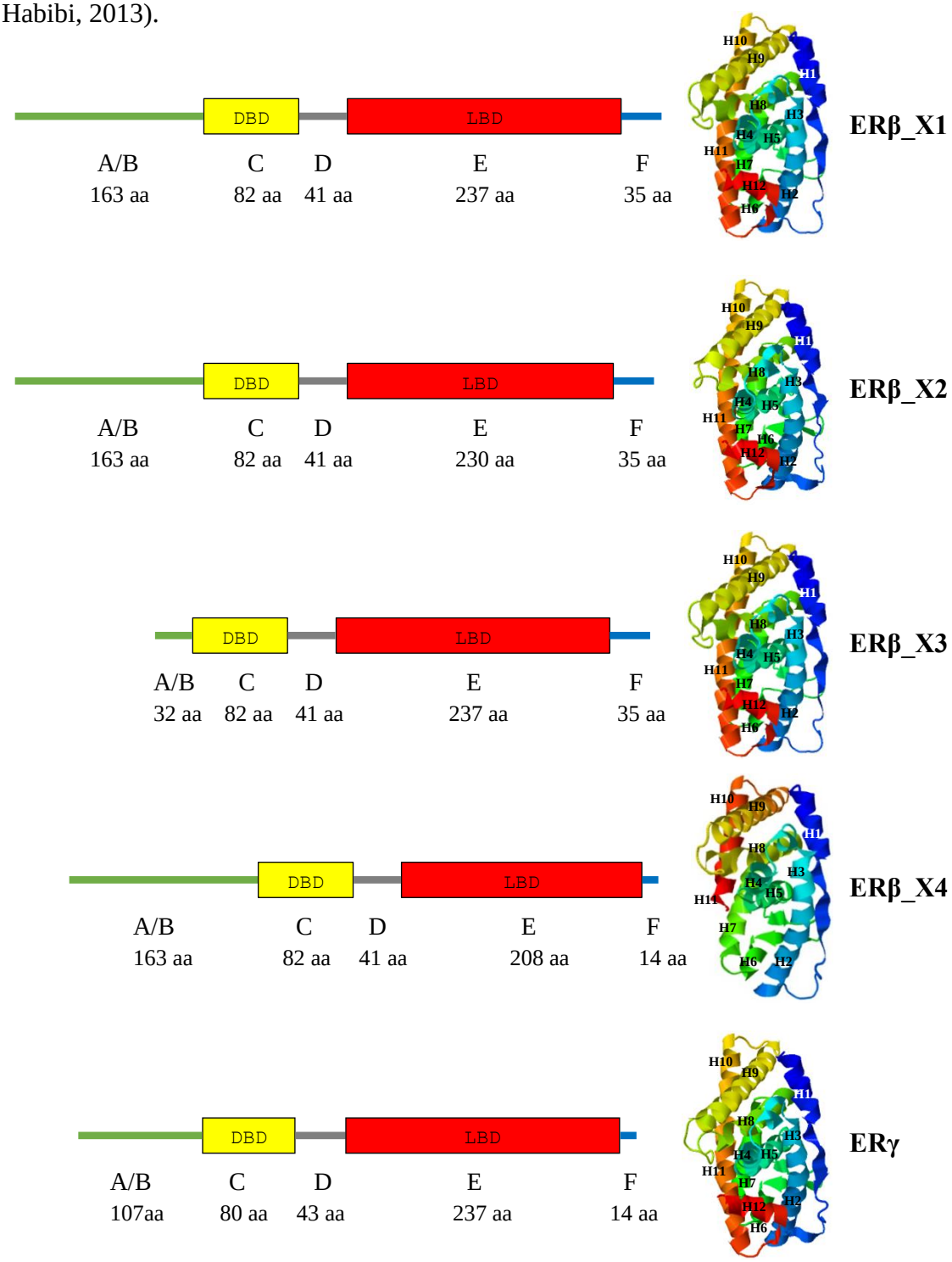


Figure 6. Structure secondaire des récepteurs œstrogéniques béta (ERβ_X1, ERβ_X2, ERβ_X3 et ERβ_X4) et gamma (ERγ) de *Heterotis niloticus* avec les cinq domaines caractéristiques et le nombre d'acides aminés (aa) correspondant. La structure en hélice α des LBD obtenue avec I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) montre que les 12 hélices (H1 à H12) sont conservées chez les formes ERβ_X1, ERβ_X2, ERβ_X3 et ERγ, la forme ERβ_X4 a une H11 réduite et H12 est absente.

Les quatre formes de HnERβ (**figure 7a**) ont les domaines DBD et D identiques. Le domaine A/B de HnERβ_X3a un nombre réduit d'acides aminés (32) peu conservés au niveau de l'extrémité N-terminale par rapport aux autres HnERβ qui ont un domaine A/B identique de 163 acides aminés. HnERβ_X1 et HnERβ_X3 ont un LBD identique alors que les LBD des formes HnERβ_X2 et HnERβ_X4 ne possèdent pas respectivement la séquence NMCVNSPE et la séquence située entre Ser^{494} et Ala^{523} de HnERβ_X1. Le domaine F de HnERβ_X4 de 14 acides aminés diffère des autres HnERβ qui ont un domaine F identique de 35 acides. HnERβ et HnERγ partagent 58 à 68% d'identité en acides aminés et n'ont aucun domaine en commun.

Figure 7. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques (ER) béta (a) et des domaines de liaison à l'ADN (DBD) des ERs et ERRs (b) de *H. niloticus* (HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3, HnERβ_X4, HnERRα, HnERRγ_X1 et HnERRγ_X2) Le noyau du domaine de liaison à l'ADN (DBD) est encadré, les acides aminés impliqués dans la liaison avec le 17β-estradiol sont indiqués par des triangles noirs. Les domaines peu conservés sont en gris.

Les HnERs partagent moins de 48% d'identité avec les HnERRs. Les HnERRγ partagent 78% d'identité entre eux et moins de 59% d'identité avec ERRα. Cependant, le noyau du DBD des différents récepteurs partagent une plus grande identité (**figure 7b**) : 89% entre ERβ et ERγ, 68 à 70% entre ERs et ERRs, 97% entre ERRγ_X1 et ERRγ_X2 et 94% entre ERRγ et ERRα.

Le noyau du DBD de tous les récepteurs (ERs et ERRs) de *H. niloticus* est composé de 66 acides aminés dont six cystéines suivies d'une extension COOH-terminale (CTE) comprenant entre 10 (pour HnERγ) et 25 (pour tous les ERRs) acides aminés. Contrairement au noyau du DBD, le LBD est beaucoup plus variable, HnERβ et HnERγ partagent 76 à 77% d'identité et HnERs partage moins de 33% d'identité avec HnERRs.

Figure 7c. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques (ER) béta de *H. niloticus* (HnERβ_X1) avec les ERβ de *S. formosus* (SfERβ), *O. bicirrhosum* (ObERβ), *O. mykiss* (OmERβ et OmERγ), *O. aureus* (OaERβ et OaERγ) et *C. carpio* (CcERβ et CcERγ). Le noyau du domaine de liaison à l'ADN (DBD) est encadré, les acides aminés impliqués dans la liaison avec le 17β-estradiol sont indiqués par des triangles noirs. Les domaines peu conservés sont en gris.

La comparaison des ERβ de *H. niloticus* avec d'autres espèces de téléostéens (**figure 7c**) montre que le noyau du DBD de HnERβ est identique à celui de ERβ de *S. formosus* (XP_018583081.1) et de *O. bicirrhosum* (BAT68972.1) et partage 98% d'identité avec le noyau du DBD de ERβ de *O. mykiss* (CAC06714), *O. aureus* (ACF75103) et *C. carpio* (BAF99814). Le LBD de HnERβ_X1 partage une identité de 95% avec *S. formosus*, 93% avec *O. bicirrhosum* et 82% avec *O. mykiss*, *O. aureus* et *C. carpio*. La comparaison des séquences

du DBD/LBD (**figure 7d**) entre HnERγ et les ERγ d'autres espèces montre une identité de 89/74% pour *O. mykiss* (NP_001118042), 89/72% pour *O. aureus* (ACF75102.1) et 89/70% pour *C. carpio* (BAF99813.1). Les identités en acides aminés entre ERγ sont plus faibles qu'entre ERβ.

Figure 7d. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques (ER) gamma de *H. niloticus* (HnERγ) avec les ERγ de *O. mykiss* (OmERγ), *O. aureus* (OaERγ) et *C. carpio* (CcERγ). Le noyau du domaine de liaison à l'ADN (DBD) est encadré, les acides aminés impliqués dans la liaison avec le 17β-estradiol sont indiqués par des triangles noirs. Les domaines peu conservés sont en gris.

La boite P intervenant dans la reconnaissance de l'ADN au niveau de la DBD (Aranda & Pascual, 2001) est représentée par deux peptides : EGCKA au niveau des HnERs et EACKA au niveau des HnERRs. La boite D qui est impliquée dans la dimérisation des récepteurs (Aranda & Pascual, 2001) est représentée par quatre peptides, PATNQ (HnERβ), PANNQ (HnERγ), PASNE (HnERRα), et PATNE (HnERRγ).

Les six acides aminés impliqués dans la liaison avec E2 (Sabo-Attwood et al., 2004) sont présents chez HnERβ_X1 (Glu^{330}, Arg^{371}, Gly^{498}, His^{501}, Leu^{502} et Met^{505}), HnERβ_X2 (Glu^{330}, Arg^{371}, Gly^{498}, His^{501}, Leu^{502} et Met^{505}), HnERβ_X3 (Glu^{330}, Arg^{371}, Gly^{498}, His^{501}, Leu^{502} et Met^{505}) et HnERγ (Glu^{273}, Arg^{314}, Gly^{441}, His^{444}, Leu^{445} et Met^{448}) (**figure 5** et **figure 7**). HnERβ_X2 ne conserve que deux acides aminés impliqués dans la liaison avec E2 (Glu^{330}, Arg^{371}) et ils sont absents au niveau des HnERRs. Les LBD de HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3 et HnERγ (**figure 6**) ont une structure tertiaire composée de 12 hélices α avec l'hélice 12 située respectivement de Leu^{513}- Leu^{521}, Leu^{506} - Leu^{514}, Leu^{382} - Leu^{390} et Tyr^{457} –

Asp[465]. Quant au LBD de HnERβ_X2, il est dépourvu de l'hélice 12 et possède une hélice 11 beaucoup plus réduite que les autres HnERβ.

Prolactine (PRL)

La prolactine (PRL) est une neurohormone polypeptidique multifonctionnelle dont la fonction de reproduction chez les poissons englobe le cycle et le développement reproducteur, la fraie et les soins parentaux (Whittington & Wilson, 2013).

L'expression de la prolactine de *H. niloticus* (HnPRL) dans l'hypophyse a été identifiée grâce à un transcrit de 627 paires de bases codant pour 209 acides aminés (**figure 8a**).

Le précurseur protéique de HnPRL possède un peptide signal de 25 acides aminés (Met[1]- Cys[25]), quatre hélices α majeures représentant 56% de l'ensemble de la protéine : hélice 1 (Phe[28]- His[56]), hélice 2 (Glu[69]- Ser[115]), hélice 3 (Gln[122]- Lys[149]) et hélice 4 (Asp[169]- Val[201]) et deux courtes hélices α entre l'hélice 1 et l'hélice 2 : hélice 1' (Val[60]- Lys[62]) et hélice 1" (Lys[81]- Ser[86]) (**figure 8b**). La structure tertiaire de HnPRL (**figure 8c**) montre que les quatre hélices majeures forment deux paires antiparallèles, hélice 1 / hélice 4 et hélice 2 / hélice 3. HnPRL mature contient quatre cystéines dont une entre l'hélice 1' et l'hélice 1" (Cys[70]), deux dans l'hélice 4 (Cys[182] et Cys[199]) et une en fin de séquence (Cys[209]). A partir des alignements effectués (**figure 8d**), HnPRL montre une conservation des quatre cystéines mais des identités en acides aminés élevées ou moyennes avec les PRL de *S. formosus* (XP_018592416) (74%), *C. carpio* (CAA37063) (58%), *O. mykiss* (AAA49611) (53%) et *O. niloticus* (AAA53281) (49%).

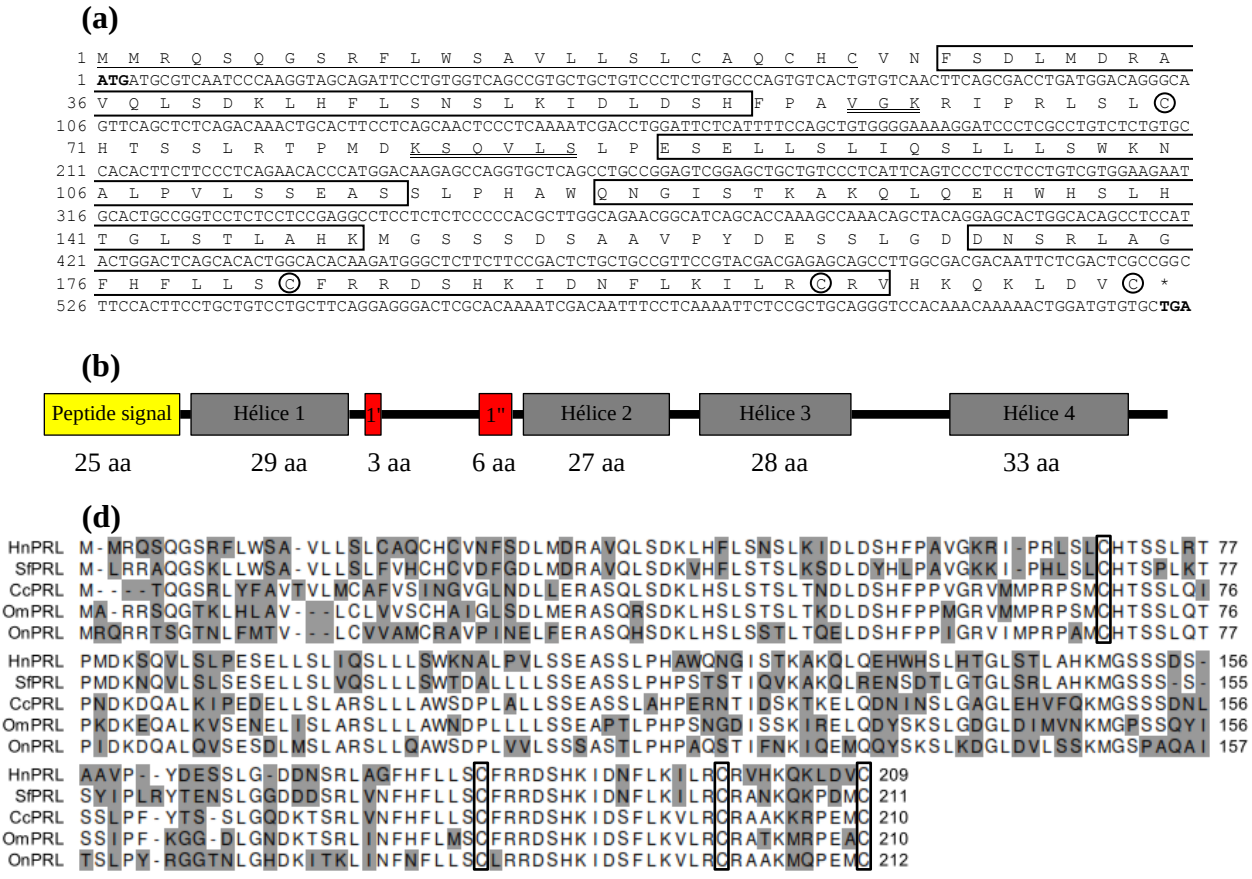


Figure 8. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) de la prolactine (PRL) de *H. niloticus* (HnPRL), structure secondaire de HnPRL avec les différents domaines (b), structure tertiaire obtenue avec I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) montrant les hélices α de HnPRL (c) et alignement (d) avec les PRL de *S. formosus* (SfPRL), *O. mykiss* (OmPRL), *O. niloticus* (OnPRL) et *C. carpio* (CcPRL).
Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les quatre hélices majeures (1, 2, 3 et 4) disposées de façon successive sont dans des encadrés et les courtes hélices 1' et 1" sont doublement soulignées. Dans la figure (d), les quatre cystéines conservées sont dans des cercles, les tirets marquent un défaut d'alignement, les chiffres indiquent la position des acides aminés en fin de séquence, les domaines peu conservés sont en gris.

Récepteur de la prolactine (PRLR)

Le récepteur de HnPRL (HnPRLR) est exprimé dans l'ovaire des femelles en vitellogenèse et est représenté par un transcrit de 1767 paires de bases codant pour une protéine de 589 acides aminés (**figure 9a**). HnPRLR consiste en un peptide signal de 25 acides aminés (Met^{1}- Leu^{25}) suivi de trois domaines (**figure 9b**), un domaine extracellulaire (EC) de 207 acides aminés (Ser^{26}- Arg^{232}), un domaine transmembranaire (TM) de 23 acides aminés (Ser^{233}- Ile^{255}) et un

domaine intracellulaire (IC) de 334 acides aminés (Asn^{256}- Tyr^{589}). L'alignement des séquences de HnPRLR avec les PRLR d'autres espèces de téléostéens (**figure 9c**) montre une identité en acides aminés de 85% avec *S. formosus* (XP_018604730), 57% avec *O. mykiss* (NP_001118071), 55% avec *C. carpio* (AAK95833) et 51% avec *O. niloticus* (NP_001266477).

(a)

```
   1 M  M  W  K  D  S  G  A  P  L  I  L  S  L  L  V  S  V  V  L  D  S  A  C  L  S  P  P  G  K  P  R  L  T  S
   1 ATGATGTGGAAAGACTCTGGAGCCCCACTGATTCTGTCACTGCTGGTCTCTGTGGTCCTGGACAGTGCCTGTCTGTCTCCCCCAGGAAAGCCTCGGCTCACCAGC
  36 C  R  S  P  E  K  E  T  F  T  C  W  W  E  P  G  L  D  G  G  L  P  T  N  Y  S  L  F  Y  R  K  E  N  S  D
 106 TGCCGATCTCCTGAGAAAGAAACCTTCACCTGTTGGTGGGAGCCAGGCTTGGATGGTGGCCTGCCCACCAACTACTCCCTCTTCTACCGCAAAGAAAATTCTGAT
  71 S  V  Y  E  C  P  D  Y  H  T  A  G  K  N  S  C  F  F  S  K  N  D  T  S  I  W  V  N  Y  N  I  T  V  V  A
 211 TCTGTGTATGAGTGCCCAGACTATCACACTGCAGGAAAGAACTCCTGCTTTTTCAGCAAGAATGACACTTCAATCTGGGTGAATTACAACATCACTGTGGTGGCA
 106 T  N  A  L  G  S  N  F  S  D  P  V  D  V  D  V  V  Y  I  V  Q  P  H  T  P  E  N  L  T  V  V  L  E  G  E
 316 ACCAATGCCCTAGGGAGCAACTTCTCAGACCCTGTGGATGTGGATGTTGTGTACATCGTCCAGCCCCACACACCAGAGAACTTAACCGTTGTTTTGGAAGGTGAA
 141 E  N  P  F  L  V  V  R  W  E  P  P  R  M  A  D  T  R  S  G  W  I  T  L  I  Y  Q  L  R  V  K  L  E  K  E
 421 GAAAACCCATTCCTGGTGGTGCGGTGGGAACCCCCTCGCATGGCGGACACACGCTCTGGCTGGATTACTCTCATTTACCAGCTCCGTGTAAAGCTGGAAAAAGAA
 176 E  E  W  E  E  H  F  A  G  Q  Q  K  Q  F  N  I  F  S  L  H  S  G  E  V  Y  M  V  Q  V  R  C  K  P  D  H
 526 GAGGAGTGGGAGGAGCACTTTGCTGGACAGCAGAAGCAGTTTAACATCTTCAGCCTGCACTCGGGGGAGGTGTACATGGTACAGGTCCGCTGTAAGCCTGACCAT
 211 G  F  W  S  E  W  S  T  T  A  Y  V  K  I  P  D  Y  I  S  K  D  R  S  V  W  I  L  I  T  I  F  S  A  F  L
 631 GGCTTCTGGAGTGAATGGAGCACCACCGCTTATGTGAAAATTCCCGACTACATTTCTAAAGACAGGTCAGTTTGGATCCTGATAACTATTTTCTCAGCATTCCTT
 246 F  L  V  F  I  W  T  M  H  I  N  R  N  S  V  K  H  F  L  L  P  P  V  P  G  P  K  I  K  G  F  D  T  Q  L
 736 TTCCTTGTCTTCATATGGACTATGCACATTAACAGAAACAGTGTGAAACATTTTCTCCTCCCCCCTGTGCCTGGACCAAAGATCAAAGGATTTGATACTCAGCTG
 281 L  K  S  G  K  S  E  E  V  F  N  A  L  V  I  Q  G  F  T  P  P  S  Y  Y  D  D  L  L  V  E  Y  L  E  V  Y
 841 CTCAAGAGTGGCAAATCAGAGGAGGTCTTCAATGCCTTGGTTATCCAGGGCTTCACACCACCGTCATACTATGATGATCTGCTGGTGGAGTACCTGGAAGTGTAC
 316 D  N  K  E  Q  V  L  K  L  D  R  K  D  V  Q  E  S  R  F  K  S  K  S  S  S  D  S  D  S  G  R  G  S  C  D
 946 GATAACAAGGAGCAAGTGTTAAAGCTTGATAGAAAGGATGTTCAAGAGAGTCGGTTTAAGTCCAAGAGCTCTTCAGACAGTGACTCTGGGAGAGGCAGTTGTGAC
 351 S  R  T  L  L  M  E  K  C  G  E  P  K  E  D  Q  T  M  I  S  Q  V  K  A  G  E  A  S  R  E  I  L  M  K  N
1051 AGCCGCACATTATTAATGGAGAAATGTGGTGAACCCAAAGAGGACCAGACCATGATATCACAAGTAAAAGCTGGTGAGGCTAGCAGAGAAATATTAATGAAAAAT
 386 D  S  S  I  P  E  S  A  N  V  K  T  K  T  W  P  T  I  C  S  S  Y  H  P  E  W  N  L  C  Y  H  S  I  P  E
1156 GACAGCAGTATCCCAGAATCTGCTAACGTGAAAACCAAAACATGGCCCACTATCTGCTCATCCTATCACCCCGAATGGAATCTATGCTACCACAGTATTCCAGAG
 421 M  P  V  Q  C  Q  V  P  S  S  H  F  S  S  T  H  Q  Q  D  Y  W  E  H  P  A  E  I  Y  H  K  K  P  P  S  G
1261 ATGCCAGTCCAGTGCCAGGTACCTAGCAGCCACTTTTCTTCCACACACCAGCAAGACTATTGGGAACACCCTGCAGAGATCTACCACAAGAAGCCTCCGTCTGGC
 456 Y  R  Y  T  Q  A  Y  S  E  F  N  I  K  G  I  G  M  K  A  S  A  F  P  P  S  K  S  M  E  Y  V  E  V  Q  H
1366 TACAGATATACCCAAGCTTACAGTGAGTTTAACATTAAAGGAATTGGCATGAAAGCATCCGCTTTTCCTCCGTCTAAGTCCATGGAGTATGTGGAGGTTCAGCAT
 491 V  N  Q  E  N  T  L  I  L  K  P  I  S  Q  E  G  P  D  H  M  E  C  G  G  H  D  Y  S  K  V  N  R  V  V  S
1471 GTCAACCAAGAGAACACATTGATATTAAAACCCATCAGCCAAGAGGGTCCAGACCACATGGAGTGTGGAGGACATGATTACAGCAAGGTCAACCGGGTGGTCAGT
 526 D  S  V  L  L  L  Q  R  D  M  S  G  Q  C  L  S  D  C  Q  D  R  E  T  P  G  Q  S  C  T  Q  Q  Q  S  G  K
1576 GACAGTGTCCTCCTGCTTCAAAGGGACATGTCTGGCCAGTGCCTCAGTGACTGCCAGGATAGGGAGACACCAGGGCAGAGCTGCACACAGCAACAGTCTGGAAAG
 561 P  A  E  H  L  Q  V  P  V  A  P  E  T  R  L  T  L  N  G  Y  V  D  T  A  T  M  L  S  Y  *
1681 CCAGCAGAGCACCTGCAAGTCCCTGTGGCTCCAGAAACACGCCTGACACTGAATGGCTATGTGGACACAGCCACCATGTTATCATACTAA
```

(b)

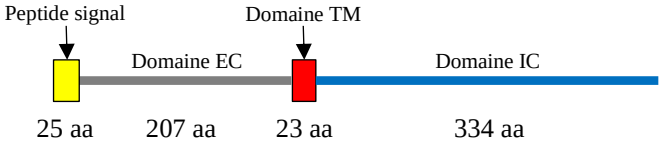


Figure 9. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) et modélisation en boxes avec les différents domaines (b) du récepteur de la prolactine (PRLR) de *H. niloticus* (HnPRLR). Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, le domaine transmembranaire (TM) situé dans des encadrés est entre le domaine extracellulaire (EC) au niveau de l'extrémité N-terminale et le domaine intracellulaire (IC) au niveau de l'extrémité C-terminale.

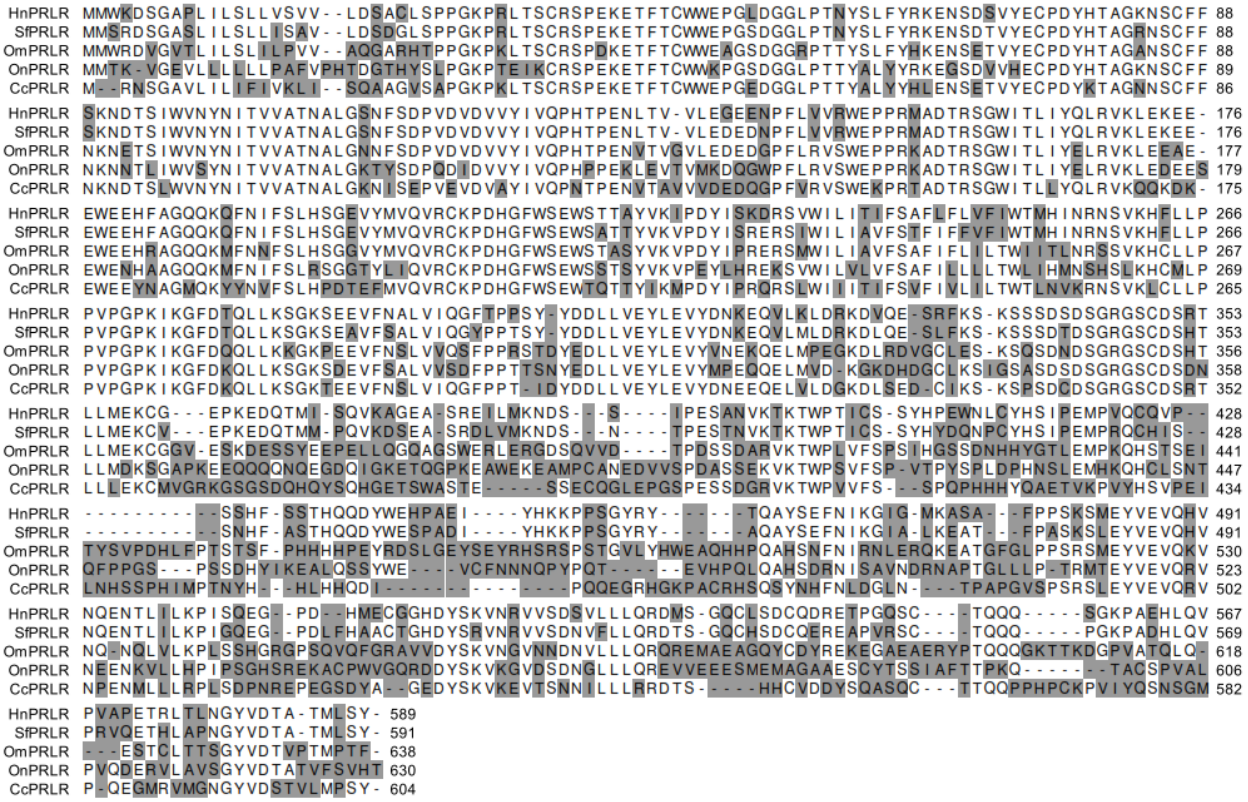


Figure 9c. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs de la prolactine (PRLR) de *H. niloticus* (HnPRLR) avec les PRLR de *S. formosus* (SfPRLR), *O. mykiss* (OmPRLR), *O. niloticus* (OnPRLR) et *C. carpio* (CcPRLR). Les domaines peu conservés sont en gris.

Sous unité alpha de l'hormone glycoprotéique (GPα)

Une sous unité α de l'hormone glycoprotéique (GPα) commune à l'hormone lutéinisante (LH) et à l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Acharjee et al.,2015) a été caractérisée dans l'hypophyse de *H. niloticus*. La séquence nucléique de HnGPα comprend 345 paires de bases codant pour une protéine de 115 acides aminés (**figure 10a**). La structure secondaire (**figure 10b**) permet de distinguer un peptide signal de 24 acides aminés et trois domaines α loop respectivement de 25, 28 et 23 acides aminés. HnGPα compte dix cystéines (Cys^1 à Cys^{10}) et l'α loop 1 est située entre les Cys^1et Cys^4, l'α loop 2 entre les Cys^5et Cys^6 et l'α loop3 entre les Cys^7et Cys^8 (**figure 10a**). Deux sites de N-glycosylation ont été prédits dont un dans l'α loop 2 (NITS) et l'autre dans l'α loop 3 (NHTD).

Une comparaison de séquences (**figure 10c**) montre que HnGPα est identique à la GPα de *A. gigas* (AIG51239) et que certains domaines sont communs avec les GPα de *S. formosus* (XP_018588619.1) (82%), *C. carpio* (CAA39852) (74%), *O. niloticus* (AAP49577) (65%) et *O. mykiss* (BAB17685) (61%).

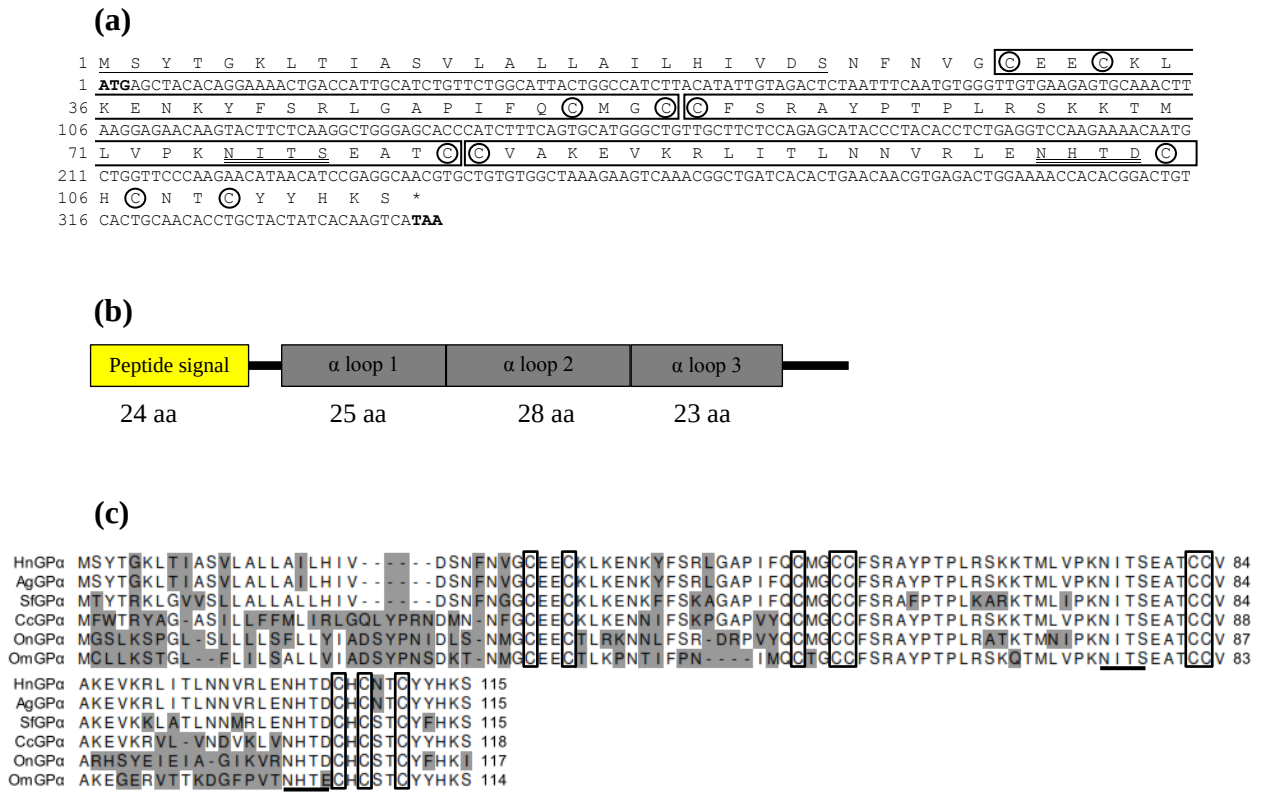


Figure 10. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) de la sous unité alpha de l'hormone glycoprotéique (GPα) de *H. niloticus* (HnGPα), modélisation en boxes avec les différents domaines (b) et alignement (c) avec les GPα de *A. gigas* (AgGPα), *S. formosus* (SfGPα), *O. mykiss* (OmGPα), *O. niloticus* (OnGPα) et *C. carpio* (CcGPα). Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les α loop 1, 2 et 3 disposées de façon successive sont dans des encadrés. Les sites prédits de N-glycosylation sont soulignés et les cystéines sont encerclées. Dans la figure (c), les cystéines conservées entre espèces sont dans des encadrés et les domaines peu conservés sont en gris.

Sous unité β de l'hormone folliculo-stimulante (FSHβ)

Le transcrit de la sous unité β de l'hormone folliculo-stimulante de *H. niloticus* (HnFSHβ) a une séquence de 381 paires de base et code pour une protéine de 127 acides aminés (**figure 11a**).

La structure secondaire de HnFSHβ (**figure 11b**) permet de distinguer un peptide signal de 19 acides aminés, trois domaines β loop 1, 2 et 3 respectivement de 26, 20 et 17 acides aminés et un « seat-belt » loop de 18 acides aminés. HnFSHβ mature compte 12 cystéines (Cys^1- Cys^{12}). La β loop 1 est située entre Cys^1-Cys^4, la β loop 2 entre Cys^5-Cys^6, la β loop3 entre Cys^7-Cys^8 et le « seat-belt » loop entre Cys^{10}- Cys^{12} (**figure 11a**). Un site probable de N-glycosylation (NVSI) se trouve dans la β loop 1 entre Cys^1-Cys^2.

Une comparaison des séquences de FSHβ (**figure 11c**) montre que HnFSHβ partage une haute identité avec FSHβ de *A. gigas* (AIA09918) (86%) et beaucoup moins avec *S. formosus* (KPP62167) (69%), *C. carpio* (O13050) (51%), *O. mykiss* (BAB17686) (44%) et *O. niloticus* (AAP49575) (37%).

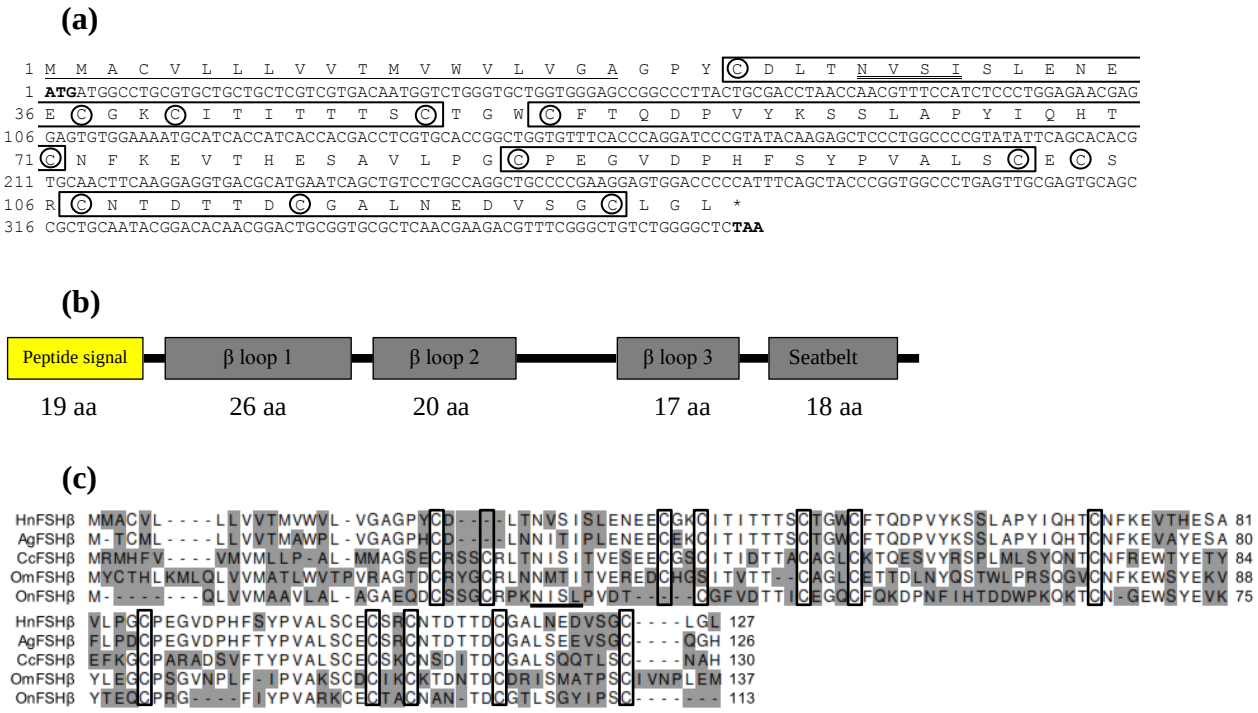


Figure 11. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) de la sous unité béta de l'hormone folliculo-stimulante (FSHβ) de *H. niloticus* (HnFSHβ), modélisation en boxes avec les différents domaines (b) de HnFSHβ et alignement (c) avec les FSHβ de *A. gigas* (AgFSHβ), *O. mykiss* (OmFSHβ), *O. niloticus* (OnFSHβ) et *C. carpio* (CcFSHβ). Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les régions β loop 1, 2, 3 et le "Seatbelt" disposées de façon successive sont dans des encadrés. Le site prédit de N-glycosylation est doublement souligné et les cystéines sont dans des cercles. Dans la figure (c), les cystéines conservées entre espèces sont dans des encadrés et les domaines peu conservés sont en gris.

Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR)

Le récepteur de HnFSH (HnFSHR) est exprimé dans l'ovaire des femelles en vitellogenèse et correspond à un transcrit de 2037 paires de bases codant pour une protéine de 679 acides aminés (**figure 12a**). HnFSHR possède un peptide signal de 37 acides aminés (Met^{1} - Ala^{37}) suivi de quatre domaines extracellulaires (EC) de 322 (EC1), 21 (EC2), 19 (EC3) et 9 (EC4) acides aminés, de sept domaines transmembranaires de 23 acides aminés chacun et quatre domaines intracellulaires (IC) de 8 (IC1), 20 (IC1), 24 (IC1) et 58 (IC1) acides aminés (**figure 12b**).

L'alignement des séquences de HnFSHR avec les FSHR d'autres espèces de téléostéens (**figure 12c**) montre une identité en acides aminés de 64,94 % avec *O. mykiss* (NP_001117799) et 71,23% avec *C. carpio* (XP_018940722).

(a)

```
   1 M  L  L  W  V  Y  H  A  R  Q  R  T  P  T  M  H  Q  V  W  M  L  L  L  G  L  L  P  V  L  L  D  Q  K  L  V
   1 ATGTTACTCTGGGTTTACCACGCCAGACAGAGAACCCCCACAATGCACCAGGTGTGGATGTTGCTCTTGGGGCTTCTCCCAGTGCTTTTGGACCAGAAGTTGGTG
  36 E  A▼H  G  C  F  S  N  R  T  S  C  S  F  F  C  L  G  A  K  I  H  Q  M  P  S  T  I  P  W  N  T  S  S  I
 106 GAGGCGCATGGCTGCTTTAGTAACAGGACCAGTTGCTCCTTCTTCTGCCTGGGGGCCAAAATCCATCAGATGCCCAGCACCATTCCCTGGAACACCAGCAGCATT
  71 E  F  R  L  T  Q  L  R  T  F  P  P  K  A  F  W  G  L  T  E  V  S  R  I  M  L  S  E  N  G  L  L  E  E  I
 211 GAGTTTAGGCTGACGCAGCTGAGGACCTTCCCACCAAAGGCCTTCTGGGGACTGACAGAGGTGTCTCGAATCATGCTGTCAGAGAACGGACTACTGGAAGAAATT
 106 G  P  Q  A  F  Y  N  L  S  K  L  V  E  I  T  I  T  K  S  K  H  L  V  V  I  H  K  D  A  F  L  D  L  P  K
 316 GGACCTCAAGCCTTTTACAACCTCTCCAAACTGGTAGAAATAACAATCACCAAGTCAAAACATCTGGTTGTGATTCATAAGGATGCGTTCCTAGATCTGCCAAAA
 141 L  E  Y  L  T  I  M  N  T  G  L  K  L  L  P  D  F  S  K  I  N  S  A  A  H  G  F  L  L  D  L  Q  D  N  M
 421 CTGGAATACCTAACCATTATGAACACTGGTCTCAAGTTGCTGCCTGATTTCTCCAAAATCAACTCAGCAGCACATGGCTTCCTGCTGGACCTCCAAGACAACATG
 176 H  I  D  V  I  P  P  N  A  F  L  G  L  S  A  D  T  I  K  E  L  R  L  T  K  N  G  I  T  E  V  R  S  H  A
 526 CACATAGATGTGATTCCACCCAATGCCTTTTTGGGACTGAGCGCTGATACTATAAAAGAGCTGAGACTCACCAAAAATGGGATCACTGAGGTCCGGAGTCATGCC
 211 F  N  G  T  K  M  Q  K  L  S  L  M  G  N  Q  L  L  R  Q  I  H  R  H  A  F  M  G  A  E  G  P  I  V  L  D
 631 TTTAATGGCACAAAAATGCAGAAGCTGTCTCTCATGGGAAACCAGTTGTTAAGGCAGATCCACAGGCATGCCTTTATGGGAGCGGAGGGCCCCATTGTACTGGAC
 246 I  S  R  T  A  V  S  T  L  P  E  N  M  L  R  G  I  K  L  L  T  A  V  G  V  H  N  L  K  K  L  P  R  L  E
 736 ATCTCACGGACGGCTGTCAGCACCTTGCCCGAGAACATGTTACGTGGCATAAAGCTGTTGACGGCTGTGGGAGTGCATAACCTGAAGAAGCTGCCCAGGTTGGAG
 281 L  F  T  Q  L  I  E  A  N  L  T  Y  P  S  H  C  C  A  F  A  N  S  R  K  N  M  S  V  E  N  S  M  C  S  L
 841 TTATTTACCCAACTCATCGAGGCCAACCTGACATACCCAAGCCACTGCTGTGCCTTCGCCAACTCCAGGAAGAACATGTCCGTGGAAAACTCCATGTGCAGTTTA
 316 P  H  I  Q  E  D  E  P  H  F  F  L  D  H  C  W  D  V  S  K  V  S  C  F  P  K  P  D  A  F  N  P  C  E  D
 946 CCCCACATCCAGGAGGACGAGCCACATTTCTTCCTGGACCACTGCTGGGATGTCAGCAAGGTGTCTTGCTTTCCCAAGCCAGATGCCTTCAACCCATGTGAGGAT
 351 I  M  G  F  T  Y  L  R  V▼L  I  W  V  I  S  V  L  A  I  A  G  N  L  L  V  L  A  V  L  L  S  S  H  Y  K
1051 ATCATGGGTTTCACCTACCTTCGTGTGCTCATCTGGGTTATTAGTGTGTTGGCAATTGCGGGCAACCTGCTGGTCCTGGCTGTGCTGCTGAGCAGCCACTACAAG
 386 L  T  V  P  R  F  L  M  C  H  L  A  F  A  D  L  C  M  G  I  Y  L  L  L  I  A  I  V▼D  T  R  T  R  S  H
1156 CTCACCGTGCCCCGCTTCCTCATGTGCCACTTAGCTTTTGCTGACCTCTGCATGGGTATCTACCTGCTACTCATTGCCATTGTGGACACCCGCACTCGCTCGCAC
 421 Y  Y  N  H  G  I  E  W  Q  T  G  P  G  C▼A  T  A  G  F  F  T  V  F  A  S  E  L  S  V  Y  T  L  T  A  V
1261 TACTACAATCATGGAATTGAATGGCAAACAGGGCCTGGCTGTGCAACTGCTGGCTTCTTCACCGTCTTCGCCAGCGAGTTATCAGTCTACACGCTTACTGCAGTC
 456 T  L  E  R  W  H  T  I  T  F  A  L  R  V  D  R  R  L  R  L  R  H  A  C  A  I  M  A  V  G  W  L  F  A  S
1366 ACTCTTGAGCGCTGGCACACCATTACCTTTGCGCTACGGGTTGACCGACGCCTCCGACTGAGGCACGCCTGCGCAATCATGGCCGTTGGCTGGCTCTTTGCCTCG
 491 L  A  A  V  L  P  V  V  G  V▼S  S  Y  S  K  V  S  I  C  L  P  M  D  V  E  T  T  G  A▼Q  V  Y  V  V  V
1471 CTAGCTGCCGTGCTGCCTGTGGTCGGGGTGAGCAGCTATTCAAAGGTCAGCATATGCCTGCCAATGGATGTGGAGACAACAGGTGCCCAGGTCTATGTGGTGGTG
 526 L  L  L  L  N  V  L  A  F  L  A  V  F  V  C  Y  L  R  I  Y  L  T  V  R  N  P  N  F  V  P  A  S  A  D  M
1576 CTGTTGCTGCTCAATGTCCTGGCCTTCCTGGCAGTATTTGTCTGCTACCTGCGCATCTACCTGACAGTGCGCAATCCCAACTTTGTGCCAGCCAGCGCCGACATG
 561 R  V  A  K  R  M  A  V  L  I  F  T  D  F  L  C  M  A  P  I  S  F  F  A  I  S  A  A  L▼K  L  P  L  I  T
1681 CGCGTTGCCAAACGGATGGCTGTGCTCATCTTCACAGACTTCCTGTGCATGGCCCCCATTTCATTCTTTGCCATCTCTGCAGCACTCAAACTGCCCCTCATCACT
 596 V  S  H▼A  K  V  L  L  V  L  F  Y  P  I  N  S  C  S  N  P  F  L  Y  A  F  F  T  K  T  F  K  R  D  F  F
1786 GTGTCCCATGCCAAGGTACTGCTAGTGCTCTTCTACCCCATAAACTCATGCTCCAACCCATTCCTCTACGCCTTCTTCACCAAGACTTTCAAGAGGGACTTCTTC
 631 I  L  A  S  R  F  G  C  F  K  A  R  A  Q  M  Y  R  T  E  T  S  S  V  Q  N  G  G  W  G  P  T  H  K  T  S
1891 ATCCTGGCCAGCCGCTTTGGTTGCTTCAAAGCCAGGGCACAGATGTACCGTACTGAGACGTCCTCAGTCCAGAATGGGGGCTGGGGGCCCACCCACAAGACCAGT
 666 D  A  T  L  Y  S  L  V  P  V  N  H  V  H  *
1996 GATGCTACTCTCTACTCCCTGGTGCCAGTCAACCATGTGCAC TGA
```

(b)

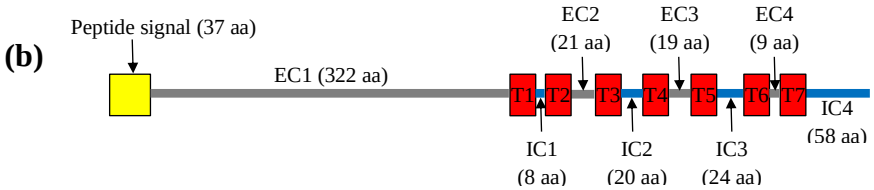


Figure 12. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR) de *H. niloticus* (HnFSHR) et modélisation en boxes (b) avec les différents domaines extracellulaires (EC1 à EC4), transmembranaires (T1 à T7) et intracellulaires (IC1 à IC4) de HnFSHR. Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les domaines T sont dans des encadrés, les domaines IC sont doublement soulignés et les domaines EC sont délimités par des triangles noirs.

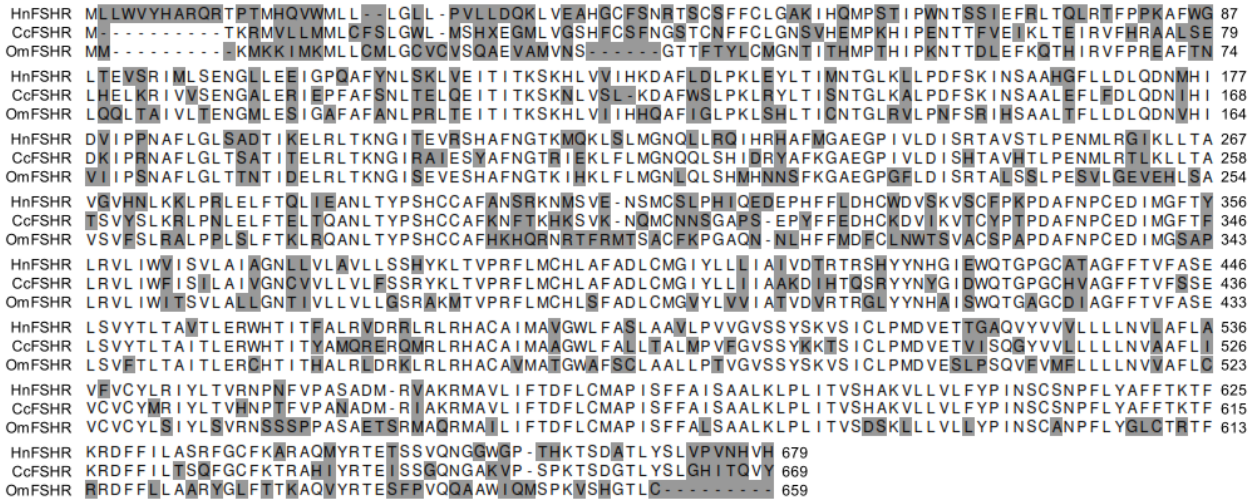


Figure 12c. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR) de *H. niloticus* (HnFSHR) avec les FSHR de *C. carpio* (CcFSHR) et *O. mykiss* (OmFSR).

Sous unité β de l'hormone lutéinisante (LHβ)

La sous unité β de l'hormone lutéinisante de *H. niloticus* (HnLHβ) a une séquence de 423 paires de bases et code pour une protéine de 141 acides aminés (**figure 13a**). La structure secondaire (**figure 13b**) permet de distinguer un peptide signal de 24 acides aminés, trois domaines β loop 1, 2 et 3 respectivement de 26, 20 et 17 acides aminés et un « seat-belt » loop de 18 acides aminés. Comme HnFSHβ, HnLHβ mature compte également douze cystéines (Cys^{1}- Cys^{12}) et la β loop 1 est située entre Cys^{1}- Cys^{4}, la β loop 2 entre Cys^{5}- Cys^{6}, la β loop 3 entre Cys^{7}- la Cys^{8} et le « seat-belt loop » entre Cys^{10}- Cys^{12}(**figure 13a**). Un site probable de N-glycosylation (NQTI) se situe entre Cys^{1}- Cys^{2}. Une comparaison des séquences de LHβ (**figure 13c**) montre que HnLHβ est identique à LHβ de *A. gigas* (AJO68014) et qu'il partage des domaines avec LHβ de *O. mykiss* (BAB17687), (79%), *S. formosus* (KPP64307) (77%), *C. carpio* (CAA42542) (74%) et *O. niloticus* (AAP49576) (68%).

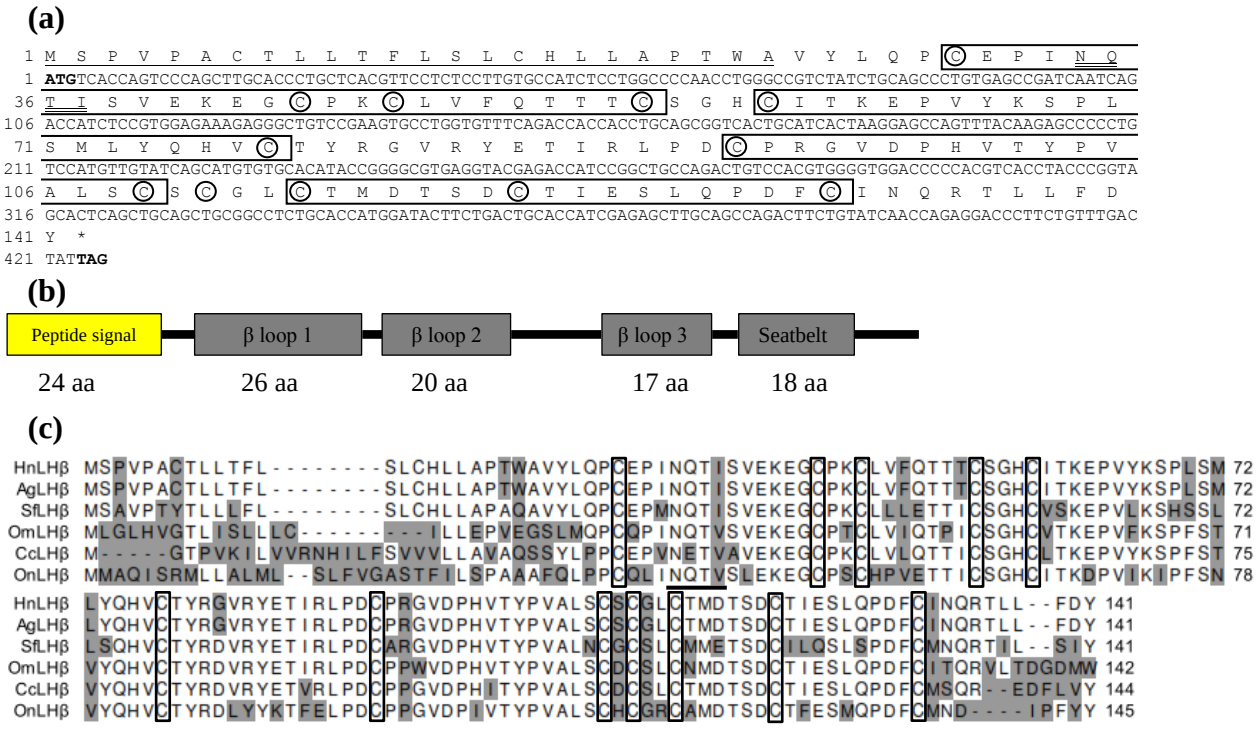


Figure 13. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) de la sous unité béta de l'hormone lutéinisante (LHβ) de *H. niloticus* (HnLHβ), modélisation en boxes avec les différents domaines (b) et alignement (c) avec les LHβ de *A. gigas* (AgLHβ), *S. formosus* SfLHβ) *O. mykiss* (OmLHβ), *O. niloticus* (OnLHβ) et *C. carpio* (CcLHβ). Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les régions β loop 1, 2, 3 et le "Seatbelt" disposés de façon successive sont dans des encadré. Le site prédit de N-glycosylation est doublement souligné et les cystéines conservées sont dans des cercles. Dans la figure (c), les cystéines conservées entre espèces sont dans des encadrés et les domaines peu conservés sont en gris.

Récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR)

Le récepteur de HnLH (HnLHR) est exprimé dans l'ovaire des femelles en vitellogenèse. Il s'agit d'un transcrit de 2124 paires de bases codant pour une protéine de 708 acides aminés (**figure 14a**). HnLHR possède un peptide signal de 20 acides aminés (Met^{1} – His^{20}) suivi de quatre domaines extracellulaires (EC) de 361 (EC1), 21 (EC2), 19 (EC3) et 9 (EC4) acides aminés, de sept domaines transmembranaires de 23 acides aminés chacun et quatre domaines intracellulaires (IC) de 8 (IC1), 20 (IC2), 24 (IC3) et 65 (IC4) acides aminés (**figure 14b**).

(a)

```
   1 M  Q  I  L  P  V  F  L  I  L  Q  S  I  L  F  S  L  T  S  C  H▼F  V  C  P  G  I  C  C  C  S  S  E  T  I
   1 ATGCAGATTTTGCCCGTGTTCCTCATCCTCCAATCGATTTTGTTCAGTTTGACCTCATGCCACTTCGTGTGCCCGGGGATTTGCTGCTGTTCCTCCGAGACGATC
  36 R  C  T  E  T  T  E  R  S  I  P  G  I  Q  I  D  A  F  K  R  L  T  V  A  H  L  S  L  S  S  I  S  S  H  A
 106 CGCTGCACCGAGACTACAGAGCGATCAATTCCCGGGATCCAGATAGATGCTTTCAAGCGACTGACTGTTGCTCACCTGTCCCTGAGCAGCATCAGCAGTCATGCC
  71 F  S  G  L  S  G  V  S  R  I  E  I  T  Q  S  D  T  L  N  T  I  E  A  M  A  F  N  N  L  L  N  L  S  E  I
 211 TTCAGTGGACTCAGTGGAGTCTCAAGAATTGAAATTACCCAGAGTGACACCTTGAACACCATCGAGGCCATGGCCTTCAACAACCTTCTAAACCTTTCTGAAATA
 106 S  I  Q  N  T  K  N  L  V  Y  I  N  R  H  A  F  N  K  L  P  K  L  R  Y  L  S  I  S  N  T  G  I  T  L  I
 316 TCAATACAGAACACCAAGAATTTGGTATACATCAATCGCCATGCATTCAACAAGCTGCCAAAGTTACGATATCTGAGCATTTCCAACACTGGGATAACCCTGATC
 141 P  D  L  S  S  I  S  S  L  E  S  I  F  I  L  D  I  C  D  N  L  H  L  T  T  I  P  P  N  A  F  A  G  L  S
 421 CCAGATCTGTCATCCATTTCTTCTCTCGAATCCATTTTTATCCTTGATATCTGTGACAACCTTCATCTTACCACCATTCCGCCAAATGCTTTTGCTGGGCTATCA
 176 N  E  Y  A  S  M  I  L  N  G  N  G  F  K  E  V  Q  G  Y  A  F  N  G  T  K  I  H  K  L  I  L  S  N  N  K
 526 AACGAATACGCATCAATGATCTTAAATGGGAACGGTTTCAAGGAAGTTCAAGGTTATGCCTTCAACGGGACCAAGATTCATAAACTGATCCTCAGCAACAACAAA
 211 H  L  R  I  I  H  K  D  A  F  K  G  A  I  G  P  G  I  L  D  V  S  W  T  A  L  E  M  L  P  S  Q  G  L  Q
 631 CATCTCAGAATAATCCACAAAGATGCTTTCAAGGGAGCCATTGGACCAGGGATTTTAGATGTGTCCTGGACCGCCCTGGAGATGCTCCCTTCCCAGGGATTGCAG
 246 S  L  R  L  L  V  A  H  G  A  Y  N  L  K  T  L  P  P  L  G  A  L  G  S  L  Q  E  A  Q  L  T  Y  P  S  H
 736 TCCCTCCGCCTCCTGGTGGCCCATGGGGCCTACAACCTAAAGACCCTCCCACCACTGGGGGCCCTAGGCAGCCTGCAGGAGGCGCAGCTCACCTACCCCAGTCAC
 281 C  C  A  L  L  A  W  N  T  G  R  D  S  S  L  F  D  G  G  N  E  S  T  H  C  K  D  S  F  S  S  E  I  P  G
 841 TGCTGTGCCCTGCTCGCCTGGAACACCGGCAGGGATTCTTCCTTGTTTGATGGGGGAAACGAATCAACACACTGTAAGGACAGCTTTTCATCGGAGATTCCAGGC
 316 Q  V  S  N  S  T  V  V  G  P  L  H  E  L  M  V  F  E  E  E  L  D  T  A  D  H  V  D  F  Q  Y  L  D  I  D
 946 CAAGTGTCTAACTCCACTGTTGTGGGGCCACTGCATGAGTTAATGGTGTTTGAGGAGGAGCTGGACACTGCAGATCACGTGGACTTCCAGTACCTTGACATTGAC
 351 F  C  Q  N  S  R  I  L  K  C  T  P  E  A  D  A  F  N  P  C  E  D  I  A  G  F  Q  F  L  R  V▼A  I  W  F
1051 TTCTGTCAGAACTCCAGAATACTGAAGTGCACCCCAGAGGCAGATGCATTCAACCCCTGTGAGGACATTGCTGGCTTTCAATTCTTGCGTGTTGCCATCTGGTTT
 386 I  N  I  L  A  I  T  G  N  L  M  V  L  L  V  L  V  A  S  R  H  K  L  S  V  P  R  F  L  M  C  H  L  A  F
1156 ATCAACATACTCGCCATCACAGGTAACCTGATGGTGCTACTGGTGCTTGTTGCCAGCCGCCACAAGCTGAGCGTCCCGCGCTTCCTCATGTGTCACCTTGCCTTT
 421 A  D  L  C  I  G  L  Y  L  L  L  I  A  I  V▼D  G  R  T  Q  G  S  Y  S  Q  H  A  I  A  W  Q  T  G  P  G
1261 GCCGACCTCTGTATTGGCCTCTACCTCCTATTGATTGCTATTGTGGATGGGCGCACGCAGGGCAGCTACAGCCAGCATGCCATCGCATGGCAGACAGGGCCAGGC
 456 C▼E  A  A  G  F  L  S  V  F  G  G  E  L  S  V  Y  T  L  T  A  I  T  L  E  R  W  H  T  I  S  H  A  L  Q
1366 TGTGAAGCTGCAGGCTTCCTGTCCGTGTTTGGAGGTGAGCTGTCAGTCTACACATTGACCGCCATCACTCTCGAGCGCTGGCACACCATCAGTCACGCCCTGCAA
 491 P  E  R  R  L  G  L  R  H  A  L  L  A  M  A  G  V  W  L  L  C  L  G  V  A  L  L  P  L  V  G  V▼S  S  Y
1471 CCCGAACGGCGCCTGGGCCTGAGACATGCTCTGCTTGCCATGGCCGGCGTCTGGCTGCTGTGCCTGGGAGTGGCATTGCTTCCCCTCGTGGGTGTCAGCAGTTAT
 526 R  K  V  S  V  C  L  P  M  D  I  D  T  P  L  A▼Q  A  F  V  I  L  L  L  L  L  N  V  T  A  F  L  V  V  C
1576 AGGAAGGTGAGTGTGTGCCTGCCGATGGACATCGACACACCCCTGGCCCAGGCTTTTGTTATTCTCCTCCTTCTCCTCAATGTAACTGCCTTCCTGGTCGTGTGT
 561 G  C  Y  V  R  I  Y  Q  A  V  R  N  P  K  F  A  G  R  S  A  D  A  R  I  A  K  R  M  A  V  L  I  F  T  D
1681 GGCTGCTATGTGCGGATCTACCAGGCAGTGCGAAACCCCAAGTTTGCGGGAAGAAGTGCGGATGCCAGGATTGCTAAGCGCATGGCAGTGCTCATCTTCACTGAT
 596 F  L  C  M  A  P  I  S  F  F  A  I  S  A  A  F▼R  M  P  L  I  T  V  T  N▼S  K  I  L  L  V  L  F  Y  P
1786 TTCCTCTGCATGGCACCCATCTCCTTTTTCGCTATCTCTGCTGCCTTCAGAATGCCTCTAATTACTGTGACCAACTCGAAGATCCTGCTGGTGCTCTTCTATCCC
 631 I  N  S  C  A  N  P  F  L  Y  A  I  C  T  K  A  F  R  R  D  V  F  A  L  A  S  T  L  A  C  C  E  S  K  A
1891 ATCAACTCCTGTGCCAACCCCTTCCTCTATGCCATCTGTACCAAGGCGTTCCGGAGAGATGTGTTTGCGCTTGCCAGTACGCTGGCGTGCTGCGAGAGCAAGGCC
 666 S  V  Y  R  T  K  A  Y  C  L  D  N  S  G  D  K  T  S  G  S  V  A  A  K  K  S  S  H  V  T  L  K  T  A  A
1996 AGTGTGTATCGCACAAAGGCCTACTGCCTGGACAACAGCGGTGACAAGACGAGTGGCTCAGTAGCTGCCAAGAAGAGCTCGCACGTGACACTCAAAACAGCTGCC
 701 L  S  A  S  L  P  V  E  *
2101 CTCAGTGCATCATTACCAGTAGAGTAA
```

(b)

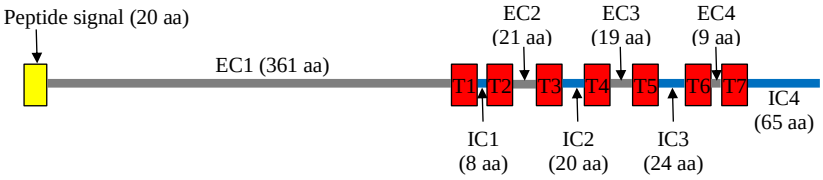


Figure 14. Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) du récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR) de *H. niloticus* (HnLHR) et modélisation en boxes (b) avec les différents domaines extracellulaires (EC1 à EC4), transmembranaires (T1 à T7) et intracellulaires (IC1 à IC4). Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras, le peptide signal est souligné simplement, les domaines T sont dans des encadrés, les domaines IC sont doublement soulignés et les domaines EC sont délimités par des triangles noirs.

L'alignement des séquences de HnLHR avec les LHR d'autres espèces de téléostéens (**figure 14c**) montre une identité en acides aminés de 80,37% avec *S. formosus* (XP_018593689), 65,23% avec *O. mykiss* (NP_001117798) et 62,77% avec *O. niloticus* (XP_025753045).

Figure 14c. Alignement des séquences protéiques déduites des récepteurs de l'hormone lutéinisante (LHR) de *H. niloticus* (HnLHR) avec les LHR de *S. formosus* (SfLHR), *O. mykiss* (OmLHR), et *O. niloticus* (OnLHR) montrant les domaines peu conservés en gris.

3.2 Détection de la Vtg dans le sang et le mucus

L'analyse en spectrométrie de masse a permis de détecter dans le sang et le mucus de femelles en vitellogenèse de *H. niloticus* la présence de Vtg (**figure 15**). Aucune Vtg ni aucun des produits issus de son clivage n'a été détecté dans le sang et le mucus des poissons mâles. Des peptides trypsiques du domaine LvI spécifiques à HnVtg1 et HnVtg2 (**figure 15a**) ont été détectés à partir d'échantillons de sang des femelles alors que seuls ceux de HnVtg1 ont été détectés dans les échantillons de mucus. La cartographie des peptides trypsiques issus des séquences N et C-terminales de HnVtg1 montre un taux de couverture de 53,2% au niveau de la protéine sanguine et 31,9% pour la protéine présente au niveau du mucus. Lorsque l'on s'intéresse aux différents domaines de la Vtg, la couverture des peptides détectés dans le sang est de 42,5% pour LvI, 0,8% pour Pv et CT, 8,2% pour LvII et 1% pour β'-C. Dans le mucus,

la couverture des peptides détectés est de 18,6% pour LvI, 0,8% pour Pv, 5,8% pour LvII, 4,2% pour β'-C et 2,6% pour CT (**figure 15b**).

N-ter HnVtg1 (Sang)

MRAVLLALTLALAAGQQDSLTPDFANGKAYMFKYEAELLGGLPVEGLGKAGVKIVCKVLISRVSQNTYLLKLKEPQIFEYSGIRPRDDFKPAAKLTQALAAQLLIPV
KFEYIRGVVGKVFAPAAVSKTILNLHRGILNILHVNIKKTQNVYELQEAGSQGVCKTDYAISEDTKAEHIYVTKSKDLGNCQNRIMADIGIAYTETCVQCQMRNKNL
RGAATYSYVMKPTETGALITKATVQEVHQFTPFHELRGAGQVETRQEMTFVETQNDPVQPAHADYVARGSLQYEFASELLQTPLPLMKITDIKTQIEEILNHLVKNN
MGEVHEDAPLKFLQLTQLLREAKYEIMNGIWTQVKSKPVFRRWFLDTVPAVGNQDAVRFIKEKFIAGDISAAETAQALLVALHLLEANMDTVNLAGTLVFHAKLQSH
PMLREIAMLGYGSLVFKLCTKQQNCPAEVIKPVHDIAAEAISKANVEEIALVLKVLGNAGHPASIKPIMKVLPGFGSTASSLTVKVHVDAVMALRHIAKRENHKVQE
VALQLFMNRDLHPEVRMVACVVLFECKPPIGLVAMIASALQNEKSLQVASFAYSHMKALTRSTAPELAQVAAACNVAIKILSPKLDRLSYRFSKTIHMDFFNYHLMA
GAAATAHLINDAASILPRALVAKIRACMLGAAADVLEFGVRTEGLQEALLKSPAADPNADRLTRMWRVLNTLKNWKSLPASQPVASAYLKWFGQEIAFANIDRDIIE
KAVEFATGAAAQPALLKNILNMMQSGIDIQIAKPLMTSEVRRIFPTSMGFPIEISLYSAAVAAAIVKAKAILNPKPSDNFRIAQLMNTDIQLDTRVVPSIAVHKYAV
MGVNTALIQAAIEAKVKVQKVLPLKFNARINIAQGHYKIETVPLHAQERILDLHMETVAVARNIENLSEAKITPVLPARLASQQSKETFASAGSGSKSSERIHEQES
SSHPMQHAVSARTDRQWCVTVASLADQACAKVTSQNAGFIRNSPLYKLIGEHSVIAAVKPVSGEAVDKIEIEMHVGPDAASKIVKTITVKDDNAKEGHAGHSPVVLK
LREILETEKKQHSRNATTSSSSSSSSRRSGQKSSSSSSSSSSSSSSSSNSSKRSKKNIKKRSSSSSSSSSSSSSSSRRRSRTENVLGGSSSSSSRSSRSQTSKAAIF
QRFTQNHIHQHETTRAASSQKTSSSPSSSSSSSNSSSSSSSSSSSSSSSSS

N-ter HnVtg1 (Mucus)

MRAVLLALTLALAAGQQDSLTPDFANGKAYMFKYEAELLGGLPVEGLGKAGVKIVCKVLISRVSQNTYLLKLKEPQIFEYSGIRPRDDFKPAAKLTQALAAQLLIPV
KFEYIRGVVGKVFAPAAVSKTILNLHRGILNILHVNIKKTQNVYELQEAGSQGVCKTDYAISEDTKAEHIYVTKSKDLGNCQNRIMADIGIAYTETCVQCQMRNKNL
RGAATYSYVMKPTETGALITKATVQEVHQFTPFHELRGAGQVETRQEMTFVETQNDPVQPAHADYVARGSLQYEFASELLQTPLPLMKITDIKTQIEEILNHLVKNN
MGEVHEDAPLKFLQLTQLLREAKYEIMNGIWTQVKSKPVFRRWFLDTVPAVGNQDAVRFIKEKFIAGDISAAETAQALLVALHLLEANMDTVNLAGTLVFHAKLQSH
PMLREIAMLGYGSLVFKLCTKQQNCPAEVIKPVHDIAAEAISKANVEEIALVLKVLGNAGHPASIKPIMKVLPGFGSTASSLTVKVHVDAVMALRHIAKRENHKVQE
VALQLFMNRDLHPEVRMVACVVLFECKPPIGLVAMIASALQNEKSLQVASFAYSHMKALTRSTAPELAQVAAACNVAIKILSPKLDRLSYRFSKTIHMDFFNYHLMA
GAAATAHLINDAASILPRALVAKIRACMLGAAADVLEFGVRTEGLQEALLKSPAADPNADRLTRMWRVLNTLKNWKSLPASQPVASAYLKWFGQEIAFANIDRDIIE
KAVEFATGAAAQPALLKNILNMMQSGIDIQIAKPLMTSEVRRIFPTSMGFPIEISLYSAAVAAAIVKAKAILNPKPSDNFRIAQLMNTDIQLDTRVVPSIAVHKYAV
MGVNTALIQAAIEAKVKVQKVLPLKFNARINIAQGHYKIETVPLHAQERILDLHMETVAVARNIENLSEAKITPVLPARLASQQSKETFASAGSGSKSSERIHEQES
SSHPMQHAVSARTDRQWCVTVASLADQACAKVTSQNAGFIRNSPLYKLIGEHSVIAAVKPVSGEAVDKIEIEMHVGPDAASKIVKTITVKDDNAKEGHAGHSPVVLK
LREILETEKKQHSRNATTSSSSSSSSRRSGQKSSSSSSSSSSSSSSSSNSSKRSKKNIKKRSSSSSSSSSSSSSSSRRRSRTENVLGGSSSSSSRSSRSQTSKAAIF
QRFTQNHIHQHETTRAASSQKTSSSPSSSSSSSNSSSSSSSSSSSSSSSSS

C-ter HnVtg1 (Sang)

SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSGSSASSFENIYKKSRFLGDTVRPAAVVIVRAVRGNERRRGYQVAAYMDKANARVQVIISALADSDKWQLCADGIQLSMHKVMAKIRW
GAECQDYRAVIKAETGLLGPHPAAQLKMYWNKTPRALKRYASMIYEYVPGVALLAGFSEGRHRSGERQIKLTMAATSARTISIILRTPWMTLYKLGQVIPIALPIGA
AAARAEVEQTFAGRIHYMFVEATSAKCKLENSTVTTFNNRRYGLQMPRSCYQVVAQDCTSKLKFMVLRKGDERSEESHVIVKIADIDVDLTAEHGNIQVKVNGRVVP
ITQHNYEHPTGTISIKQKGAGISLCAPSHGLHEVYFNKNILTIQVPDWMKGNVCGLCGKADGDVRREFQGPSGHHIEDAVSFAHSWVLAAESCHDAKQCQVKQELFK
LTEPVLLNDQDMKCQSTFPVLSCLPQCSPMKTTPVTVGFHCIPIDSNVNSWSSIRKKQEDIRVTVDAHIMCNCGEECA

C-ter HnVtg1 (Mucus)

SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSGSSASSFENIYKKSRFLGDTVRPAAVVIVRAVRGNERRRGYQVAAYMDKANARVQVIISALADSDKWQLCADGIQLSMHKVMAKIRW
GAECQDYRAVIKAETGLLGPHPAAQLKMYWNKTPRALKRYASMIYEYVPGVALLAGFSEGRHRSGERQIKLTMAATSARTISIILRTPWMTLYKLGQVIPIALPIGA
AAARAEVEQTFAGRIHYMFVEATSAKCKLENSTVTTFNNRRYGLQMPRSCYQVVAQDCTSKLKFMVLRKGDERSEESHVIVKIADIDVDLTAEHGNIQVKVNGRVVP
ITQHNYEHPTGTISIKQKGAGISLCAPSHGLHEVYFNKNILTIQVPDWMKGNVCGLCGKADGDVRREFQGPSGHHIEDAVSFAHSWVLAAESCHDAKQCQVKQELFK
LTEPVLLNDQDMKCQSTFPVLSCLPQCSPMKTTPVTVGFHCIPIDSNVNSWSSIRKKQEDIRVTVDAHIMCNCGEECA

(a)

```
HnVtg1 MRAVLLALTLALAAGQQDSLTPDFANGKAYMFKYEAELLGGLPVEGLGKAGVKIVCKVLISRVSQNTYLLKLK 73
HnVtg2 MKAAVFALALALVAGQQNILTPDFAAKKTYVYKYEAQLHSELPEEGLAKAGLKIASKVLISRADQNTYLLKLK 73
       * *   ** *** ****  ******  * *  **** *   ** *** *** **  ******  *********
```

(b)

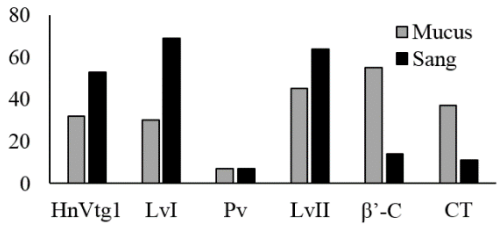


Figure 15. Couverture des peptides du Nter et du Cter de HnVtg1 détectés par spectrométrie de masse dans le sang et le mucus de *H. niloticus*. La figure (a) présente uniquement les peptides spécifiques de HnVtg1 et HnVtg2 détectés dans le sang avec les acides aminés conservés entre les deux Vtg indiqués par des étoiles. Les peptides détectés sont en gris, le peptide signal est souligné. La figure (b) indique le taux de couverture en pourcentage des peptides de HnVtg1 détectés dans le sang et le mucus par rapport à l'ensemble de la protéine et aux différents domaines. Seule la Vtg1 est détectée dans le mucus.

3.3 Diffusion de la Vtg du mucus

Une expérimentation qui avait pour objectif de tester la capacité potentielle de la Vtg du mucus de *H. niloticus* à diffuser dans l'eau n'a pas permis de détecter la Vtg ou des produits de clivage. Néanmoins, 409 protéines provenant du mucus de femelles et 418 du mucus de mâles ont été identifiées dans le milieu de diffusion.

4. DISCUSSION

Pour la première fois, les Vtg et certains acteurs moléculaires intervenant dans la vitellogenèse et sa régulation ont été caractérisés à travers une combinaison d'approches « omiques » chez l'Ostéoglossiformes *H. niloticus*. Des comparaisons ont pu être réalisées dans la plupart des cas avec une espèce proche *S. formosus* et d'autres espèces de téléostéens plus éloignées phylogénétiquement de *H. niloticus*.

PRL et son récepteur

La PRL est une hormone polypeptidique sécrété par l'hypophyse, dont l'importance dans la physiologie reproductive a été soulignée chez de nombreuses espèces de téléostéens telles que *A. gigas* (Marcos & Adalberto, 2015) et *Danio rerio* (Bu et al., 2015). Une seule PRL exprimée dans l'hypophyse de *H. niloticus* a été identifiée alors que plusieurs isoformes de PRL issues d'épissages alternatifs sont observés chez les mammifères (Freeman et al., 2000) et certaines espèces non mammaliennes incluant des poissons téléostéens qui expriment deux formes distinctes de PRL, PRL1 et PRL2 (Huang et al., 2009). Comme souligné par Whittington & Wilson (2013), l'expression du récepteur de la PRL dans l'ovaire de *H. niloticus* suggère l'implication de cette neurohormone dans la vitellogenèse et dans l'ovulation de cette espèce. La PRL de *H. niloticus* (HnPRL) comme la plupart des PRL des poissons téléostéens (Bu et al., 2015) a un peptide signal court de 25 acides aminés alors que ceux des mammifères (Skorupski & Kmieć, 2013) et oiseaux (Bu et al., 2015) peut atteindre 30 acides aminés. Les deux cystéines en position N-terminale susceptibles de former un pont disulfure dans la PRL des mammifères (Bu et al., 2015; Teilum et al., 2005), des reptiles (Yasuda, Kawauchi, & Papkoff, 1990), des Dipneustes (lungfish), des Chondrostéens (esturgeons) et des tétrapodes (Noso et al., 1993) sont absentes de HnPRL comme chez la plupart des poissons téléostéens (Bu et al., 2015; Watahiki et al., 1989). Quoique partageant une identité variable (49 à 74%)

en acides aminés avec les PRL de certains poissons (figure 8d), HnPRL partage une structure commune avec les espèces de vertébrés. Elle contient quatre hélices *α* majeures (hélice 1 à 4) représentant plus de 50% de l'ensemble de la protéine (Skorupski & Kmieć, 2013), deux courtes hélices α entre l'hélice 1 et l'hélice 2 formant une loop 1 (Brooks, 2012 ; Teilum et al., 2005) qui joue un rôle vital dans la stabilisation de la protéine et l'interaction ligand-récepteur (Goffin et al., 1996). Les couples hélice 1 et hélice 4, d'une part et hélice 2 et hélice 3 d'autre part forment deux paires antiparallèles (Brooks, 2012 ; Teilum et al., 2005). HnPRL contient quatre cystéines après l'hélice 1 bien conservées entre les espèces et qui sont susceptibles de former deux ponts disulfures (Brooks, 2012 ; Bu et al., 2015 ; Teilum et al., 2005) dont l'un au centre de la protéine entre Cys^{70} et Cys^{182}et l'autre au niveau C-terminal de la protéine entre Cys^{199} et Cys^{209}. Comme chez son espèce sœur *A. gigas* où une expérience d'immunocytochimie a montré que la PRL a peu d'affinité avec l'anti sérum anti PRL des Salmonidés (Borella et al., 2009), HnPRL partage peu d'identité avec *O. mykiss* (53%).

Gonadotropines et leurs récepteurs

La FSH et la LH de *H. niloticus* exprimées dans l'hypophyse sont comme toutes les hormones gonadotropes (GTHs) des glycoprotéines hétérodimériques avec une sous unité α commune appelée hormone glycoprotéique α (GPα) et des sous unités β spécifiques (Acharjee et al., 2015). L'analyse comparative de la structure des GTHs de *H. niloticus* dans le groupe des téléostéens montre que la sous unité GPα est constituée de trois α loop et les sous unités β de trois β loop avec un « seat-belt » en position C terminale. HnGPα conserve les dix cystéines qui seraient impliquées dans la formation de 5 ponts disulfures, 4 résidus proline et deux sites de N-glycosylation au niveau de l'α loop 2 (NITS) et l'α loop 3 (NHTD). Chez le poisson chat *Heteropneustes fossilis*, les sites de N-glycosylation sont situés au niveau de la loop 1 (NITS) et de la loop 2 (NHTD) (Acharjee et al., 2015). Huit cystéines sont seulement conservées dans la GPα de la myxine (Uchida et al., 2010). GPα et LHβ de *A. gigas* décrit l'une par Faria et al., (2013) et l'autre par Sevilhano et al., (2017) sont respectivement identiques à HnGPα et HnLHβ identifiés dans cette étude. Ce résultat démontre à nouveau qu'il existe une grande proximité phylogénétique entre ces deux espèces d'Ostéoglossomorphes soulignée précédemment par certains auteurs (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ; Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969) et cela vient compléter les quelques études qui ont rapporté des hypothèses phylogénétiques basées sur des données moléculaires (Kumazawa & Nishida, 2000). La présente étude a montré que HnGPα partage

une identité d'acides aminés comprise entre 61 et 82% avec certaines espèces d'Ostéoglossiformes, de Salmoniformes, de Perciformes et de Cypriniformes. GPα de *A. gigas* identique à HnGPα partage une identité d'acides aminés plus élevée (87 à 89,5%) avec les autres téléostéens (Anguilliformes et Ostartiophyses) et les Chondrostéens (Acipenseriformes) (Faria et al., 2013).

La position des 12 cystéines et le seul site potentiel de N-glycosylation au niveau de la β loop 1 (NXTX) de LHβ observé chez la plupart des vertébrés (Bousfield & Dias, 2011 ; So et al., 2005) est très bien conservé chez *H. niloticus*. Il a été démontré chez les poissons chats que la loop située entre les positions Cys^{10} et Cys^{11} du « seat-belt » de la LHβ contient les sites de liaison du récepteur de cette hormone alors que la loop correspondant aux Cys^{11} et Cys^{12} de la LHβ stimule l'activité du récepteur de la FSH (Vischer et al., 2004).

Contrairement à la sous unité LHβ, la sous unité FSHβ est conservée à 86% entre *H. niloticus* et l'espèce sœur *A. gigas* et diverge davantage avec les autres espèces d'Ostéoglossiformes, de Perciformes, de Salmoniformes et de Cypriniformes (entre 37% 69%). Chez *A. gigas*, l'identité la plus élevée, basée sur les séquences d'acides aminés, est de 61% chez les Anguilliformes pour la FSHβ et de 76% chez les Cypriniformes pour LHβ (Sevilhano et al., 2017). HnFSHβ conserve 12 cystéines parmi lesquelles les quatre premières sont situées dans la β loop 1 (Cys^1 à Cys^4). Cys^5 et Cys^6 sont situées dans la β loop 2, Cys^7 et Cys^8 dans la β loop 3, Cys^9 entre β loop 3 et le « seat-belt loop » et Cys^{10} à Cys^{12} dans le « seat-belt loop ». Chez les Cypriniformes et les poissons chats comme *H. fossilus*, on observe une bonne conservation de la structure de la sous unité FSHβ à la seule différence qu'on a une cystéine additionnelle entre le peptide signal et la β loop 1. La Cys^2 chez les Perciformes et la Cys^3 chez les Salmonidés sont absentes mais un résidu cystéine additionnel en position N-terminale comme chez les Cypriniformes et les poissons chats permet d'obtenir 12 cystéines au total. Chez le poisson zèbre, Cys^{10} et Cys^{11} supposées être la loop déterminante du « seat-belt » du FSHβ (Vischer et al., 2004) sont absentes et deux cystéines additionnelles existent en position N-terminale avant la β loop 1, permettant ainsi d'avoir un nombre total de 12 cystéines (So et al., 2005). Compte tenu de l'importance de la région « seat-belt » pour l'interaction avec les récepteurs et la formation d'hétérodimères, la variation de la structure des sous-unités de FSHβ parmi les espèces de poissons peut entraîner des différences considérables quant à la nature des interactions des récepteurs et éventuellement quant à la stabilité de l'hétérodimère (Acharjee et al., 2015 ; Vischer et al., 2004). Alors que les tétrapodes, les Dipneustes (lungfish), les Chondrostéens (esturgeons), les Holocéphales (éléphant shark) disposent de deux sites probables de N-

glycosylation au niveau de la β loop 1 de leur sous unité FSHβ, chez *H. niloticus*, on observe un seul site de N-glycosylation (NVSI) comme chez la plupart des poissons téléostéens. La glycosylation des GTHs est essentielle pour la bioactivité, la formation de liaisons disulfures, le taux de sécrétion, la persistance circulatoire et la transduction du signal (Ulloa-Aguirre et al., 1999). Chez l'homme, le site 1 de glycosylation a été associé à la transduction du signal, tandis que le site 2 est lié à la stabilité thermique, cette dernière ayant un effet plus important sur la formation de liaisons disulfures et la sécrétion d'hormones (Feng et al., 1995). La perte de la seconde N-glycosylation du FSHβ de *H. niloticus* pourrait donc affecter les interactions avec les récepteurs (Bousfield & Dias, 2011 ; Ulloa-Aguirre et al., 1999). Ainsi, l'absence d'un deuxième site de glycosylation dans la FSHβ de la plupart des poissons semble constituer un écart important par rapport au modèle vertébré hautement conservé et soulève l'hypothèse de l'incidence sur la demi-vie de la molécule et, par conséquent, sur sa non-détection chez certains poissons (Acharjee et al., 2015).

Récepteurs à l'estradiol

Plusieurs auteurs s'accordent sur l'existence de trois sous types distincts de récepteurs du 17β-estradiol (ERs) chez les poissons avec des nomenclatures assez variées (Choi & Habibi, 2003 ; Hawkins et al., 2000 ; Hawkins & Thomas, 2004; Marlatt et al., 2008 ; Métivier et al., 2002 ; Nelson & Habibi, 2013 ; Nelson & Habibi, 2010 ; Norris & Lopez, 2011 ; Sabo-Attwood et al., 2004). Ce sont les récepteurs alpha (ERα, ESR1, ER, ESR, ESRA, Era ou NR3A1), gamma ou béta 1 (ERγ, ESR2a, ERβ-I, ERβa, ERβ1) et béta ou béta 2 (ERβ, ESR2b, ERβ-II, ERβb, ERβ2 ou NR3A2).

Dans cette étude, nous avons identifié chez des femelles de *H. niloticus* en vitellogenèse le sous-type béta du récepteur à l'estradiol (ERβ) dans le foie et les sous-types béta et gamma (ERβ et ERγ) dans l'ovaire. D'après les résultats obtenus dans cette étude, les trois sous-types d'ERs semblent être répartis différentiellement dans les tissus étudiés. Le sous-type alpha n'est présent dans aucun tissu, ERγ est exprimé dans l'ovaire et ERβ dans le foie et l'ovaire. Les investigations sur la signification fonctionnelle des différents sous-types d'ERs chez les poissons et autres vertébrés ont montré que des profils d'expression diffèrent suivant le sexe, le stade de la gamétogenèse, l'espèce et le type de tissus (Couse et al., 1997 ; Marlatt et al., 2008 ; Nelson et al., 2007) et que les sous-types d'ERs se lient à l'E2 avec différentes affinités (Genovese et al., 2014 ; Nelson & Habibi, 2013). Par exemple, chez *Micropterus salmoides*

(Sabo-Attwood et al., 2004). Les trois sous-types d'ERs ont été détectés dans le foie, l'ovaire et l'hypophyse de femelles en début de vitellogenèse avec des niveaux d'expression plus importants dans l'ovaire. Parmi les trois sous-types d'ERs de *M. salmoides*, ERβ a le niveau d'expression le plus élevé dans l'ovaire et le foie. ERγ est plus exprimé dans l'ovaire qu'ERα, alors que dans le foie on observe l'inverse. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la régulation des ERs dans le foie (Nelson & Habibi, 2013), car c'est dans ce tissu que la Vtg, précurseur des protéines du jaune de l'œuf, est principalement exprimée (Dominguez et al., 2012 ; Hara et al., 2016 ; Prat et al., 1998). La forte expression des ERβ et ERγ dans l'ovaire de certaines espèces suggère que ces deux sous-types jouent un rôle plus prononcé dans la régulation des gènes dans cet organe (Sabo-Attwood et al., 2004) à travers l'expression et la stimulation de la synthèse de la Vtg chez certains poissons (Kong et al., 2014 ; Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2010).

Deux types de récepteurs apparentés aux récepteurs à l'estradiol (ERRα et ERRγ) ont également été identifiés dans le foie et l'ovaire de *H. niloticus*. Les ERRs sont des récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand endogène n'a encore été identifié et ces récepteurs n'ont donc pas reçu autant d'attention que certains récepteurs endocriniens (Audet-Walsh & Giguère, 2015 ; Giguère, 1999). Chez *H. niloticus*, les ERRs présentent une homologie significative avec les ERs, 68 à 70% d'identité en acides aminés au niveau du noyau du DBD. Cependant, ces ERRs ne se lient pas à des œstrogènes mais plutôt à des séquences d'hexanucléotides sous forme de monomères ou à des éléments composites sous forme de dimères (Giguère, 1999). De ce fait, les ERRs ne participent pas directement aux voies de signalisation classiques des œstrogènes ni aux processus biologiques (Audet-Walsh & Giguère, 2015).

Les deux sous-types d'ERs de *H. niloticus* contiennent cinq domaines comme la plupart des récepteurs nucléaires (Aranda & Pascual, 2001 ; Nelson & Habibi, 2013 ; Sabo-Attwood et al., 2004). La région N-terminale (A/B) contient la première fonction d'activation (AF-1) et la forte variation observée entre HnERβ et HnERγ (58 à 68%) et entre HnERβ_X3 et les autres HnERβ contribue à une grande spécificité des récepteurs (Aranda & Pascual, 2001). Le noyau des DBD comprend 66 acides aminés et est de loin le domaine le plus conservé entre HnERs (89%) et HnERRs (>94%) comme chez la plupart des récepteurs nucléaires de différentes espèces (Aagaard et al., 2011). Il a été montré que chez *M. salmoides* (Sabo-Attwood et al., 2004) et *Micropogonias undulatus* (Hawkins et al., 2000), le noyau du DBD des formes β et γ des ERs partagent près de 70% d'identité et que de ce fait la séquence protéique de ERγ est probablement issue de la duplication des gènes de ERβ (Hawkins et al., 2000 ; Hawkins &

Thomas, 2004). En plus du noyau du DBD, l'extension C-terminale (CTE), composée des 10 à 30 premiers résidus suivant la séquence VGM totalement conservée du noyau du DBD, constitue un déterminant important de la liaison spécifique de l'ADN pour de nombreux récepteurs nucléaires (Aagaard et al., 2011). Contrairement au noyau du DBD, CTE est plus variable entre récepteurs nucléaires (Aagaard et al., 2011).

Les acides aminés jugés essentiels pour la reconnaissance de l'estradiol chez la plupart des ERs de vertébrés (Sabo-Attwood et al., 2004) sont bien conservés au niveau de HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3 et de HnERγ, contrairement à HnERβ_X4 qui ne possède que deux sites conservés.

L'analyse des séquences d'acides aminés prédites révèle que les quatre formes de HnERβ ont des domaines identiques et leur divergence ne se situe qu'au niveau du domaine A/B ou LBD. Il s'agit de quatre isoformes de HnERβ issues d'un épissage alternatif du gène codant pour ces récepteurs œstrogéniques puisque chez l'homme, cinq isoformes d'ERβ ont été identifiées et leur divergence se situe au niveau de l'extrémité C-terminale du LBD et du domaine F (Leung et al., 2006). Il a été démontré que l'isoforme ERβ1 de l'homme qui a la plus longue séquence de LBD, contenant la totalité des hélices 11 et 12 où se trouve la seconde fonction d'activation AF-2 et quatre acides aminés impliqués dans la liaison avec E2, est la seule isoforme fonctionnelle en homodimère. Les autres isoformes ont l'extrémité C-terminale du LBD beaucoup plus courte à cause de la désorientation ou de l'absence des hélices 11 et 12. De ce fait, ils ne peuvent pas former des homodimères fonctionnels mais plutôt des hétérodimères avec l'isoforme ERβ1 dans la mesure où une seule hélice 12 fonctionnelle du dimère est suffisante (Leung et al., 2006). Dans ces conditions, HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3 et HnERγ, qui possèdent les hélices 11 et 12 avec tous les acides aminés impliqués dans la liaison avec E2, peuvent fonctionner en homodimères et HnERβ_X4 qui ne possède pas d'hélice 12 et une courte hélice 11 dépourvue des quatre acides aminés impliqués dans la liaison avec E2 ne peut que former des hétérodimères fonctionnels avec les autres HnERβ. La boite D qui est impliquée dans la dimérisation des récepteurs (Aranda & Pascual, 2001) est représentée par des peptides différents, PATNQ au niveau des isoformes HnERβ et PANNQ au niveau de HnERγ, ce qui suggère que ces deux types de ERs ne pourraient former des hétérodimères fonctionnels sur l'ADN (Zechel et al., 1994).

Vitellogénines et leurs récepteurs

Trois formes de Vtg identifiées chez de nombreuses espèces (Schilling et al., 2015 ; Williams et al., 2014 ; Yilmaz et al., 2015) sont réparties en deux catégories caractérisées l'une par la présence de la totalité des domaines, l'autre par l'absence d'un ou plusieurs domaines. Dans la première catégorie, les Vtg sont caractérisées par la présence du domaine phosvitine riche en sérines phosphorylées (Pv), d'une chaîne lourde de lipovitelline (LvI), d'une chaîne légère de lipovitelline (LvII), d'une composante β'-C et d'une région codante C-terminale (CT). Cette catégorie de Vtg présente deux variantes, la VtgA et la VtgB qui possèdent des masses moléculaires plus ou moins proches. Les Vtg appartenant à la seconde catégorie, les VtgC, sont dépourvues du domaine Pv (Hara et al., 2016 ; Hiramatsu et al., 2006 ; Yilmaz et al., 2015).

Dans cette étude, quatre Vtg ont été identifiées chez *H. niloticus*. De nombreuses espèces de poissons possèdent plusieurs Vtg. Chez *Larimichthys crocea* (Gao et al,. 2019) et *Danio rerio* (Wang et al., 2005) par exemple, trois et sept Vtg ont été identifiées respectivement et le génome des poissons peut contenir jusqu'à 20 copies de gènes codant pour des vitellogénines comme c'est le cas chez *Oncorhynchus mykiss* (Trichet et al., 2000). HnVtg1, HnVtg2 et HnVtg4 possèdent un domaine Pv qui permet de les classer dans le groupe des Vtg A ou B alors que HnVtg3 correspond à une VtgC dépourvue des domaines Pv, β'-C et CT. Les alignements réalisés avec les variantes de Vtg A ou B d'autres espèces de poissons permettent de classer HnVtg1 et HnVtg2 parmi les VtgB. Les Vtg hépatiques de *H. niloticus* ont une identité en acides aminés élevée (>98%) et semblent être issues d'un épissage alternatif du gène codant pour cette protéine. Chez *O. mykiss*, les gènes codant pour différentes Vtg montrent 98,7% de similarité (Trichet et al., 2000) alors que la VtgC de *Morone saxatilis* partage moins de 32% d'identité avec les formes A ou B (Williams et al., 2014). L'identification de transcrits de Vtg dans le foie et l'ovaire de *H. niloticus* révèle que chez cette espèce, les Vtg sont exprimées dans ces deux organes. La Vtg est principalement exprimée dans le foie, mais son expression a été également observée dans l'ovaire de certaines espèces de poissons telles que *Danio rerio* (Wang et al., 2005), *Tanichthys albonubes* (Wang et al., 2010) et *Rhodeus uyekii* (Kong et al., 2014). La Vtg ovarienne comme la plupart des Vtg exprimées dans les organes ou tissus non hépatiques représente moins de 10% du niveau d'expression de la Vtg hépatique (Wang et al., 2005).

Les transcrits N-ter1, N-ter2 et C-ter caractéristiques de HnVtg1 et HnVtg2 n'ont pas permis d'obtenir les séquences définitives de ces protéines en raison de l'incertitude sur le nombre exact de sérines à retenir pour le domaine Pv. Les 19 et 12 sérines en fin de séquence

respectivement de N-ter1 et N-ter2 ainsi que les 20 sérines en début de séquence du C-ter sont toutes issues du même codon AGC alors que cet acide aminé est codé par cinq autres codons (TCT, TCC, TCA, TCG et AGT). Trinity n'a donc pas été capable de relier les N-ter et le C-ter. Toutefois, l'alignement avec la Vtg de *S. formosus*, un autre Ostéoglossiformes, montre que l'incertitude existe sur le nombre de sérines du domaine Pv, mais que cette incertitude est faible et correspond sans doute à une incertitude de 1 ou 2 résidus sérines, sachant qu'il peut s'agir de sérines manquantes ou surnuméraires, les transcrits étant peut-être chevauchants. Cela veut dire qu'à quelques sérines près, les séquences de HnVtg1 et HnVtg2 sont complètes. Autrement dit, soit il manque quelques sérines pour connecter les 2 N-ter avec le C-ter, ou bien les N-ter et le C-ter se chevauchent. Mais comme il a été dit précédemment, les sérines du domaine Pv des Vtg d'*Heterotis* sont codées par un codon unique qui rend l'assemblage complexe.

L'analyse MS/MS a permis de détecter la présence de Vtg dans le sang et le mucus de femelles de *H. niloticus* en vitellogenèse. Chez de nombreuses espèces, des méthodes immuno enzymatiques (ELISA) ont été utilisées pour détecter la présence de Vtg plasmatique (Bulukin et al., 2007 ; Chu-Koo et al., 2009 ; Ndiaye et al., 2006 ; Nuñez-Rodriguez et al., 1989 ; Nunez Rodriguez et al., 1997 ; Roy et al., 2004) et de Vtg dans le mucus (Arukwe & Røe, 2008 ; Genovese et al., 2014 ; Meucci & Arukwe, 2005 ; Moncaut et al., 2003). A travers l'approche protéomique réalisée dans cette étude, les deux sexes ont pu être différenciés chez *H. niloticus* qui est une espèce dépourvue de dimorphisme sexuel. En l'absence d'observation directe de tissu gonadique, un test de sexage similaire a été réalisé sur des individus de *Epinephelus lanceolatus* à partir de prélèvements sanguins (Om et al., 2013). L'absence de détection de la Vtg dans le sang et le mucus des males de *H. niloticus* montre que les poissons échantillonnés ne sont pas soumis à une perturbation endocrinienne due aux substances mimétiques des œstrogènes naturels, appelés xénoestrogènes contenus dans certains aliments distribués à la plupart des poissons d'élevage (Pelissero & Sumpter, 1992 ; Pelissero et al., 1989) ou dans le milieu aquatique (Arukwe & Røe, 2008; Dugué et al., 2008 ; Genovese et al., 2014 ; Le Menn, 1979).

S'agissant de la communication chimique, il convient de noter que plusieurs types de signaux sont impliqués dans le comportement social des poissons. De nombreux poissons utilisent des phéromones sexuelles pour attirer les membres du sexe opposé ou pour susciter un comportement de fraie (Chung-Davidson et al., 2011 ; Stacey, 2003). Le test de diffusion des protéines du mucus de *H. niloticus* a montré que la Vtg ou ses produits de clivage ne sont pas

détectés dans l'eau. Par conséquent, la Vtg du mucus des femelles de *H. niloticus* ne peut donc pas constituer un signal chimique pour les individus mâles. Chez de nombreuses espèces de poissons, l'urine est un vecteur de phéromones sexuelles dérivées de stéroïdes (Huertas et al., 2014). Par exemple, l'urine de la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) femelle mature attire les mâles matures (Yambe et al., 2006) et stimule chez ceux-ci la libération de LH et la stéroïdogenèse (Scott et al., 1994). Cette approche n'a pas encore été testé chez *H. niloticus*.

Concernant les récepteurs de Vtg, deux types de transcrits de récepteur de la Vtg qui semblent être issus de l'épissage alternatif du domaine O-glycosylé (Chen et al., 2016) ont été identifiés chez *H. niloticus*. Il s'agit des formes LR8 avec 8 LBR dans la LBD (Sappington & Raikhel, 1998) qui ont été longtemps considérée comme la seule VLDLR capable de se lier aux Vtg de certaines espèces ovipares (Reading et al., 2014). LR8+ avec le domaine O-glycosylé et LR8- privé de ce domaine ont été détectés respectivement dans l'ovaire et l'hypophyse de *H. niloticus*. Ces deux formes de LR8 ont également été identifiées chez des poissons téléostéens tels que *O. mykiss* (Prat et al., 1998) et *Oncorhynchus clarki* (Mizuta et al., 2013), cependant LR8- est exprimé principalement dans l'ovaire de ces espèces alors que LR8+ est exprimé aussi bien dans l'ovaire que dans les tissus non ovariens comme le cerveau, l'intestin et les branchies. La détection de LR8- dans un tissu non ovarien (hypophyse de *H. niloticus*) mérite d'être approfondie. Depuis quelques années, un nouveau VLDLR appelé LRP13 ou LR13+1 a été identifié non chez *H. niloticus*, mais chez plusieurs espèces de téléostéens comme *M. saxatilis*, *Morone americana* (Reading et al., 2014), *Cynoglossus semilaevis*, *Oryzias latipes* (Wang et al., 2017) et *O. clarki* (Mushirobira et al., 2015) avec 13 LBR dans le LBD au niveau de l'extrémité N-terminale et un LBR dans le LBD au niveau de l'extrémité C-terminale (Hiramatsu et al., 2013). Certaines espèces de poisson peuvent posséder jusqu'à quatre formes de VLDLR comme c'est le cas chez *M. Americana* (Reading et al., 2011). Dans le cerveau, les VLDLR jouent un rôle dans la transmission du signal extracellulaire, les processus de signalisation intracellulaire et le développement du système nerveux central (Trommsdorff et al., 1999).

Les LR8 sont conservés au niveau structural chez de nombreuses espèces (Dominguez et al., 2012 ; A. Li et al., 2003 ; Pousis et al., 2012 ; Prat et al., 1998) y compris *H. niloticus* qui partage plus de 84% d'identité en acides aminés avec des espèces d'Ostéoglossiformes, de Salmoniformes, de Perciformes et de Cypriniformes. Les précurseurs de HnVLDLR ont un peptide signal suivi de huit ou sept domaines respectivement pour la forme LR8+ et LR8-. Le

LBD, qui contrôle les interactions entre le récepteur et le domaine Lv de la Vtg (Hiramatsu et al., 2001), est composé de huit LBR de 40 acides aminés environ chacun riche de six cystéines (Li et al., 2003 ; Luo et al., 2013) et de résidus chargés négativement à sa surface qui contiennent la signature EDE dans la LBR3 et SDE dans les autres LBR bien conservés entre les espèces (Agulleiro et al., 2007). Trois LBR (LBR1 à LBR3) sont essentiellement impliqués dans la liaison de la Vtg au récepteur (Li et al., 2003). Chez le poulet (Bajari et al., 1998), le tripeptide EDE du LBR3 avec sa densité de charge négative plus élevée que le tripeptide SDE des autres LBR semble être déterminant pour la liaison de la Vtg au récepteur alors que chez *O. niloticus* (Li et al., 2003) son rôle dans la formation de cage de calcium semble plus probable. Les cystéines des trois domaines précurseurs du facteur de croissance épidermique (EGF) sont également bien conservées entre les espèces. Le domaine prédit pour former une structure à hélices béta (Agulleiro et al., 2007) entre EGF2 et EGF3 est composé de cinq séquences de quatre acides aminés de type YWS(V)D et FWA(T)D bien conservées entre les espèces. Enfin, la séquence FDNPVY hautement conservée du domaine cytoplasmique, potentiellement impliquée dans l'internalisation du récepteur après la liaison du ligand (Agulleiro et al., 2007) est aussi présent dans HnVLDLR.

CONCLUSION/PERSPECTIVES

A travers cette étude, des données moléculaires relatives à la vitellogenèse et sa régulation ont été obtenues pour la première fois chez l'Ostéoglossiformes africain, *Heterotis niloticus*. Les séquences nucléotidiques et les séquences protéiques déduites de la prolactine et son récepteur, des gonadotropines (FSH et LH) et leurs récepteurs, les récepteurs béta et gamma à l'estradiol et les vitellogénines et leurs récepteurs ont été identifiées. Aucun ERα n'a été identifié et les séquences définitives de deux Vtg hépatiques et la Vtg ovarienne sont à déterminer par des analyses complémentaires. Il a été possible de différencier les sexes chez cette espèce par la détection en spectrométrie de masse de la Vtg dans le mucus et le sang. Cette étude peut être considérée comme une étape nécessaire à la caractérisation fonctionnelle des molécules identifiées. Elle permet aussi d'envisager des études de comportement reproducteur à partir d'individus sexés pour une meilleure maîtrise de la reproduction et de l'élevage de cette espèce.

Les analyses en MS et en ELISA étant quantitatives, il est urgent d'établir une relation entre la concentration en Vtg du mucus et le stade de maturité des femelles (Baumann et al., 2013 ; Chatakondi & Kelly, 2013) pour mettre en œuvre des applications multiples en pisciculture en

conditions non invasives, ce qui permettra de préserver le bien-être des poissons d'élevage et de produire ainsi un poisson de qualité relativement épargné du stress.

Sur un plan pratique, la connaissance des séquences primaires des hormones hypophysaires permettra de réaliser avec des peptides de synthèse pour induire la gamétogenèse afin d'être en mesure de piloter la production d'alevins en continu sur l'ensemble de l'année (Bry et al., 1978 ; Mehdi & Ehsan, 2013 ; Mylonas et al., 2010), ce qui est un paramètre important pour assurer une production régulière de poissons commercialisables.

Par ailleurs, la connaissance des neurohormones hypophysaires de *H. niloticus* permettra chez cette espèce lors d'expérimentations *in vivo* qu'il reste à entreprendre, d'être en mesure de suivre les niveaux circulants avec des outils quantitatifs spécifiques tels que l'ELISA ou la spectrométrie de masse. Dans un avenir proche, il faudra chercher à caractériser l'ensemble du neuropeptidome de cette espèce et d'une façon générale l'ensemble du peptidome régulateur pour faciliter l'interprétation des études physiologiques qui permettront de totalement maitriser l'élevage d'un poisson de grande qualité organoleptique, possédant une croissance élevée et omnivore à tendance phytophage. Comme il a été dit précédemment, un travail important reste à réaliser pour parfaitement maitriser la reproduction, mais aussi pour formuler un aliment adapté au besoin nutritionnel de cette espèce tout en n'altérant pas la qualité de la chair. L'utilisation d'outils moléculaires pourrait faciliter la formulation d'aliments adaptés aux différentes phases d'élevage (Leduc et al., 2018) et la sélection de reproducteurs performants (Hallerman, 2006) pour le développement d'une pisciculture durable respectueuse de l'environnement.

INFORMATION SUR LES AUTEURS

Correspondant

*E-mail : joel.henry@unicaen.fr Tel : +33 (0)2 31 56 55 96

REMERCIEMENTS

Nous remercions Sabbat Affif, ex propriétaire de la ferme piscicole où les échantillons ont été collectés pour cette étude et le chef d'exploitation Jacques Manlan qui a organisé les différentes captures. Les auteurs remercient également l'IRD itrop HPC (Plateforme SouthGreen : https://bioinfo.ird.fr/- http://www.southgreen.fr) de Montpellier et la plateforme ABiMS de la

station biologique de Roscoff http://abims.sb-roscoff.fr) pour avoir fourni les ressources HPC ayant contribué aux résultats de la recherche rapportés dans le présent document.

REFERENCES

Aagaard, M. M., Siersbæk, R., & Mandrup, S. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Molecular basis for gene-speci fi c transactivation by nuclear receptors ☆. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1812*, 824–835. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.018

Acharjee, A., Chaube, R., & Joy, K. P. (2015). Molecular Cloning and Characterization of the Gonadotropin Subunits GP a , FSH b , and LH b Genes in the Stinging Cat fi sh Heteropneustes fossilis : Phylogeny , Seasonal Expression , and Pituitary Localization. *Journal of Experimental Zoology*, *323A*, 567–585. https://doi.org/10.1002/jez.1949

Adite, A., Winemiller, K. O., & Fiogbe, E. D. (2006). Population structure and reproduction of the African bonytongue Heterotis niloticus in the So River-floodplain system (West Africa): implications for management. *Ecology of Freshwater Fish*, *15*(1), 30–39. https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2005.00119.x

Agulleiro, M. J., André, M., Morais, S., Cerdà, J., & Babin, P. J. (2007). High Transcript Level of Fatty Acid-Binding Protein 11 but Not of Very Low-Density Lipoprotein Receptor Is Correlated to Ovarian Follicle Atresia in a Teleost Fish (Solea senegalensis)1. *Biology of Reproduction*, *77*(3), 504–516. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061598

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, *81*(3), 1269–1304. https://doi.org/0031-9333/01

Arukwe, A., & Røe, K. (2008). Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (Salmo salar) exposed to nonylphenol. *Cell and Tissue Research*, *331*(3), 701–712. https://doi.org/10.1007/s00441-007-0543-y

Audet-Walsh, É., & Giguère, V. (2015). The multiple universes of estrogen-related receptor α and γ in metabolic control and related diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*, 51–61. https://doi.org/10.1038/aps.2014.121

Bajari, T. M., Lindstedt, K. A., Riepl, M., Mirsky, V. M., Nimpf, J., Wolfbeis, O. S., … Schneider, W. J. (1998). A minimal binding domain of the low density lipoprotein receptor family. *Biological Chemistry*, *379*(8–9), 1053–1062.

Baudiffier, D. (2012). Modes de perturbation de la stéroïdogenèse testiculaire et de la spermatogenèse chez le poisson zèbre (Danio rerio) par des fongicides azolés. *Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1*, 1–178.

Baumann, L., Holbech, H., Keiter, S., Kinnberg, K. L., Knörr, S., Nagel, T., & Braunbeck, T. (2013). The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. *Aquatic Toxicology*, *128–129*, 34–42. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.016

Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., … Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 162. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0958-3

Bhanu, S. V, & Philip, B. (2011). Effect of ethanol on branchial adenosine triphosphatases in Oreochromis mossambicus (Peters). *Toxicology International*, *18*(1), 27. https://doi.org/10.4103/0971-6580.75849

Borella, M. I., Venturieri, A. R., & Mancera, A. J. M. (2009). Immunocytochemical identification of adenohypophyseal cells in the pirarucu (Arapaima gigas), an Amazonian basal teleost. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*, 3–16. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9254-x

Bousfield, G. R., & Dias, J. A. (2011). Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, (12), 289–302. https://doi.org/10.1007/s11154-011-9191-3

Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal RNA-Seq quantification. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 525–527.

Brooks, C. L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, *33*(4), 504–525. https://doi.org/10.1210/er.2011-1040

Bry, C., Billard, R., & De Montalembert, G. (1978). Induction de la maturation ovocytaire et de l'ovulation par traitement hormonal chez le brochet (Esox lucius). *Bulletin Français de Pisciculture*, *271*, 21–32. https://doi.org/10.1051/kmae:1978003

Bryant, D. M., Johnson, K., Di Tommaso, T., Tickle, T., Couger, B. M., Payzin-Dogru, D., … Whited, J. L. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports*, *18*(3), 762–776. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063.A

Bu, G., Liang, X., Li, J., & Wang, Y. (2015). General and Comparative Endocrinology Extra-pituitary prolactin (PRL) and prolactin-like protein (PRL-L) in chickens and zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, *220*, 143–153. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.001

Bulukin, E., Meucci, V., Minunni, M., Pretti, C., Intorre, L., Soldani, G., & Mascini, M. (2007). An optical immunosensor for rapid vitellogenin detection in plasma from carp (Cyprinus carpio). *Talanta*, *72*(2), 785–790. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.007

Carreiro, C. R. P., Furtado-Neto, M. A. D. A., Mesquita, P. E. C., & Bezerra, T. A. (2011). Sex determination in the Giant fish of Amazon Basin, Arapaima gigas (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy. *Acta Amazonica*, *41*(3), 415–419. https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300012

Chatakondi, N. G., & Kelly, A. M. (2013). Oocyte Diameter and Plasma Vitellogenin as Predictive Factors to Identify Potential Channel Catfish, Ictalurus punctatus, Suitable for Induced Spawning. *Journal of the World Aquaculture Society*, *44*(1), 115–123. https://doi.org/10.1111/jwas.12001

Chen, Q., Takahashi, Y., Oka, K., & Ma, J. (2016). Functional Differences of Very-Low-Density Lipoprotein Receptor Splice Variants in Regulating Wnt Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(20), 2645–2654. https://doi.org/10.1128/MCB.00235-16.Address

Choi, C. Y., & Habibi, H. R. (2003). Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *204*(1–2), 169–177. https://doi.org/S030372070200182X [pii]

Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F.,

Chávez Veintemilla, C., … Nuñez, J. (2009). Gender determination in the Paiche or Pirarucu (Arapaima gigas) using plasma vitellogenin, 17β-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*(1), 125–136. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9211-8

Chung-Davidson, Y. W., Huertas, M., & Li, W. (2011). A Review of Research in Fish Pheromones. *Chemical Communication in Crustaceans*, 467–482. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77101-4

Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K. A. J., Gustafsson, J.-åke, & Korach, K. S. (1997). Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor-α (ERα) and Estrogen Receptor-β (ERβ) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ERα-Knockout Mouse. *Endocrinology*, *138*(11), 4613–4621.

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, *208*(3–4), 191–364. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1

Dominguez, G. A., Bisesi, J. H., Kroll, K. J., Denslow, N. D., & Sabo-Attwood, T. (2014). Control of Transcriptional Repression of the Vitellogenin Receptor Gene in Largemouth Bass (Micropterus Salmoides) by Select Estrogen Receptors Isotypes. *Toxicological Sciences*, *141*(2), 423–431. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu145

Dominguez, G. A., Quattro, J. M., Denslow, N. D., Kroll, K. J., Prucha, M. S., Porak, W. F., … Sabo-Attwood, T. L. (2012). Identification and Transcriptional Modulation of the Largemouth Bass, Micropterus salmoides, Vitellogenin Receptor During Oocyte Development by Insulin and Sex Steroids1. *Biology of Reproduction*, *87*(3), 1–12. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099812

Dugué, R., Chu Koo, F., Alcántara Bocanegra, F., Duponchelle, F., Renno, J. F., & Nuñez, J. (2008). Purification and assay of Arapaima gigas vitellogenin : Potential use for sex determination by. *Cybium*, *32*(2), 111.

Ezekiel, E. N., & Abowei, J. F. N. (2013). Length-Weight Relationship and Condition Factor of Heterotis niloticus from Amassoma flood plain , Niger Delta , Nigeria . *Applied Science Report*, *4*(1), 164–172.

Faria, M. T., Carvalho, R. F., Sevilhano, T. C. A., Oliveira, N. A. J., Silva, C. F. P., Oliveira, J. E., … Bartolini, P. (2013). Isolation of the pituitary gonadotrophic α-subunit hormone of the giant amazonian fish: Pirarucu (Arapaima gigas). *Fish Physiology and Biochemistry*, *39*(3), 683–693. https://doi.org/10.1007/s10695-012-9730-1

Feng, W., Matzuk, M. M., Mountjoy, K., Bedows, E., Ruddon, R. W., & Boime, I. (1995). Ehe Asparagine-linked Oligosaccharides of the Human Chorionic Gonadotropin β Subunit Facilitate Correct Disulfide Bond Pairing. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 11851–11859.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1523–1631. https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50037-3

Gao, X. M., Zhou, Y., Zhang, D. D., Hou, C. C., & Zhu, J. Q. (2019). Multiple vitellogenin genes (vtgs) in large yellow croaker (Larimichthys crocea): molecular characterization and expression pattern analysis during ovarian development. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*, 829–848. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0569-y

Genovese, G., Regueira, M., Da Cuña, R. H., Ferreira, M. F., Varela, M. L., & Lo Nostro, F. L. (2014). Nonmonotonic response of vitellogenin and estrogen receptor α gene

expression after octylphenol exposure of Cichlasoma dimerus (Perciformes, Cichlidae). *Aquatic Toxicology*, *156*, 30–40. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.019

Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors : From Gene to Function *. *Endocrine Reviews*, *20*(5), 689–725.

Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., & Martial, J. A. (1996). Sequence-Function Relationships Within the Expanding. *Endocrine Reviews*, *17*(4), 385–410.

Grabherr, M., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., … Regev, A. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883.Trinity

Guo-Qing, L., & Wilson, M. V. H. (1996). The discovery of Heterotidinae (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene Paskapoo Formation of Alberta, Canada. *Journal of Vertebrate Paleontology*, *16*(2), 198–209. https://doi.org/10.1080/02724634.1996.10011308

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., … Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. In *Nature Protocols* (Vol. 8). https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084.De

Hallerman, E. M. (2006). Use of Molecular Tools for Research and Improvement of Aquaculture Stocks. *Aquaculture*, *58*(4), 286–296.

Hara, A., Hiramatsu, N., & Fujita, T. (2016). Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, *82*(2), 187–202. https://doi.org/10.1007/s12562-015-0957-5

Hawkins, M. B., & Thomas, P. (2004). The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERβa are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology*, *145*(6), 2968–2977. https://doi.org/10.1210/en.2003-0806

Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A., & Thomas, P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(20), 10751–10756. https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10751

Hilton, E. J. (2001). Tongue Bite Apparatus of Osteoglossomorph Fishes: Variation of a Character Complex. *Copeia*, *2001*(2), 372–381.

Hilton, E. J. (2003). Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society*, *137*(1), 1–100. https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00032.x

Hiramatsu, N., Fukadal, H., Sullivan, C. V, & Hara, A. (2001). Simple and Sensitive Detection of Vitellogenin Receptor (s) in Sakhalin Taimen (Hucho perryi). *Bull. Fish Sci. Hokkaido Univ.*, *52*(1), 5–9.

Hiramatsu, N., Luo, W., Reading, B. J., Sullivan, C. V., Mizuta, H., Ryu, Y.-W., … Hara, A. (2013). Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts. *Fish Physiol Biochem*, *39*, 29–32. https://doi.org/10.1007/s10695-012-9612-6

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C. V., & Hara, A. (2006). Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, *149*(1), 35–47. https://doi.org/10.1007/s00227-005-

0214-z

Huang, X., Hui, M. N. Y., Liu, Y., Yuen, D. S. H., Zhang, Y., Chan, W. Y., … Cheng, C. H. K. (2009). Discovery of a Novel Prolactin in Non-Mammalian Vertebrates : Evolutionary Perspectives and Its Involvement in Teleost Retina Development. *PLoS ONE*, *4*(7), e6163. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006163

Huertas, M., Almeida, O. G., Canário, A. V. M., & Hubbard, P. C. (2014). Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology*, *196*, 106–111. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.024

IRD. (2008). Vers la domestication du plus grand poisson de l'Amazone. *Actualité Scientifiques*, *306*, 1–2.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., … Chambon, P. (1995). Activation of the Estrogen Receptor Through ~hosphorylation by Mi togen-Activated Protein Kinase. *Science*, *270*, 1491–1494. https://doi.org/10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2011.17.025

Kong, H. J., Kim, J. L., Moon, J. Y., Kim, W. J., Kim, H. S., Park, J. Y., … An, C. M. (2014). Characterization, expression profile, and promoter analysis of the Rhodeus uyekii vitellogenin Ao1 gene. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18804–18818. https://doi.org/10.3390/ijms151018804

Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA : Fast and accurate filtering of BIOINFORMATICS SortMeRNA : Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211–3217. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315

Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., … Jasuja, R. (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, *2011*, 1–7. https://doi.org/10.4061/2011/812540

Kumazawa, Y., & Nishida, M. (2000). Molecular Phylogeny of Osteoglossoids : A New Model for Gondwanian Origin and Plate Tectonic Transportation of the Asian Arowana. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(12), 1869–1878.

Lavoué, S. (2016). Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *99*, 34–43. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.008

Lavoué, S., & Sullivan, J. P. (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *33*(1), 171–185. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.021

Lazard, J. (1990). Transferts de poissons et développement de la production piscicole. *Revue Hydrobiologie Tropicale*, *23*(3), 251–265.

Le Menn, F. (1979). Induction of vitellogenin by estradiol and androgens in a teleostean fish: Gobius niger L. *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences*, *289*(4), 413–416. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/117947

Leduc, A., Zatylny-Gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, G. Le, Castel, H., … Henry, J. (2018). Dietary aquaculture by-product hydrolysates: Impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (Dicentrarchus labrax) fed low fish meal diets. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0

Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S. (2006). Estrogen receptor (ER) beta isoforms : A key to understanding ER beta signaling. *PNAS*, *103*(35), 13162–13167.

Li, A., Sadasivam, M., & Ding, J. L. (2003). Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. The first three ligand-binding repeats of VtgR interact with the amino-terminal region of Vtg. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(5), 2799–2806. https://doi.org/10.1074/jbc.M205067200

Luo, W., Ito, Y., Mizuta, H., Massaki, K., Hiramatsu, N., Todo, T., … Hara, A. (2013). Molecular cloning and partial characterization of an ovarian receptor with seven ligand binding repeats, an orthologue of low-density lipoprotein receptor, in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *166*(2), 263–271. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.026

Mañanós, E., Núñez-Rodríguez, J., Le Menn, F., Zanuy, S., & Carrillo, M. (2007). Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (Dicentrarchus labrax). *Reproduction Nutrition Development*, *37*, 51–61. https://doi.org/10.1051/rnd:19970106

Manzon, L. A. (2002). The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation : A Review. *General and Comparative Endocrinology*, *125*, 291–310. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7746

Marcos, P. L., & Adalberto, L. V. (2015). Differentially expressed genes in the pituitary of the Amazonian fish Arapaima gigas. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, *7*(8), 132–141. https://doi.org/10.5897/IJFA15.0473

Marlatt, V. L., Martyniuk, C. J., Zhang, D., Xiong, H., Watt, J., Xia, X., … Trudeau, V. L. (2008). Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17β-estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *283*(1–2), 38–48. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.10.013

Maruska, K. P., & Fernald, R. D. (2011). Social Regulation of Gene Expression in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Physiology*, *26*(6), 412–423. https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2011

Mehdi, Y., & Ehsan, S. (2013). A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. *International Journal of Agricultural Research*, *1*(1), 15–21.

Meier, F., Beck, S., Grassl, N., Lubeck, M., Park, M. A., Raether, O., & Mann, M. (2015). Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device. *Journal of Proteome Research*, *14*(12), 5378–5387. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00932

Métivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hübner, M. R., Brand, H., Penot, G., … Gannon, F. (2002). A Dynamic Structural Model for Estrogen Receptor alpha Activation by Ligands , Emphasizing the Role of Interactions between Distant A and E Domaines. *Molecular Cell*, *10*, 1019–1032.

Meucci, V., & Arukwe, A. (2005). Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (Salmo salar)

exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *73*(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.021

Mizuta, H., Luo, W., Ito, Y., Mushirobira, Y., Todo, T., Hara, A., … Hiramatsu, N. (2013). Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *166*(1), 81–90. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.07.005

Moncaut, N., Nostro, F. Lo, & Maggese, M. C. (2003). Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish Cichlasoma dimerus (Heckel, 1840) induced by estradiol-17beta. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *63*(2), 127–137. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00175-3

Moreau, J. (1982). Exposé synoptique des données biologiques sur Heterotis niloticus (Cuvier, 1829). *FAO Synop. Pêches*, *131*, 1–45.

Mushirobira, Y., Mizuta, H., Luo, W., Todo, T., Hara, A., Reading, B. J., … Hiramatsu, N. (2015). Molecular cloning and partial characterization of a low-density lipoprotein receptor-related protein 13 (Lrp13) involved in vitellogenin uptake in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Molecular Reproduction and Development*, *82*(12), 986–1000. https://doi.org/10.1002/mrd.22579

Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Reproduction and Broodstock Management General and Comparative Endocrinology Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *165*, 516–534. https://doi.org/10.1002/9781444392210.ch4

Ndiaye, P., Forgue, J., Lamothe, V., Cauty, C., Tacon, P., Lafon, P., … Núñez, J. (2006). Tilapia (Oreochromis niloticus) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *305A*(7), 576–593. https://doi.org/10.1002/jez.a.290

Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2010). Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology*, *151*(4), 1668–1676. https://doi.org/10.1210/en.2009-1447

Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, *192*, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032

Nelson, E. R., Wiehler, W. B., Cole, W. C., & Habibi, H. R. (2007). Homologous Regulation of Estrogen Receptor Subtypes in Goldfish (Carassius auratus). *Molecular Reproduction and Development*, *74*(1), 1105–1112. https://doi.org/10.1002/mrd

Nelson, G. J. (1968). Gill arches of teleostean fishes of the division Osteoglossomorpha. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, *47*(312), 261–277. https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1968.tb00511.x

Nelson, G. J. (1969). Infraorbital bones and their bearing on the phylogeny and geography of Osteoglossomorph fishc. *American Museum Novitates*, *2394*, 1–37.

Norris, D. O., & Lopez, K. H. (2011). Hormones and reproduction of vertebrates, Volume 1 - Fishes. In *Saudi Med J* (Vol. 1).

Noso, T., Nicoll, C. S., Polenov, A. L., & Kawauchi, H. (1993). The primary structure of sturgeon prolactin: Phylogenetic implication. *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 91, pp. 90–95. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1108

Núñez-Rodríguez, J., Bon, E., & Le Menn, F. (1996). Vitellogenin receptors during Vitellogenesis in the rainbow troutOncorhynchus mykiss. *The Journal of Experimental Zoology*, *274*, 163–170. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19960215)274:3<163::aid-jez3>3.0.co;2-m

Nuñez-Rodriguez, J., Kah, O., Geffard, M., & Le Menn, F. (1989). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for sole (Solea vulgaris)vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *92B*(4), 741–746.

Nuñez, J. (2008). Arapaima gigas se dévoile. *Science Au Sud*, *47*, 1.

Nunez Rodriguez, J., Dugue, R., Oteme, Z. J., Hem, S., & Le Menn, F. (1997). Vitellogenin plasma levels in two cultured African catfish species, Chrysichthys nigrodigitatus (Claroteidae) and Heterobranchus longifilis (Clariidae). *Aquat. Living Resources*, *10*, 231–238.

Odo, G., Nwamba, H., & Eyo, J. (2009). Aspects Of The Biology Of Heterotis niloticus Cuvier 1829 (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) In The Anambra Flood River System, Nigeria. *Animal Research International*, *6*(2), 994–1002. https://doi.org/10.4314/ari.v6i2.48131

Oladosu, G. A., Obi, A., & Oladosu, O. O. (2007). Sex determination in Heterotis niloticus (Cuvier 1829) Based on morphometric features. *ASSET Series B*, *6*(1), 22–30.

Om, A. D., Jasmani, S., Ismail, N., Yeong, S. Y., & Abol-Munafi, A. B. (2013). Application MALDI TOF on protein identification of vitellogenin in giant grouper (Epinephelus lanceolatus). *Fish Physiology and Biochemistry*, *39*(5), 1277–1286. https://doi.org/10.1007/s10695-013-9782-x

Pelissero, C., Cuisset, B., & Le Menn, F. (1989). The influence of sex steroids in commercial meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon Acipense baeri. *Aquatic Living Resources*, *2*, 161–168. https://doi.org/10.1051/alr

Pelissero, C., & Sumpter, J. P. (1992). Steroids and "steroid-like" substances in fish diets. *Aquaculture*, *107*, 283–301. https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90078-Y

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, *8*(10), 785–786. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701

Plant, T. M. (2015). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Journal of Endocrinology*, *226*(2), T41–T54. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113

Pousis, C., Santamaria, N., Zupa, R., De Giorgi, C., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., … Corriero, A. (2012). Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (Thunnus thynnus). *Animal Reproduction Science*, *132*, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.014

Prat, F., Coward, K., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (1998). Molecular Characterization and Expression of two Ovarian Lipoprotein Receptors in the Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss 1. *Biology of Reproduction*, *58*(5), 1146–1153. https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1146

Reading, B. J., Hiramatsu, N., Schilling, J., Molloy, K. T., Glassbrook, N., Mizuta, H., … Sullivan, C. V. (2014). Lrp13 is a novel vertebrate lipoprotein receptor that binds vitellogenins in teleost fishes. *Journal of Lipid Research*, *55*(11), 2287–2295. https://doi.org/10.1194/jlr.M050286

Reading, B. J., Hiramatsu, N., & Sullivan, C. V. (2011). Disparate Binding of Three Types of Vitellogenin to Multiple Forms of Vitellogenin Receptor in White Perch 1. *Biology of Reproduction*, *84*, 392–399. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087981

Roy, R. L., Morin, Y., Courtenay, S. C., & Robichaud, P. (2004). Purification of vitellogenin from smooth flounder (Pleuronectes putnami) and measurement in plasma by homologous ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *139*(2), 235–244. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.006

Sabo-Attwood, T., Kroll, K. J., & Denslow, N. D. (2004). Differential expression of largemouth bass (Micropterus salmoides) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *218*(1–2), 107–118. https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.007

Sappington, T. W., & Raikhel, A. S. (1998). Ligand-binding domains in vitellogenin receptors and other LDL-receptor family members share a common ancestral ordering of cysteine-rich repeats. *Journal of Molecular Evolution*, *46*(4), 476–487. https://doi.org/10.1007/PL00006328

Schilling, J., Loziuk, P. L., Muddiman, D. C., Daniels, H. V., & Reading, B. J. (2015). Mechanisms of egg yolk formation and implications on early life history of white perch (Morone americana). *PLoS ONE*, *10*(11), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143225

Scott, A. P., Liley, N. R., & Vermeirssen, E. L. M. (1994). Urine of reproductively mature female rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaun), contains a priming pheromone which enhances plasma levels of sex steroids and gonadotrophin II in males. *Journal of Fish Biology*, *44*, 13.

Sevilhano, T., Carvalho, R. F. De, Oliveira, N. A. D. J., Oliveira, J. E., Maltarollo, V. G., Trossini, G., … Bartolini, P. (2017). Molecular cloning and characterization of pirarucu (Arapaima gigas) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunit cDNAs. *PLoS ONE*, *12*(8), e0183545.

Skorupski, J., & Kmieć, M. (2013). Structural and functional characteristics of prolactin and its gene in the American mink (Neovison vison Schreb., 1777). A rewiev / Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna prolaktyny i jej genu u norki amerykańskiej (Neovison vison schreb., 1777). Pra. *Annales UMCS, Zootechnica*, *30*(4). https://doi.org/10.2478/v10083-012-0035-8

Šlechtová, T., Gilar, M., Kalíková, K., & Tesařová, E. (2015). Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences. *Analytical Chemistry*, *87*(15), 7636–7643. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00866

So, W., Kwok, H., & Ge, W. (2005). Zebrafish Gonadotropins and Their Receptors : II . Cloning and Characterization of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Subunits — Their Spatial-Temporal Expression Patterns and Receptor Specificity. *Biology of Reproduction*, *72*, 1382–1396. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038216

Stacey, N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*, *28*(1–4), 229–235. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030540.99732.2c

Stifani, S., Le Menn, F., Nunez Rodriguez, J., & Schneider, W. J. (1990). Regulation of oogenesis: The piscine receptor for vitellogenin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1045*, 271–279. https://doi.org/10.1016/0005-

2760(90)90130-P

Takahashi, A., Kanda, S., Abe, T., & Oka, Y. (2016). Evolution of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. *Endocrinology*, *157*(10), 3994–4002. https://doi.org/10.1210/en.2016-1356

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., … Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 483–515. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004

Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A., & Kragelund, B. B. (2005). Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology*, *351*, 810–823. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042

Trichet, V., Buisine, N., Mouchel, N., Morán, P., Pendás, A. M., Le Pennec, J. P., & Wolff, J. (2000). Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. *Molecular and General Genetics*, *263*(5), 828–837. https://doi.org/10.1007/s004380000247

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., … Herz, J. (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, *97*(6), 689–701. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80782-5

Uchida, K., Moriyama, S., Chiba, H., Shimotani, T., Honda, K., Miki, M., … Nozaki, M. (2010). Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate , hagfish. *PNAS*, *107*(36), 15832–15837. https://doi.org/10.1073/pnas.1002208107

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damián-matsumura, P., & Dias, J. A. (1999). Role of Glycosylation in Function of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrine*, *11*, 205–215. https://doi.org/10.1385/ENDO

Unal, G., Marquez, E. C., Feld, M., Stavropoulos, P., & Callard, I. P. (2014). Isolation of estrogen receptor subtypes and vitellogenin genes: Expression in female Chalcalburnus tarichi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, *172–173*(1), 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.04.002

Vischer, H. F., Marques, R. B., Granneman, J. C. M., Linskens, M. H. K., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2004). Receptor-selective determinants in catfish gonadotropin seat-belt loops. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *224*, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.06.011

Wallace, R. A., Hoch, K. L., & Carnevali, O. (1990). Placement of small lipovitellin subunits within the vitellogenin precursor in Xenopus laevis. *Journal of Molecular Biology*, *213*(3), 407–409. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80203-7

Wang, H., Tan, J. T. T., Emelyanov, A., Korzh, V., & Gong, Z. (2005). Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, Danio rerio. *Gene*, *356*(1–2), 91–100. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.041

Wang, N., Wang, R., Hu, Q., Xu, W., Zhu, Y., Yan, F., & Chen, S. (2017). Characterization of a low-density lipoprotein receptor, Lrp13, in Chinese tongue sole (Cynoglossus semilaevis) and medaka (Oryzias latipes). *Fish Physiology and Biochemistry*, *43*(5), 1289–1298. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0372-1

Wang, R., Gao, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Fang, Z., He, J., … Ma, G. (2010). Cloning, expression, and induction by 17-β estradiol (E2) of a vitellogenin gene in the white

cloud mountain minnow Tanichthys albonubes. *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*(2), 157–164. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9222-5

Watahiki, M., Yamamoto, M., Yamakawa, M., Tanaka, M., & Nakashima, K. (1989). Conserved and Unique Amino Acid Residues in the Domains of the Growth Hormones. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(1), 312–316.

Whittington, C. M., & Wilson, A. B. (2013). General and Comparative Endocrinology The role of prolactin in fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *191*, 123–136. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.027

Williams, V. N., Reading, B. J., Hiramatsu, N., Amano, H., Glassbrook, N., Hara, A., & Sullivan, C. V. (2014). Multiple vitellogenins and product yolk proteins in striped bass, Morone saxatilis: molecular characterization and processing during oocyte growth and maturation. *Fish Physiology and Biochemistry*, *40*(2), 395–415. https://doi.org/10.1007/s10695-013-9852-0

Yambe, H., Kitamura, S., Kamio, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Fusetani, N., & Yamazaki, F. (2006). L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15370–15374. https://doi.org/10.1073/pnas.0604340103

Yang, H. M., Wang, Y., Wang, Z. Y., & Wang, X. X. (2017). Seasonal and photoperiodic regulation of reproductive hormones and related genes in Yangzhou geese. *Poultry Science*, *96*(2), 486–490. https://doi.org/10.3382/ps/pew340

Yasuda, A., Kawauchi, H., & Papkoff, H. (1990). The complete amino acid sequence of prolactin from the sea turtle (Chelonia mydas). *General and Comparative Endocrinology*, *80*(3), 363–371. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90185-O

Yilmaz, O., Prat, F., Ibañez, A. J., Amano, H., Koksoy, S., & Sullivan, C. V. (2015). Estrogen-induced yolk precursors in European sea bass, Dicentrarchus labrax: Status and perspectives on multiplicity and functioning of vitellogenins. *General and Comparative Endocrinology*, *221*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.018

Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., … Henry, J. (2016). Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis : Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *Journal of Proteome Research*, *15*, 48–67. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463

Zechel, C., Shen, X., Chen, J., Chen, Z., Chambon, P., & Gronemeyerl, H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR , RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *The EMBO Journal*, *13*(6), 1425–1433.

Zhang, S., Dong, Y., & Cui, P. (2015). Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(2), 710–715. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.011

Zhong, L., Yuan, L., Rao, Y., Li, Z., Zhang, X., Liao, T., … Dai, H. (2014). Distribution of vitellogenin in zebrafish (Danio rerio) tissues for biomarker analysis. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *149*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.022

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 438–455. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017

4 Proximité phylogénétique de *A. gigas* et *H. niloticus* basée sur les aspects moléculaires de la vitellogenèse et sa régulation

4.1 Les séquences utilisées

Les séquences de *H. niloticus* utilisées ici sont décrites dans l'article en cours de publication intitulé « Identification et caractérisation structurale des acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez l'Osteoglossiforme d'intérêt aquacole, *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829) » de la présente thèse.

Chez *A.* gigas, la sous unité alpha commune à la FSH et la LH (Gpα) (Faria et al., 2013) et leur sous unités spécifique béta, FSHβ et LHβ (Sevilhano et al., 2017) ont déjà été caractérisées et les séquences protéiques sont accessibles sur le site de NCBI, respectivement avec les codes AIG51239, AIA09918 et AJO68014. Les analyses *in silico*, telles que décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes, ont permis d'identifier et de caractériser à partir des transcriptomes de foie, d'ovaire et d'hypophyse de *A. gigas*, d'autres molécules impliquées dans la vitellogenèse de cette espèce.

Les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques de *A. gigas* et *H. niloticus* ont été alignées avec CLC Sequence viewer et les arbres phylogénétiques incluant d'autres espèces de poissons ont été réalisés sous Mega 7.

4.2 Identification des acteurs moléculaires chez *A. gigas et* comparaison avec *H. niloticus*

4.2.1 Les vitellogénines et leur récepteur

Les analyses *in silico* des transcriptomes de foie et d'ovaire de *A. gigas* n'ont pas permis d'identifier les séquences des Vtg et leur récepteur contrairement à *H. niloticus* où trois Vtg hépatiques, une Vtg ovarienne partielle et deux VLDLR (ovarien et hypophysaire) ont été identifiés et caractérisés. Il n'a donc pas été possible de comparer ces deux espèces sur la base des séquences protéiques déduites de ces molécules.

4.2.2 Récepteurs du 17β-estradiol

L'analyse *in silico* a permis d'identifier chez *A. gigas* les transcrits de deux ERβ, AgERβ_X1 de 1677 paires de bases dans le foie et AgERβ_X2 de 1047 paires de bases dans l'ovaire codant pour des séquences protéiques respectives de 559 et 349 acides aminés (**Figure 43**). Chez *H. niloticus* quatre formes d'ERβ (HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3 et HnERβ_X) et un ERγ ont été identifiés. Le sous-type ERα n'a pas été identifié chez les deux espèces, le sous-type ERγ et les récepteurs apparentés aux récepteurs d'œstrogènes (**Annexe 7**) identifiés chez *H. niloticus* n'ont pas été identifiés chez *A. gigas*.

AgERβ_X1 et AgERβ_X2 sont composés de cinq domaines comme les ERs de *H. niloticus* et la plupart des récepteurs nucléaires. Il s'agit du domaine N-terminal (A/B), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la séquence flanquante D, le domaine de liaison au ligand (LBD) et la région C-terminale F.

ERβ_X1

```
  1 M  A  S  S  P  G  S  D  L  P  L  L  Q  F  Q  E  V  G  S  S  K  T  G  D  C  S  T  P  G  P  L  P  G  V  Y
  1 ATGGCTAGTTCCCCAGGAAGTGACCTGCCACTTTTGCAGTTCCAGGAAGTGGGCTCCAGCAAGACAGGGGACTGCAGCACCCCAGGACCCCTCCCTGGTGTTTAT
 36 A  G  P  V  P  G  L  A  M  D  S  R  A  V  C  I  P  S  P  Y  A  D  S  S  N  D  Y  A  T  L  S  F  Y  N  P
106 GCTGGACCCGTACCAGGTCTGGCCATGGACAGCCGGGCAGTGTGTATCCCCTCACCCTATGCGGACAGCAGCAATGACTATGCTACTCTCAGCTTCTACAACCCT
 71 S  V  L  G  Y  P  G  S  S  V  S  D  S  P  S  V  R  P  P  L  S  P  A  I  Y  W  S  P  H  G  H  P  G  Q  L
211 TCCGTGCTGGGCTACCCGGGCTCCTCTGTCTCTGACAGCCCCTCTGTACGGCCACCCCTAAGCCCTGCTATTTACTGGTCACCACATGGCCATCCTGGCCAGTTG
106 P  P  L  T  L  H  C  Q  Q  P  L  V  Y  S  E  P  P  R  T  P  W  V  E  P  K  V  Q  D  H  A  L  V  E  S  S
316 CCCCCACTCACCCTGCACTGTCAGCAGCCCCTGGTGTACAGTGAGCCCCCGAGGACCCCATGGGTGGAGCCCAAGGTCCAGGACCACGCCCTGGTTGAGAGCAGT
141 K  L  V  G  R  R  P  L  E  G  D  E  A  L  S  S  S  A  A  C  L  T  A  K  G  D  M  H  F  C  A  V  C  H  D
421 AAACTGGTGGGACGACGGCCGCTGGAAGGAGACGAGGCACTCAGTTCTTCTGCAGCCTGCTTAACAGCGAAGGGCGATATGCATTTCTGCGCCGTCTGCCACGAC
176 Y  A  S  G  Y  H  Y  G  V  W  S  C  E  G  C  K  A  F  F  K  R  S  I  Q  G  H  N  D  Y  I  C  P  A  T  N
526 TACGCCTCGGGCTATCACTATGGCGTCTGGTCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTTAAGAGGAGCATCCAAGGCCACAATGACTACATCTGCCCAGCGACCAAC
211 Q  C  T  I  D  K  N  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  L  R  K  C  Y  E  V  G  M  M  K  C  G  V  R  R  E  R  C
631 CAGTGCACCATCGACAAAAACCGCCGCAAAAGCTGCCAGGCCTGCCGCCTGCGGAAGTGCTACGAAGTGGGCATGATGAAGTGCGGAGTGAGACGTGAGCGCTGT
246 S  Y  R  G  V  R  H  R  R  V  P  Q  I  R  E  V  V  L  G  P  G  S  R  T  Q  R  R  L  E  S  N  L  P  P  M
736 AGCTACCGTGGGGTGCGACACCGGCGTGTACCACAGATCCGGGAAGTGGTGTTGGGACCAGGCTCCAGGACCCAGAGAAGACTGGAGAGCAACCTGCCCCCTATG
281 K  N  F  Q  P  L  S  L  T  P  E  Q  L  V  L  R  I  M  E  A  E  P  P  E  I  Y  L  M  K  D  M  K  K  P  F
841 AAGAACTTCCAGCCCCTGTCGCTGACCCCCGAACAGCTGGTCTTGCGCATAATGGAGGCAGAGCCCCCGGAGATCTACTTGATGAAGGACATGAAGAAGCCGTTC
316 T  E  S  S  M  M  M  S  L  T  N  L  A  D  K  E  L  V  L  M  I  S  W  A  K  K  I  P  G  F  V  E  L  S  L
946 ACTGAGAGCAGTATGATGATGTCTCTCACTAACCTGGCTGACAAGGAGCTGGTCCTCATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATCCCGGGGTTCGTCGAGCTCAGCCTG
351 S  D  Q  V  H  L  L  E  C  C  W  L  E  V  L  M  L  G  L  M  W  R  S  V  D  H  P  G  K  L  I  F  S  P  D
1051 TCAGATCAGGTGCACCTGCTGGAGTGCTGCTGGCTGGAGGTGCTGATGCTGGGCCTGATGTGGAGGTCCGTCGACCACCCCGGGAAGCTCATCTTCTCCCCCGAC
386 L  K  L  N  R  D  E  G  N  C  V  E  G  I  M  E  I  F  D  M  L  L  A  A  T  A  R  F  R  E  L  K  L  Q  R
1156 CTTAAGCTCAATAGGGATGAAGGCAACTGCGTGGAGGGGATCATGGAGATCTTTGACATGTTGCTGGCGGCCACCGCCCGATTCCGCGAGCTGAAGCTGCAGAGG
421 E  E  Y  V  C  L  K  A  L  I  L  L  N  S  N  M  C  V  S  S  P  E  T  P  E  E  L  E  S  R  A  K  L  L  R
1261 GAAGAGTACGTCTGCCTCAAGGCGCTGATCCTGCTCAACTCCAACATGTGCGTGAGCTCCCCGGAAACGCCCGAGGAGCTGGAGAGCCGTGCCAAGCTGCTGCGG
456 L  L  D  A  V  T  D  A  L  V  W  A  I  S  R  K  G  L  T  F  Q  Q  Q  S  A  R  L  A  H  L  L  L  L  L  S
1366 CTGCTGGACGCCGTGACGGACGCGCTGGTGTGGGCTATCTCCAGGAAGGGCCTCACCTTCCAGCAACAGTCCGCTCGCCTCGCTCATCTGCTGCTGCTGCTGTCA
491 H  I  R  H  L  S  N  K  G  M  E  H  L  S  N  M  K  M  K  N  V  V  P  L  Y  D  L  L  L  E  M  L  D  A  N
1471 CACATCCGCCATCTCAGTAACAAGGGAATGGAGCACCTGTCCAACATGAAGATGAAGAACGTGGTGCCGCTGTACGACCTGCTCCTGGAGATGCTGGATGCAAAC
526 T  M  H  S  T  R  V  H  R  C  P  P  P  R  E  A  S  P  Q  E  P  S  P  H  H  T  M  E  N  K  S  L  Q  Q  *
1576 ACCATGCACAGCACCCGTGTGCATCGCTGCCCCCCACCACGGGAAGCCAGTCCCCAGGAGCCTTCGCCCCATCACACAATGGAAAACAAGTCCCTGCAGCAGTAG
```

ERβ_X2

```
  1 M  A  S  S  P  G  S  D  L  P  L  L  Q  F  Q  E  V  G  S  S  K  T  G  D  C  S  T  P  G  P  L  P  G  V  Y
  1 ATGGCTAGTTCCCCAGGAAGTGACCTGCCACTTTTGCAGTTCCAGGAAGTGGGCTCCAGCAAGACAGGGGACTGCAGCACCCCAGGACCCCTCCCTGGTGTTTAT
 36 A  G  P  V  P  G  L  A  M  D  S  R  A  V  C  I  P  S  P  Y  A  D  S  S  N  D  Y  A  T  L  S  F  Y  N  P
106 GCTGGACCCGTACCAGGTCTGGCCATGGACAGCCGGGCAGTGTGTATCCCCTCACCCTATGCGGACAGCAGCAATGACTATGCTACTCTCAGCTTCTACAACCCT
 71 S  V  L  G  Y  P  G  S  S  V  S  D  S  P  S  V  R  P  P  L  S  P  A  I  Y  W  S  P  H  G  H  P  G  Q  L
211 TCCGTGCTGGGCTACCCGGGCTCCTCTGTCTCTGACAGCCCCTCTGTACGGCCACCCCTAAGCCCTGCTATTTACTGGTCACCACATGGCCATCCTGGCCAGTTG
106 P  P  L  T  L  H  C  Q  Q  P  L  V  Y  S  E  P  P  R  T  P  W  V  E  P  K  V  Q  D  H  A  L  V  E  S  S
316 CCCCCACTCACCCTGCACTGTCAGCAGCCCCTGGTGTACAGTGAGCCCCCGAGGACCCCATGGGTGGAGCCCAAGGTCCAGGACCACGCCCTGGTTGAGAGCAGT
141 K  L  V  G  R  R  P  L  E  G  D  E  A  L  S  S  S  A  A  C  L  T  A  K  G  D  M  H  F  C  A  V  C  H  D
421 AAACTGGTGGGACGACGGCCGCTGGAAGGAGACGAGGCACTCAGTTCTTCTGCAGCCTGCTTAACAGCGAAGGGCGATATGCATTTCTGCGCCGTCTGCCACGAC
176 Y  A  S  G  Y  H  Y  G  V  W  S  C  E  G  C  K  A  F  F  K  R  S  I  Q  G  H  N  D  Y  I  C  P  A  T  N
526 TACGCCTCGGGCTATCACTATGGCGTCTGGTCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTTAAGAGGAGCATCCAAGGCCACAATGACTACATCTGCCCAGCGACCAAC
211 Q  C  T  I  D  K  N  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  L  R  K  C  Y  E  V  G  M  M  K  C  G  V  R  R  E  R  C
631 CAGTGCACCATCGACAAAAACCGCCGCAAAAGCTGCCAGGCCTGCCGCCTGCGGAAGTGCTACGAAGTGGGCATGATGAAGTGCGGAGTGAGACGTGAGCGCTGT
246 S  Y  R  G  V  R  H  R  R  V  P  Q  I  R  E  V  V  L  G  P  G  S  R  T  Q  R  R  L  E  S  N  L  P  P  M
736 AGCTACCGTGGGGTGCGACACCGGCGTGTACCACAGATCCGGGAAGTGGTGTTGGGACCAGGCTCCAGGACCCAGAGAAGACTGGAGAGCAACCTGCCCCCTATG
281 K  N  F  Q  P  L  S  L  T  P  E  Q  L  V  L  R  I  M  E  A  E  P  P  E  I  Y  L  M  K  D  M  K  K  P  F
841 AAGAACTTCCAGCCCCTGTCGCTGACCCCCGAACAGCTGGTCTTGCGCATAATGGAGGCAGAGCCCCCGGAGATCTACTTGATGAAGGACATGAAGAAGCCGTTC
316 T  E  S  S  M  M  M  S  L  T  N  L  A  D  K  E  L  V  L  M  I  S  W  A  K  K  I  P  G  N  S  T  H  V  *
946 ACTGAGAGCAGTATGATGATGTCTCTCACTAACCTGGCTGACAAGGAGCTGGTCCTCATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATCCCGGGTAACTCCACACATGTGTAA
```

Figure 43 : Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des récepteurs œstrogéniques béta (ERβ_X1 et ERβ_X2) de *A. gigas* (Ag). Le codon d'initiation et le codon stop sont en gras. La région A/B en position N-terminale suivie du domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé dans les encadrés et contenant la boite P (double soulignement) et la boite D (soulignement simple). Le domaine de liaison au ligand (LBD) (soulignement simple) est suivi du domaine F en position C terminale. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'estradiol sont entourés.

Les deux formes de AgERβ ont les domaines A/B, DBD et D identiques, le LBD et le domaine F étant variables (**Figure 44a**). Il s'agit de deux isoformes dues à un épissage alternatif du gène codant pour ces récepteurs œstrogéniques dans les mêmes conditions que les quatre isoformes ERβ de *H. niloticus*.

La comparaison des HnERβ_X1 et AgERβ_X1 (**Figure 44b**) montre une identité en acides aminés de 92,49% avec un DBD conservé contenant la boite P (EGCKA) intervenant dans la reconnaissance de l'ADN et la boite D (PATNQ) impliquée dans la dimérisation des récepteurs (Aranda & Pascual, 2001). Leurs LBD partagent 97,89% d'identité alors que les autres domaines sont les plus variables.

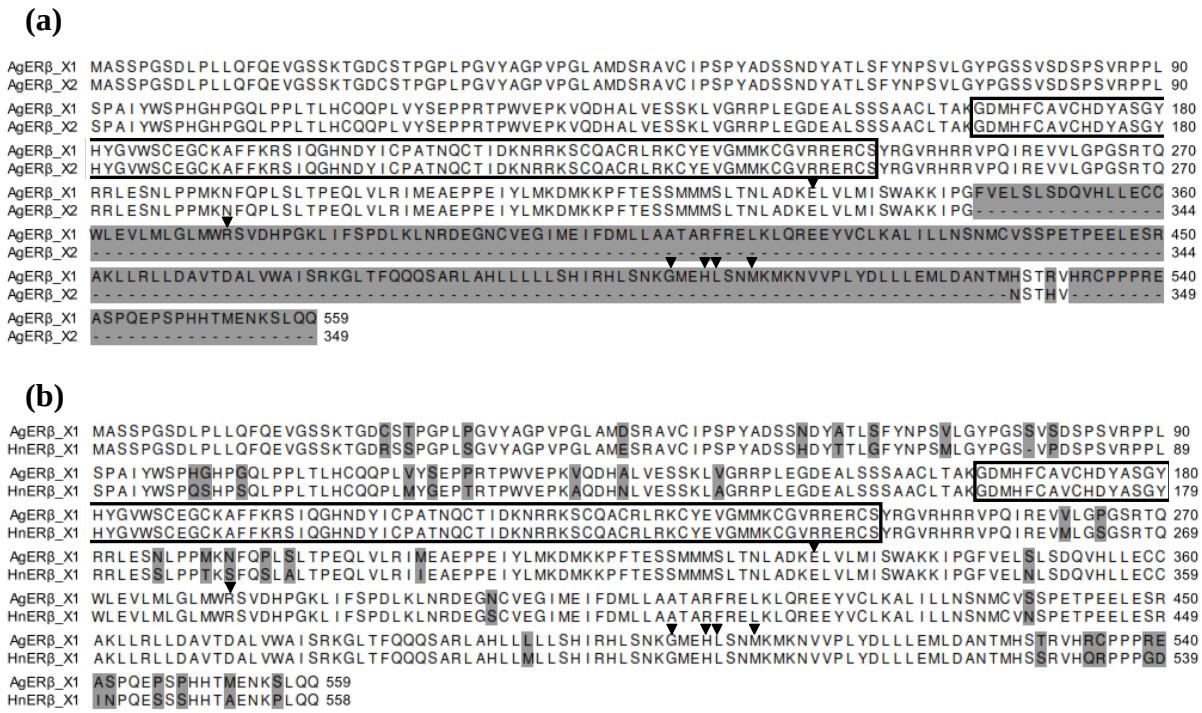


Figure 44 : Alignement des séquences protéiques déduites des deux récepteurs œstrogéniques béta de *A. gigas* (AgERβ_X1 et AgERβ_X2) (a) et comparaison de AgERβ_X1 avec HnERβ_X1 de *H. niloticus* (b). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est situé dans les encadrés. Les acides aminés impliqués dans la liaison avec le 17β-estradiol sont indiqués par des triangles noirs. Les domaines peu conservés sont en gris.

Comme HnERβ_X1, HnERβ_X2, HnERβ_X3 et HnERγ, les six acides aminés impliqués dans la liaison avec l'E2 (Sabo-Attwood et al., 2004) sont présents au niveau de AgERβ_X1 (Glu^{331}, Arg^{372}, Gly^{499}, His^{502}, Leu^{503} et Met^{506}) alors que AgERβ_X2 et HnERβ_X4 ne conservent respectivement qu'un seul (Glu^{331} et deux (Glu^{330}), Arg^{371}) de ces acides aminés. Le LBD de AgERβ_X2 est très réduit et ne contient que deux hélices α alors que AgERβ_X1 contient la totalité des 12 hélices α (**Figure 45**). L'absence de l'hélice 12, contenant la deuxième fonction d'activation (AF-2), au niveau du LBD de AgERβ_X2 comme c'est le cas de HnERβ_X4, ne favorise pas la formation d'homodimères fonctionnels mais plutôt des hétérodimères avec AgERβ_X1 (Leung et al., 2006).

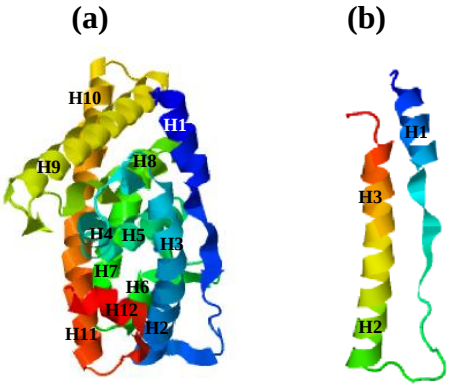


Figure 45 : Structure en hélice α (H) des LBD des récepteurs œstrogéniques beta de *A. gigas* obtenue avec I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Le LBD de AgERβ_X1 (a) possède 12 hélices α (H1 à H12) alors que le LBD de AgERβ_X2 (b) n'a que trois hélices α (H1 à H3).

4.2.3 La Prolactine et son récepteur

La prolactine exprimée par l'adénohypophyse de *A. gigas* (AgPRL) a été identifiée grâce à un transcrit de 633 paires de bases codant pour 211 acides aminés (**Figure 46a**).

Le précurseur protéique de AgPRL possède un peptide signal de 24 acides aminés (Met^{1} - Ser^{24}), quatre hélices α majeures représentant environ 57% de l'ensemble de la protéine : hélice 1 (Ile^{27} - His^{57}), hélice 2 (Glu^{91} - Pro^{117}), hélice 3 (Asn^{124} - Ile^{152}) et hélice 4 (Lys^{171} - Val^{203}) et deux courtes hélices α entre l'hélice 1 et l'hélice 2 : hélice 1' (Gly^{62} - Met^{64}) et hélice 1" (Asp^{84} - Arg^{88}) (**Figure 46a**). La structure tertiaire de AgPRL (**Figure 46b**) réalisée sous I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) montre que les quatre hélices majeures forment deux paires antiparallèles, hélice 1 / hélice 4 et hélice 2 / hélice 3. La AgPRL mature contient quatre cystéines dont une entre l'hélice 1' et l'hélice 1" (Cys^{72}), deux dans l'hélice 4 (Cys^{184} et Cys^{201}) et une en fin de séquence (Cys^{211}). HnPRL et AgPRL partagent 53,3% d'identité en acides aminés (**Figure 46c)**.

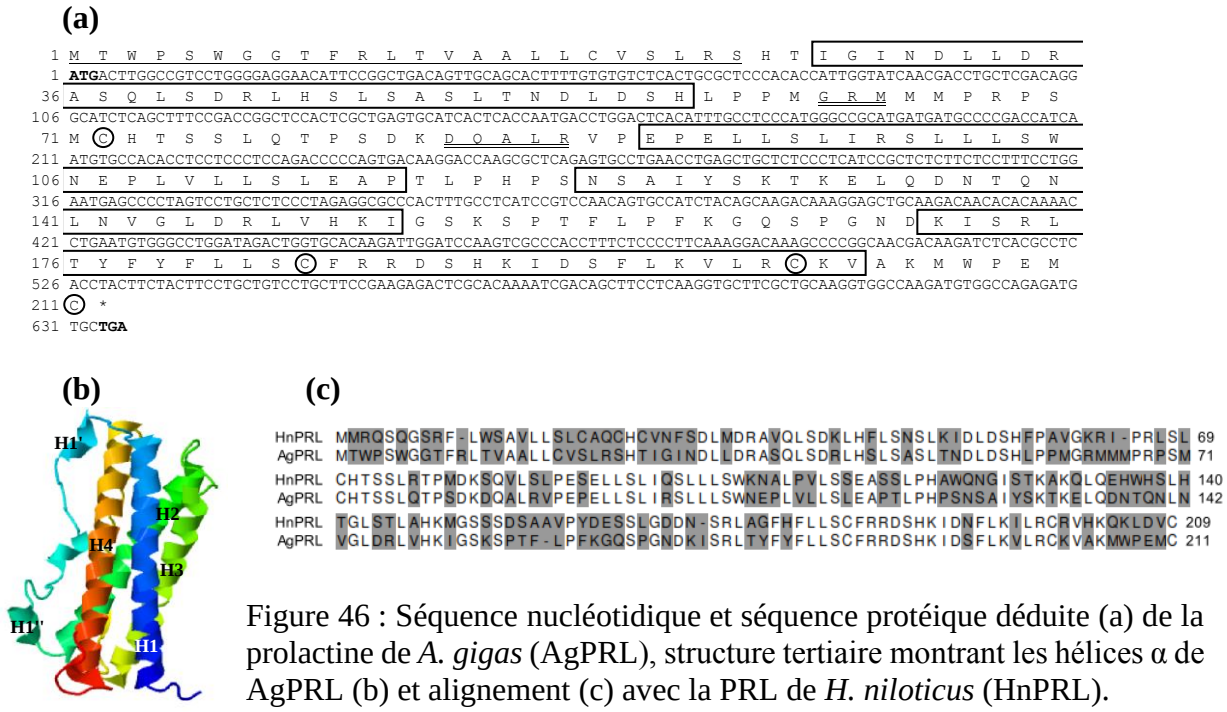


Figure 46 : Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite (a) de la prolactine de *A. gigas* (AgPRL), structure tertiaire montrant les hélices α de AgPRL (b) et alignement (c) avec la PRL de *H. niloticus* (HnPRL).
Dans la figure (a), le codon d'initiation et le codon stop sont en gras, le peptide signal est en souligné simple, les quatre hélices majeures (H1, H2, H3 et H4) disposées de façon successive sont dans des encadrés et les courtes hélices 1' (GRM) et 1" (DQALR) sont en souligné double. Dans la figure (c), les domaines peu conservés sont en gris.

Un transcrit de 423 paires de bases codant pour une protéine partielle de récepteur à la prolactine de 142 acides aminés a été identifié dans l'ovaire de *A. gigas* (**Figure 47a**). La PRLR partielle de *A. gigas* (AgPRLR) dépourvue du domaine transmembranaire (TM) et du domaine intracellulaire (IC) possède un peptide signal de 23 acides aminés et une séquence partielle du domaine extracellulaire (EC) de 118 acides aminés. Chez *H. niloticus* le transcrit complet de la PRLR de 1767 paires de bases codant pour une protéine de 589 acides aminés a été identifié et possède un peptide signal de 25 acides aminés suivi du domaine extracellulaire (EC) de 207 acides aminés, du domaine transmembranaire (TM) de 23 acides aminés et du domaine intracellulaire (IC) de 334 acides aminés. La séquence partielle AgPRLR a été alignée avec l'extrémité N-terminale de HnPRLR (**Figure 47b**) et leur identité en acides aminés est de 90,24%.

(a)

```
  1 M  W  K  H  P  G  A  L  L  I  L  S  L  L  A  F  V  V  L  C  C  S  C  L  S  P  P  G  K  P  R  L  T  S  C
  1 ATGTGGAAACACCCTGGAGCCCTACTGATACTCTCGCTGCTTGCCTTTGTGGTCCTGTGCTGTTCTTGTCTGTCTCCCCCAGGGAAGCCTCGGCTCACCAGCTGC
 36 R  S  P  E  K  E  T  F  T  C  W  W  E  P  G  S  D  G  G  L  P  T  N  F  S  L  F  Y  R  K  E  N  S  D  T
106 CGATCTCCTGAGAAAGAGACCTTCACCTGTTGGTGGGAGCCGGGCTCAGATGGTGGCCTGCCCACCAACTTCTCTCTCTTCTACCGCAAAGAGAATTCTGATACT
 71 V  F  E  C  P  D  Y  H  T  A  G  K  N  S  C  F  F  S  K  N  D  T  S  I  W  V  N  Y  N  I  T  V  V  A  T
211 GTCTTTGAGTGTCCAGACTATCACACTGCAGGAAAGAACTCCTGCTTTTTCAGCAAGAATGACACTTCAATTTGGGTTAATTATAACATCACTGTGGTGGCAACC
106 N  A  L  G  S  N  F  S  D  P  V  D  V  D  V  V  Y  I  G  E  L  L  L  S  C  S  P  A  H  S  A  A  I  F  N
316 AATGCCCTTGGGAGCAACTTCTCAGACCCTGTGGATGTGGATGTTGTGTACATTGGTGAGCTTCTGCTCAGCTGCTCTCCTGCTCATTCTGCAGCAATATTTAAT
141 H
421 CAC
```

(b)

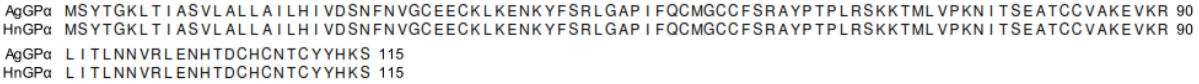
```
HnPRLR  MMWKDSGAPLILSLLVSVVLDSACLSPPGKPRLTSCRSPEKETFTCWWEPGLDGGLPTNYSLFYRKENSDSV 72
AgPRLR  M-WKHPGALLILSLLAFVVLCCSCLSPPGKPRLTSCRSPEKETFTCWWEPGSDGGLPTNFSLFYRKENSDTV 71

HnPRLR  YECPDYHTAGKNSCFFSKNDTSIWVNYNITVVATNALGSNFSDPVDVDVYYIVQ---PHTPENLTVVLEGEE 141
AgPRLR  FECPDYHTAGKNSCFFSKNDTSIWVNYNITVVATNALGSNFSDPVDVDVYYIGELLLSCSPAHSAAIFN--H 141
```

Figure 47 : Séquence nucléotidique partielle et séquence protéique déduite (a) du récepteur à la prolactine de *A. gigas* (AgPRLR) avec le codon d'initiation en gras, le peptide signal souligné suivi de la séquence partielle du domaine extracellulaire et alignement (b) avec l'extrémité N-terminale de la PRLR de *H. niloticus* (HnPRLR). Les domaines peu conservés sont en gris.

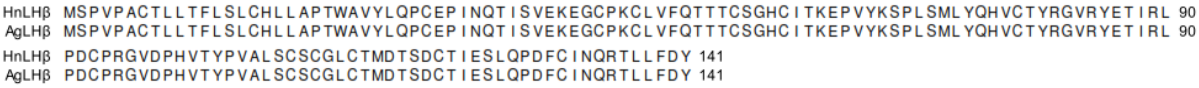
4.2.4 Les gonadotropines et leurs récepteurs

La comparaison des gonadotropines de *A. gigas* déjà décrites par Faria et al., (2013) et Sevilhano et al., (2017) avec celles de *H. niloticus* identifiées au cours de cette thèse montre que ces deux espèces ont une GPα (**Figure 48a**) et une LHβ (**Figure 48b**) identiques et leurs FSHβ (**Figure 48c**) partagent 85,6% d'identité en acides aminés. Les analyses *in silico* du transcriptome d'ovaire de *A. gigas* n'ont pas permis d'identifier les récepteurs de la FSH et de la LH.

(a)



(b)



(c)

Figure 48 : Alignement des séquences protéiques déduites des sous unités alpha de l'hormone glycoprotéique (GPα) (a), sous unités béta de la LH (b) et sous unité béta de la FSH (c) de *H. niloticus* (HnGPα, HnFSHβ et HnLHβ) et *A. gigas* (AgGPα, AgFSHβ et AgLHβ), les domaines peu conservés sont en gris.

La **Figure 49** présente la structure secondaire avec les différents domaines et les identités en acides aminés des séquences complètes identifiées à la fois chez *H. niloticus* et *A. gigas*.

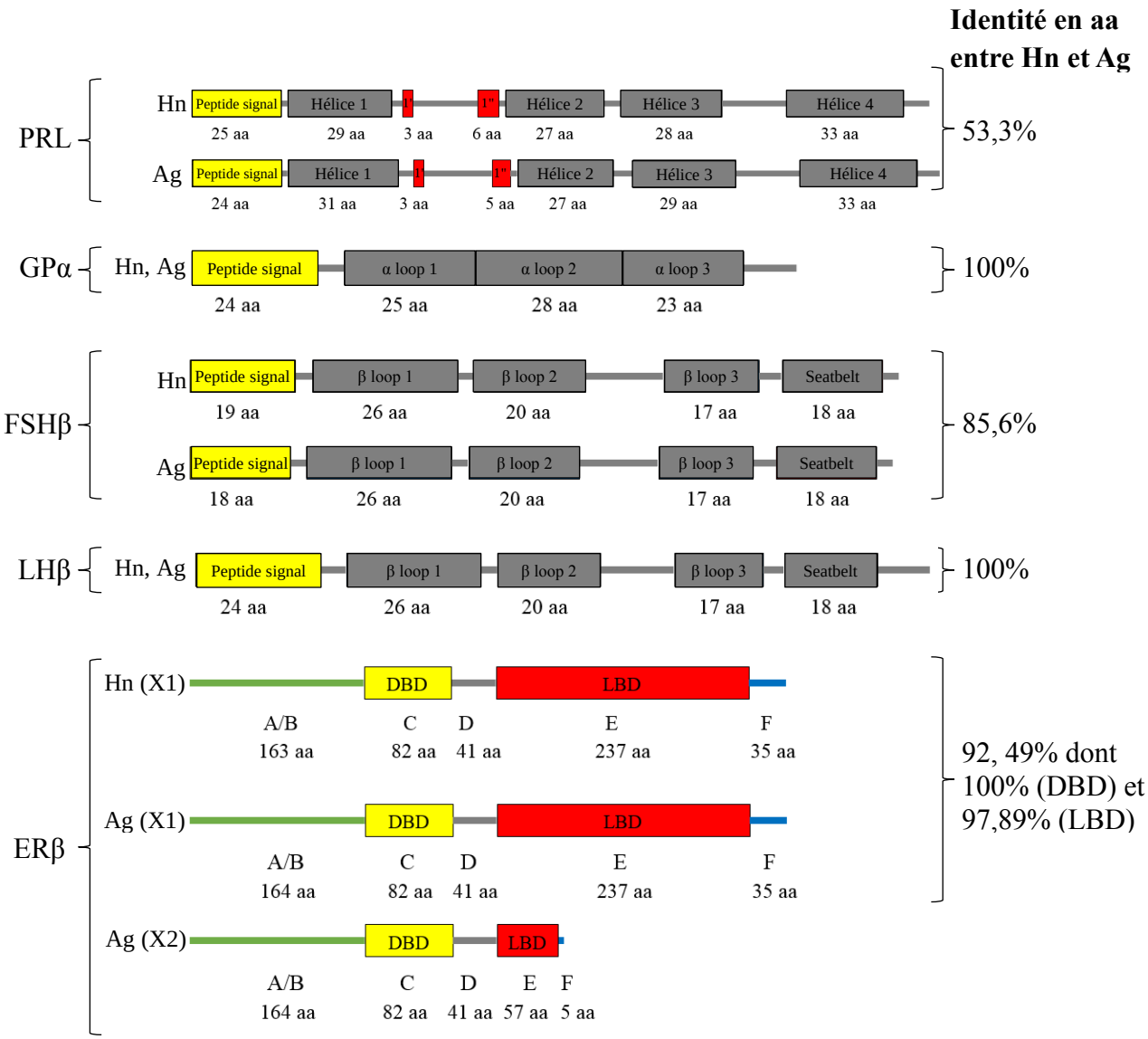


Figure 49 : Comparaison des structures secondaires avec les différents domaines et les identités en acides aminés (aa) de la prolactine (PRL), de la sous unité alpha de l'hormone glycoprotéique (GPα), de la sous unité béta de la FSHβ, de la LHβ et des récepteurs œstrogéniques béta (ERβ) de *H. niloticus* (Hn) et de *A. gigas* (Ag). Les ERβ ont un domaine N-terminal A/B qui contient la première fonction d'activation AF-1, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) ou domaine C, un domaine D de liaison aux corépresseurs, un domaine de liaison au ligand (LBD) ou domaine E et un domaine F en position C-terminale.

4.3 Phylogénie des acteurs impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation chez *H. niloticus* et *A. gigas*

Les arbres phylogénétiques ont été construits pour les séquences décrites de *H. niloticus* et *A. gigas* avec d'autres espèces de poissons. Les études réalisées par Faria et al., (2013) et Sevilhano et al., (2017) présentent des arbres phylogénétiques des sous unités α et β de la LH

de *A. gigas* qui sont identiques à celles de *H. niloticus*. Cependant, aucune autre espèce d'Ostéoglossiformes n'a été prise en compte. De nouveaux arbres phylogénétiques, intégrant l'Ostéoglossiformes *S. formosus* pour lequel les séquences des sous unités α et β de la LH et de la FSH sont disponibles sur le site de NCBI, ont donc été réalisés.

4.3.1 Sous unité commune α de la LH et la FSH (GPα)

L'arbre phylogénétique des séquences de GPα construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 50**. *H.* niloticus et *A. gigas* sont liés à *S. formosus* par un nœud fort (bootstrap = 96%). Ces Ostéoglossiformes apparaissent comme un groupe basal pour les autres espèces de téléostéens analysées.

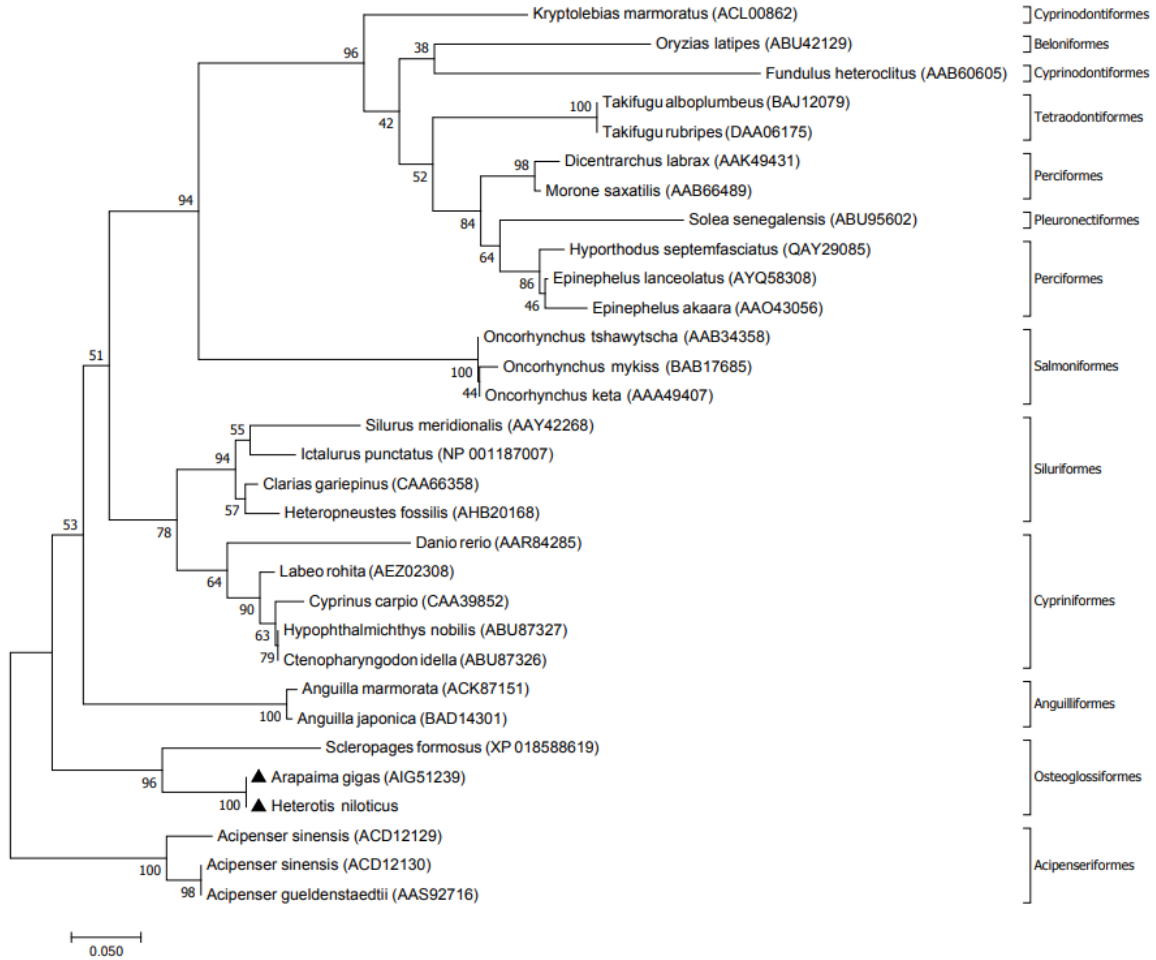


Figure 50 : Arbre phylogénétique de la sous unité alpha commune à la LH et la FSH (GPα) de 11 ordres et 30 espèces de poissons, basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit avec Mega 7 selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec deux espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des GPα de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identifiées par des triangles.

4.3.2 Sous unité β de la LH

L'arbre phylogénétique des séquences de LHβ construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 51**. *H.* niloticus et *A. gigas* sont liés à *S. formosus* par un nœud fort (bootstrap = 86%).

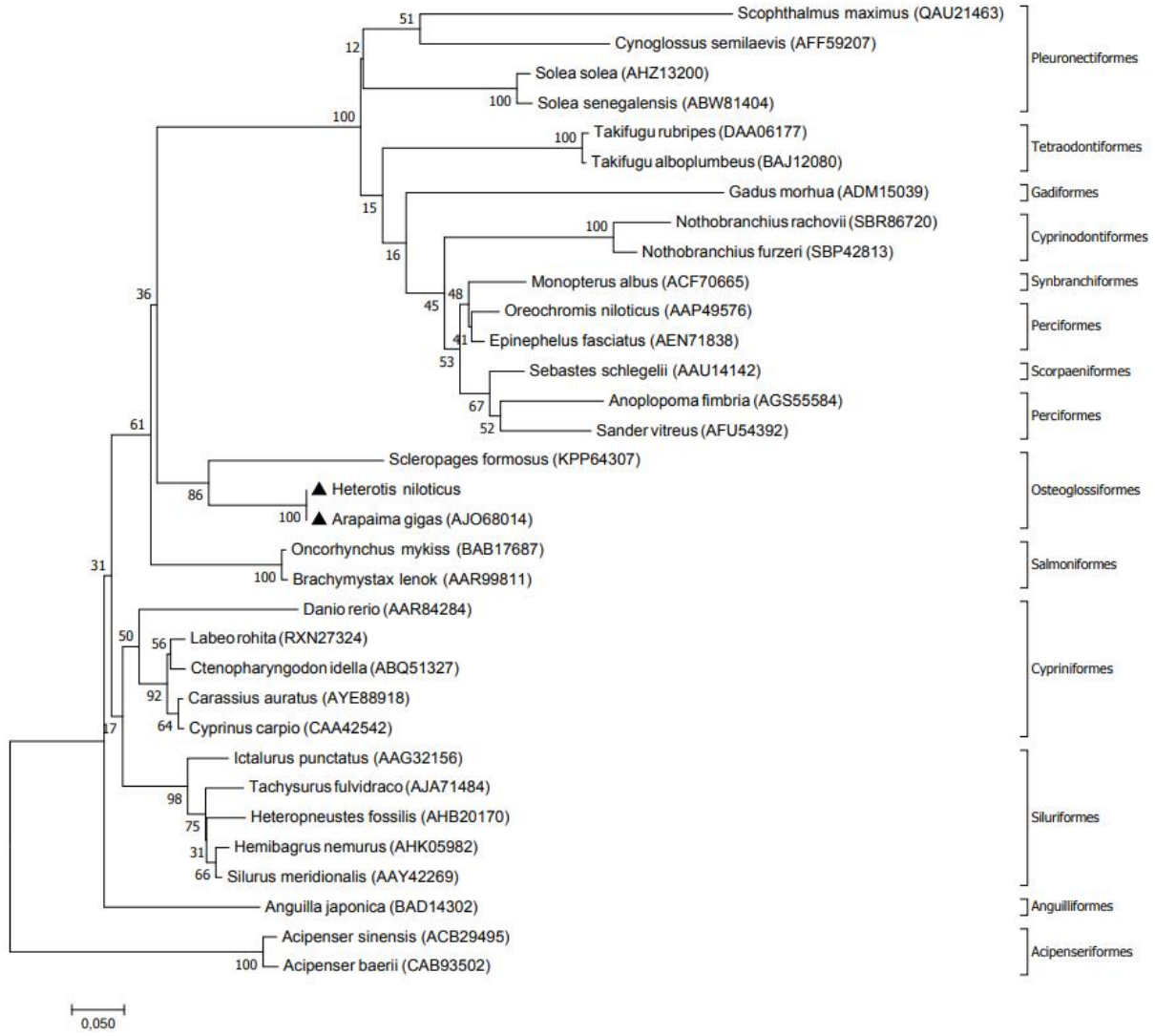


Figure 51 : Arbre phylogénétique de la sous unité béta de la LH de 13 ordres et 33 espèces de poissons, basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit avec Mega 7 selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec deux espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des FSHβ de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identifiées par des triangles.

4.3.3 Sous unité β de la FSH

L'arbre phylogénétique des séquences de FSHβ construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 52**. *H.* niloticus et *A. gigas* forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 97%) liés à *S. formosus* par un nœud fort (bootstrap = 99%). Ces Ostéoglossiformes apparaissent comme un groupe basal pour les autres espèces de téléostéens analysées.

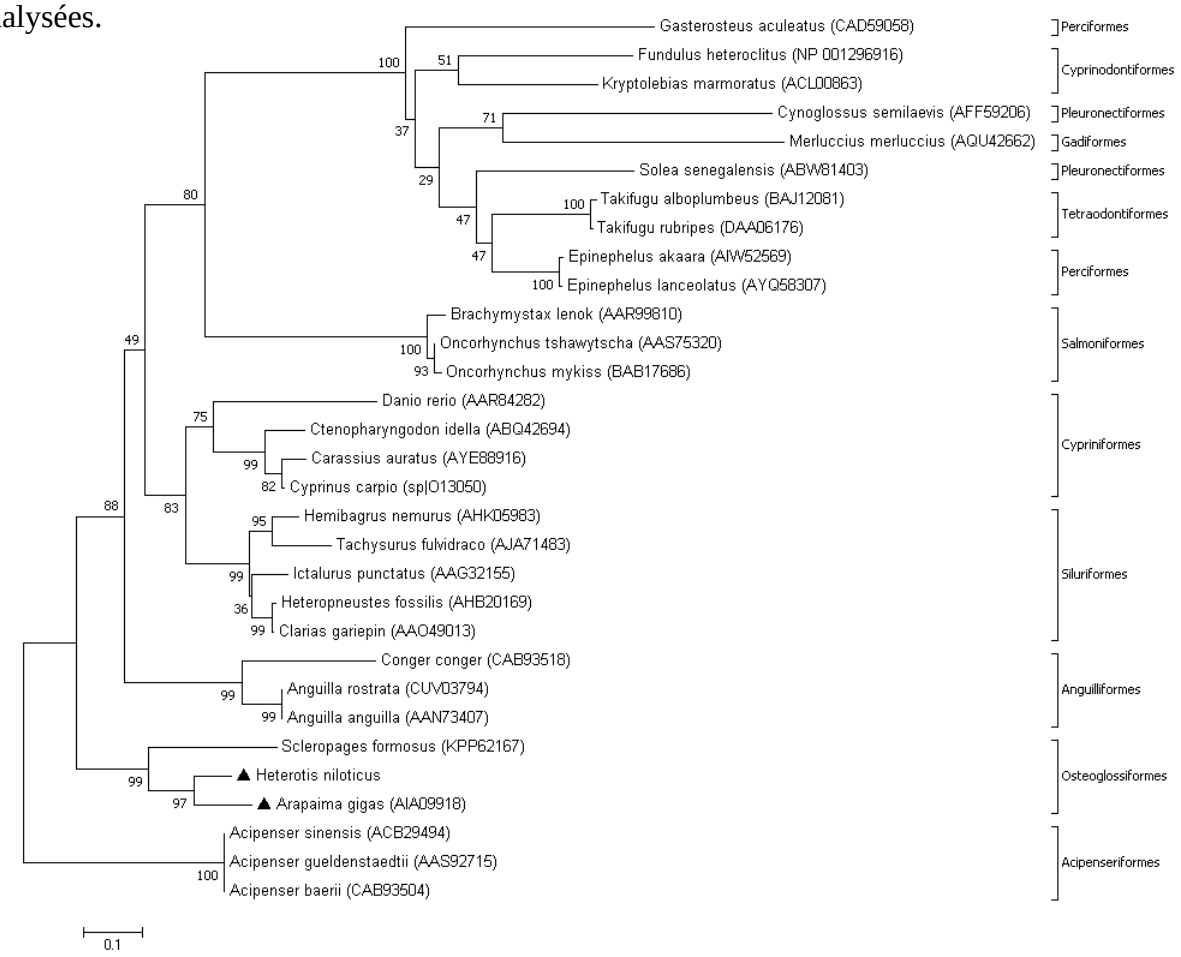


Figure 52 : Arbre phylogénétique de la sous unité béta de la FSH de 11 ordres et 31 espèces de poissons, basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit avec Mega 7 selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec trois espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des FSHβ de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identifiées par des triangles.

4.3.4 Récepteur de la FSH

L'arbre phylogénétique des séquences de FSHR construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 53**. *H. niloticus* et une autre espèce d'Ostéoglossiformes (*Paramormyrops kingsley*) forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 97%). Cet arbre ne prend pas en compte le FSHR de *A. gigas* qui n'a pas encore été décrit.

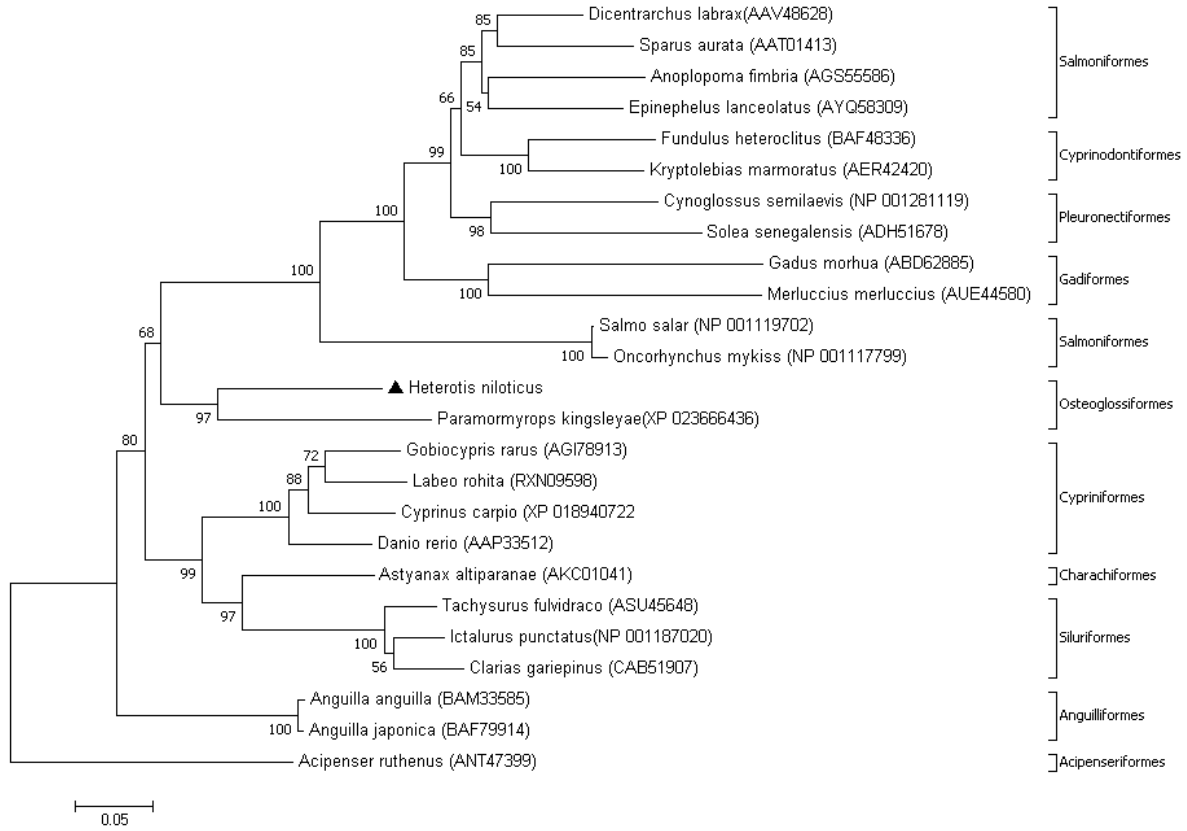


Figure 53 : Arbre phylogénétique du récepteur de la FSH (FSHR) de 10 ordres et 25 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit avec Mega 7 selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec trois espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. La position de FSHR de *H. niloticus* est identifiée par un triangle.

4.3.5 Récepteur de la LH

L'arbre phylogénétique des séquences de LHR construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 54**. *H. niloticus* et *S. formosus* forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 100%) au sein des Ostéoglossiformes. Cet arbre ne prend pas en compte le LHR de *A. gigas* qui n'a pas encore été décrit.

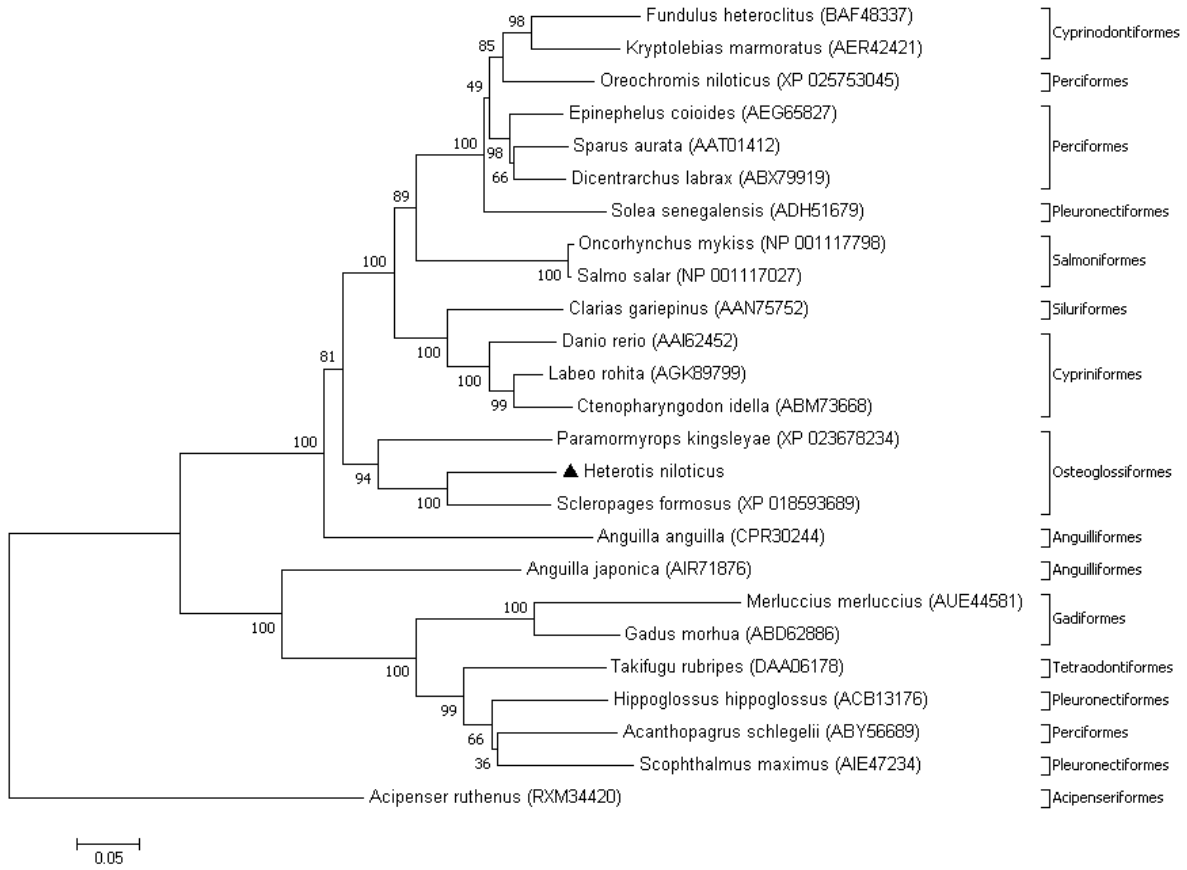


Figure 54 : Arbre phylogénétique du récepteur de la LH (LHR) de 11 ordres et 25 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit avec Mega 7 selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec une espèce non téléostéen de l'ordre des Acipenseriformes. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. La position de LHR de *H. niloticus* est identifiée par un triangle.

4.3.6 Prolactine

L'arbre phylogénétique des séquences de PRL construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 55**. *A. gigas* et deux espèces d'Anguilliformes forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 70%). *H. niloticus* et *S. formosus* forment un autre groupe fortement soutenu (bootstrap = 100%) qui apparait comme un groupe basal pour les autres espèces de téléostéens analysés.

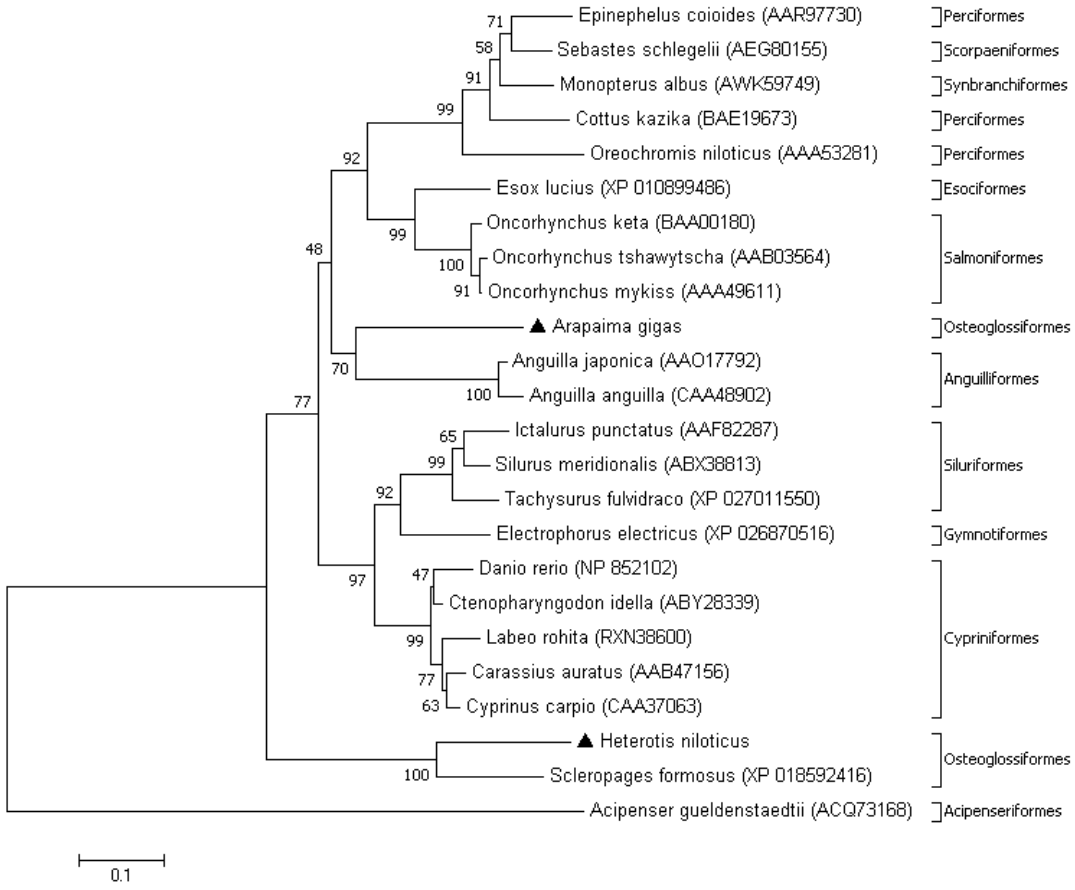


Figure 55 : Arbre phylogénétique de prolactine (PRL) de 12 ordres de poissons et 25 espèces basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec trois espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes avec Mega 7. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des PRL de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identifiée par des triangles.

4.3.7 Récepteur de la PRL

L'arbre phylogénétique des séquences de PRLR construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 56**. *H. niloticus* et *S. formosus* forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 100%). Les Ostéoglossiformes sont liés par un nœud fort (bootstrap = 97%) à une espèce d'Anguilliformes (*Anguilla japonica*). Cet arbre ne prend pas en compte le PRLR de *A. gigas* qui n'a pas encore été décrit.

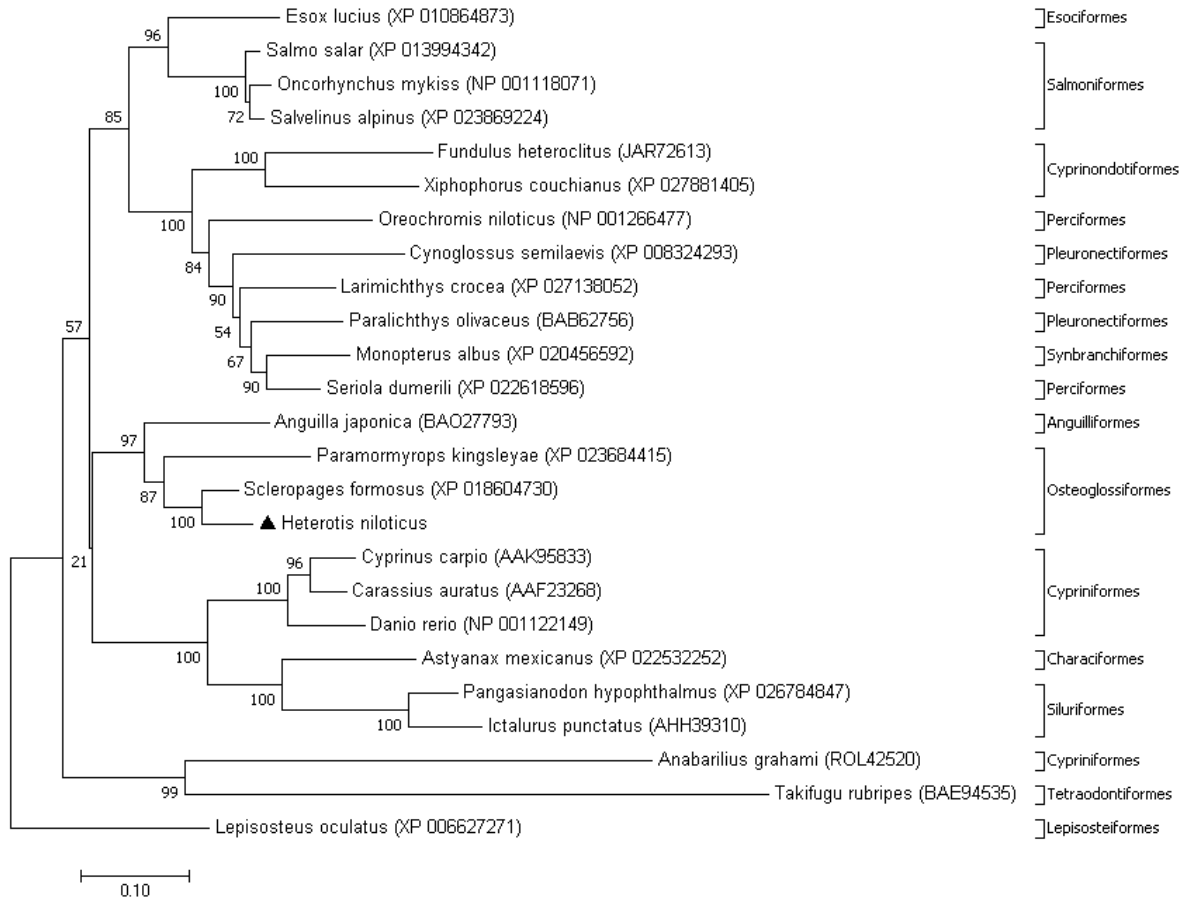


Figure 56 : Arbre phylogénétique de récepteurs de la prolactine (PRLR) de 13 ordres et 25 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec une espèce non téléostéen de l'ordre des Lepisosteiformes avec Mega 7. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. La position du PRLR de *H. niloticus* est signalée par un triangle.

4.3.8 Récepteur du 17ß-estradiol

L'arbre phylogénétique des séquences des ERs construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 57**. Les ERβ de *H. niloticus* et *A. gigas* forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 76%) et sont liés à deux autres espèces d'Ostéoglossiformes (*S. formosus* et *O. bicirrhosum*) par un nœud fort (bootstrap = 76%). HnERβ a une longueur de branche plus importante que AgERβ. Le groupe auquel appartiennent les ERβ de *H. niloticus* et *A. gigas* est lié au groupe auquel appartient HnERγ par un nœud moyen (bootstrap = 47%).

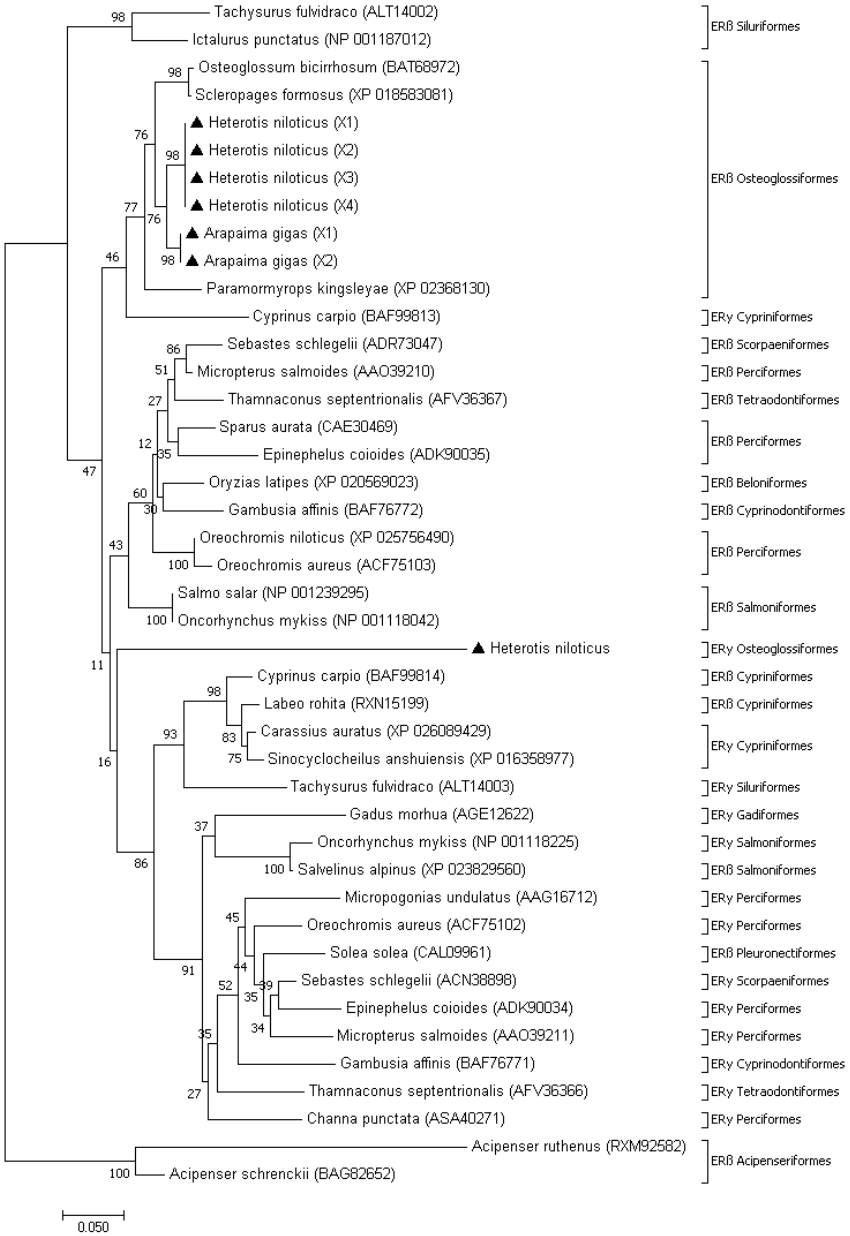


Figure 57 : Arbre phylogénétique de récepteurs œstrogéniques beta (ERβ) et gamma (ERγ) de 13 ordres et 31 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec deux espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes avec Mega 7. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des ER de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identifiées par des triangles.

4.3.9 Vitellogénine

L'arbre phylogénétique des séquences des récepteurs de la Vtg construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 58**. VtgB1 et VtgC de *H. niloticus* forment un sous-groupe fortement soutenu (bootstrap = 100%) au sein des trois Vtg hépatiques identifiées chez cette espèce. *H. niloticus* est lié par un nœud fort (bootstrap = 100%) à deux autres espèces d'Ostéoglossiformes (*S. formosus* et *O. bicirrhosum*). Cet arbre ne prend pas en compte les Vtg de *A. gigas* qui n'ont pas encore été décrites.

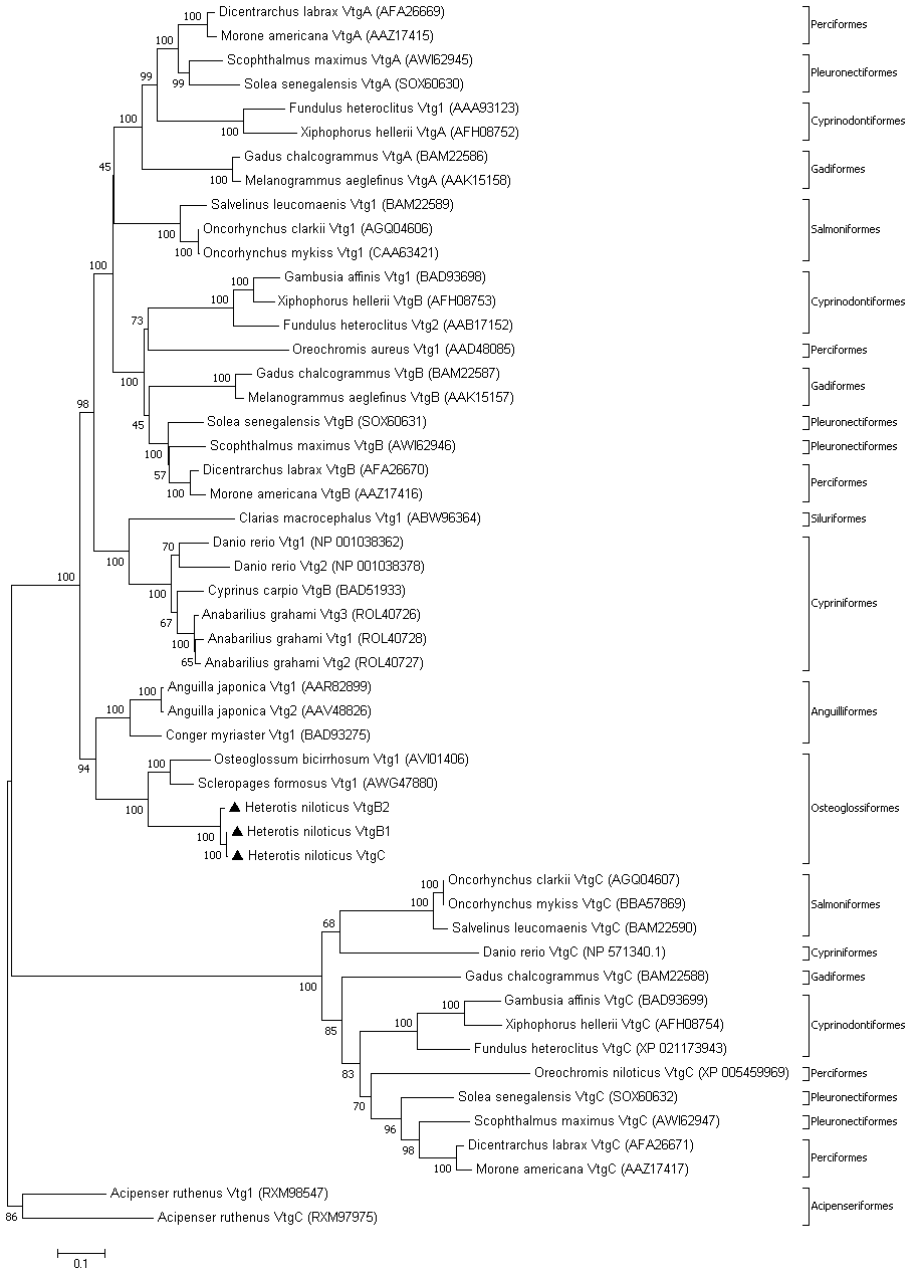


Figure 58 : Arbre phylogénétique de la vitellogénine (Vtg) de 10 ordres et 24 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec deux espèces non téléostéens de l'ordre des Acipenseriformes avec Mega 7. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des Vtg de *H. niloticus* sont signalées par des triangles.

4.3.10 Récepteur de la Vtg

L'arbre phylogénétique des séquences des récepteurs de la Vtg construit selon la méthode de Neighbor-Joining est présenté dans la **Figure 59**. *H. niloticus* et deux autres espèces d'Ostéoglossiformes (*S. formosus* et *O. bicirrhosum*) forment un groupe fortement soutenu (bootstrap = 99%). Cet arbre ne prend pas en compte le VLDLR de *A. gigas* qui n'a pas encore été décrit.

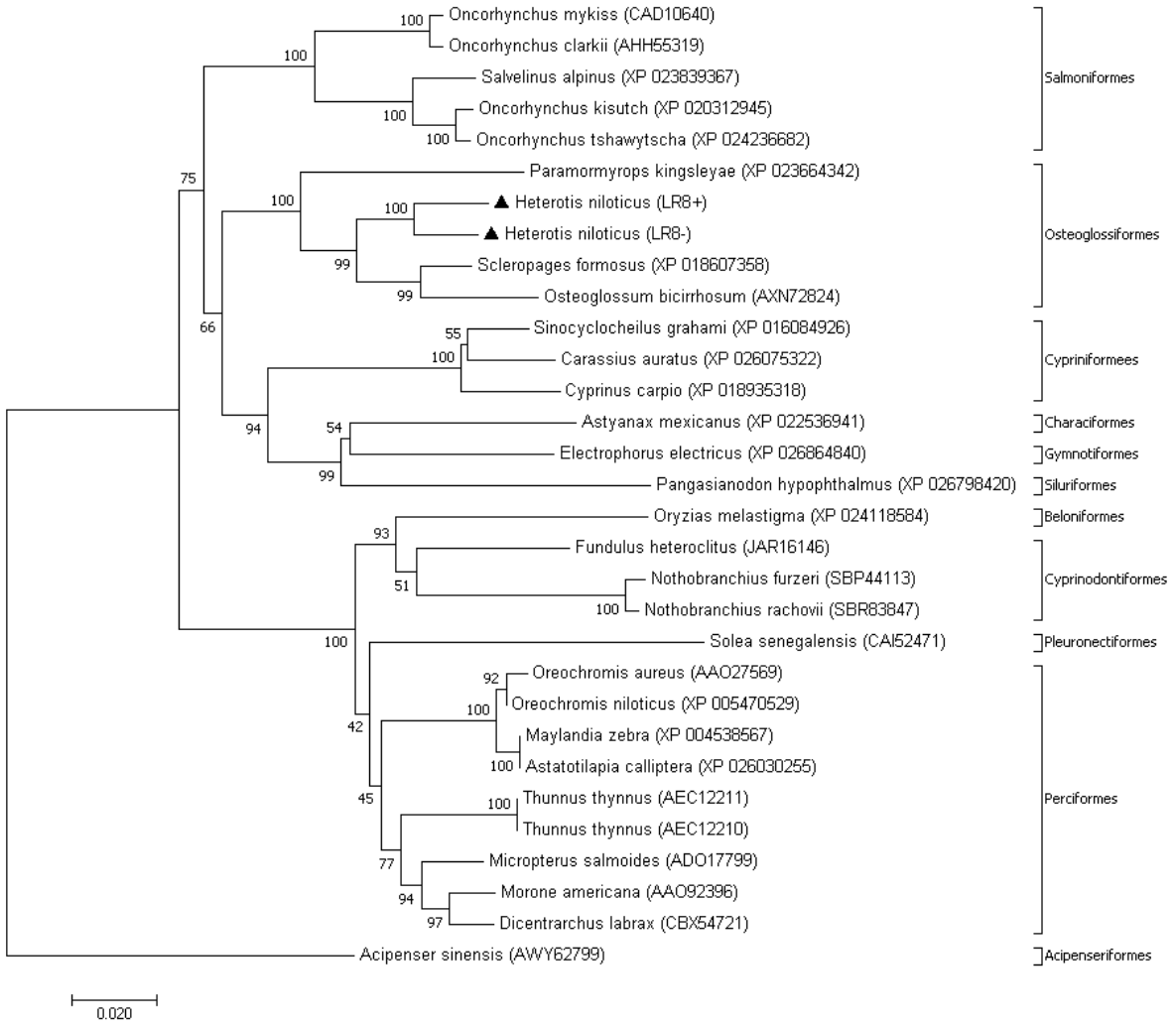


Figure 59 : Arbre phylogénétique de récepteurs de la vitellogénine (VtgR) ou lipovitelline de très basse densité (VLDLR) de 11 ordres et 19 espèces de poissons basé sur les identités en acides aminés. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining basée sur le modèle JTT avec une espèce non téléostéen de l'ordre des Acipenseriformes avec Mega 7. Les chiffres indiquent la robustesse du bootstrap avec 1 000 réplicas. Les positions des LR8+ et LR8- de *H. nilo*ticus sont identifiées par des triangles.

4.4 Discussion

Cette étude est la première à analyser la proximité phylogénétique de *H. niloticus* et *A. gigas* sur la base de données moléculaires impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation. Des études antérieures (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ; Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969) se sont appuyées sur d'autres types de caractères et des marqueurs moléculaires tels que les gènes mitochondriaux.

Les transcriptomes créés à partir de l'hypophyse, du foie et de l'ovaire n'ont pas permis d'identifier à la fois chez les deux espèces étudiées tous les acteurs moléculaires de la vitellogenèse et de sa régulation, limitant ainsi les comparaisons aux récepteurs œstrogéniques béta (ERβ), à la prolactine (PRL) et aux sous unités alpha et béta de la FSH et de la LH. Il est donc nécessaire de réaliser des études complémentaires pour identifier le reste des marqueurs moléculaires. Pour *H. niloticus*, il s'agit de ERα et la séquence complète de la Vtg ovarienne. Quant à *A. gigas*, les informations à rechercher portent sur les récepteurs des hormones hypophysaires (PLRR, FSHR et LHR), ERα, ERγ, les Vtg et leur récepteur. De nouveaux transcriptomes de foie et d'ovaire devront être réalisés chez *A. gigas* afin de disposer de données plus complètes. Ces tissus sont connus pour générer des échantillons d'ARN de qualité médiocre. Une attention particulière devra être appliquée aux prochaines extractions. Par ailleurs, la densité d'échantillons par ligne de séquençage devra être réduite afin d'obtenir une profondeur de séquençage aussi importante que possible.

Il a été démontré que la sous unité alpha commune à la FSH et à la LH (GPα) et la sous unité spécifique beta de la LH (LHβ) de *H. niloticus* et *A. gigas* sont identiques et leurs FSHβ partagent 85,6% d'identité en acides aminés. Ces résultats viennent confirmer la proximité phylogénétique de ces deux espèces d'Ostéoglossiformes qui se distinguent de *S. formosus*. Les gonadotropines étant utilisées en aquaculture comme inducteurs pour améliorer la reproduction de certaines espèces de poissons (Mehdi & Ehsan, 2013 ; Mylonas et al., 2010), cela suggère que la LH de l'une ou l'autre espèce est probablement capable d'induire une réponse fonctionnelle chez les 2 espèces étudiées.

On observe également que les ERβ de *H. niloticus* et *A. gigas* partagent une forte identité en acides aminés (> 92%) et ont une DBD entièrement conservée (100% d'identité en acide aminés).

Contrairement aux marqueurs moléculaires précédents, la PRL de *H. niloticus* et *A. gigas* partagent une identité en acides aminés moyenne (53,3%). Cette hormone hypophysaire qui participe à plusieurs processus physiologiques incluant la croissance, la reproduction et l'osmorégulation (Bu et al., 2015 ; Freeman et al., 2000 ; Manzon, 2002 ; Whittington & Wilson, 2013) peut être considérée comme l'un des biomarqueurs moléculaires pour différencier les deux espèces sœurs.

Sur la base des gonadotropines et des ERβ, *H. niloticus* et *A. gigas* affichent une forte proximité phylogénétique. Avec la PRL, *A. gigas* est plus proche phylogéniquement des Anguilliformes que de *H. niloticus* qui forme un groupe soutenu avec une autre espèce d'Ostéoglossiformes, *S. formosus*.

5. Conclusion

De nouvelles données moléculaires sur la vitellogenèse et sa régulation ont été obtenues pour *A. gigas* (les sous unités α et β de la FSH et la LH étant déjà décrites) mais demeurent non exhaustives. Il s'agit de la PRL, d'un transcrit partiel de PRLR et deux ERβ. Chez l'Ostéoglossiformes africain, *H. niloticus*, ces données sont décrites pour la première fois. Elles portent sur les hormones hypophysaires (PRL, FSH et LH) et leurs récepteurs ovariens (PRLR, FSHR et LHR), les récepteurs à l'estradiol α et γ, les vitellogénines de type B et C et leurs récepteurs. Il a été possible de définir la Vtg comme biomarqueur de sexage de *H. niloticus* à partir d'analyse en spectrométrie de masse d'extraits protéiques de sang et de mucus.

Ces résultats ont également permis de réaffirmer la proximité phylogénétique de ces deux espèces sœurs d'Ostéoglossiformes, mais également d'identifier des traits divergents marqués par leur PRL notamment.

Ces travaux peuvent être considérés comme une étape indispensable pour permettre une caractérisation fonctionnelle des molécules identifiées et pour une meilleure compréhension des caractéristiques partagées ou différenciées entre *H. niloticus* et *A. gigas* en vue de maitriser leur reproduction et leur élevage.

Cinquième partie

Sexage des individus matures de *H. niloticus* et suivi télémétrique du comportement reproducteur de *A. gigas*

1. Introduction

H. niloticus et *A. gigas* sont deux espèces d'Ostéoglossiformes qui ont une importance économique et socioculturelle dans leurs zones de distribution respectives (Adite et al., 2006 ; Ezekiel & Abowei, 2013 ; Odo et al., 2009 ; Santos et al., 2014 ; Schaefer et al., 2012). Cependant, depuis quelques années, leurs pêcheries sont surexploitées ; ce qui entraine un appauvrissement des populations sauvages (Bauchot et al., 1993 ; Castello et al., 2015 ; Oladosu et al., 2007). Pour faire face au déclin de ces espèces dans le milieu naturel, leur élevage en étang de pisciculture a été initié au cours des dernières décennies et l'on a même tenté des réintroduction dans leur habitat traditionnel (Kimou et al., 2016 ; Nuñez et al., 2011 ; Valladão et al., 2016 ; Yao et al., 2017).

Les difficultés rencontrées sont le faible taux de reproduction en captivité dues aux particularités anatomiques de l'appareil reproducteur et au comportement complexe des deux espèces sœurs (Carreiro et al., 2011 ; Chu-Koo et al., 2009). La reproduction est réalisée de façon spontanée dans des étangs en terre à la suite de la formation de couples. Chez ces espèces dépourvues de dimorphisme sexuel excepté en période de reproduction où une coloration plus importante est observée chez les mâles de *A. gigas* notamment en milieu naturel. La compréhension du comportement reproducteur en captivité nécessite au préalable un sexage des reproducteurs. Chez *H. niloticus*, il n'existe aucune méthode de sexage fiable (Oladosu et al., 2007) alors que pour *A. gigas*, un kit de sexage est disponible et un anticorps anti Vtg a été développé pour sexer par ELISA les individus en vitellogenèse (Chu-Koo et al., 2009 ; Dugué et al., 2008 ; Núñez & Duponchelle, 2009 ; Nuñez et al., 2011). Malgré cet outil de sexage, le faible nombre de couples de reproducteurs obtenus en captivité ne permet pas une production importante et prévisible d'alevins d'*Arapaima*.

Le but de ce travail était de mettre au point une méthode de sexage peu invasive pour *H. niloticus* avant d'envisager une étude du comportement reproducteur. Pour *A. gigas*, qui dispose déjà de méthodes de sexage fiables, il s'agit de mieux comprendre les interactions mâles-femelles au sein de couples en captivité pour améliorer le succès de la reproduction.

2. Démarche expérimentale

La détermination du sexe chez les poissons d'élevage est une étape importante pour constituer les stocks de reproducteurs nécessaires à la production d'alevins (Chu-Koo et al., 2009). Pour mettre au point, une méthode de sexage des individus matures de *H. niloticus*, des techniques peu invasives ont été testées (**Figure 60**). Ces techniques privilégient le prélèvement de sang ou de mucus pour réaliser :

- un test du kit de sexage de *A. gigas* ;
- un test de l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* et *O. bicirrhosum* ;
- un test d'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* produit dans le cadre de cette thèse ;
- une analyse en spectrométrie de masse pour détecter la présence de Vtg ou ses produits de clivage.

L'une des méthodes a été finalement utilisée pour sexer et constituer deux lots de reproducteurs de *H. niloticus* en vue d'une étude du comportement reproducteur.

Le travail réalisé chez *A. gigas* (**Figure 60**) a consisté à suivre par télémétrie acoustique le comportement reproducteur d'un lot de 10 femelles et 10 mâles qui ont pu être sexés suivant la technique définie par Chu-Koo et al. (2009). Le système de télémétrie utilisé est celui de Lotek MAP et le positionnement UMAP, Lotek Wireless Inc. qui utilise le code CDMA (code accès multiple par répartition), codage numérique qui permet la détection simultanée et le décodage de plusieurs émetteurs co-localisés.

Comme la turbidité de l'eau ne permet en général aucune observation directe ou les enregistrements vidéo pour leur localisation, le positionnement précis grâce au système ultrasonique permet de suivre au jour le jour les déplacements de chaque individu. Ce type de suivi à échelle précise permet de générer des informations, à des plages spatiales et temporelles détaillées, sur le comportement simultané de tous les poissons dans l'étang et leurs interactions (Baktoft et al., 2015 ; Cooke et al., 2013 ; Pincock et al., 2010).

Les reproducteurs (mâles et femelles) ont été équipés d'émetteurs ultrasoniques permettant d'enregistrer leurs mouvements (Farmer et *al.*, 2013 ; Pursche et *al.*, 2013 ; Villegas-Ríos et *al.*, 2013) grâce à un réseau de 8 hydrophones (WHS 3250D, LOTEK Inc.) installés dans l'étang expérimental. Au moins trois hydrophones sont nécessaires pour traiter le signal par une routine de triangulation hyperbolique (Begout & Lagardere, 1995). Ainsi, grâce aux coordonnées géographiques enregistrées, le suivi du comportement est réalisé.

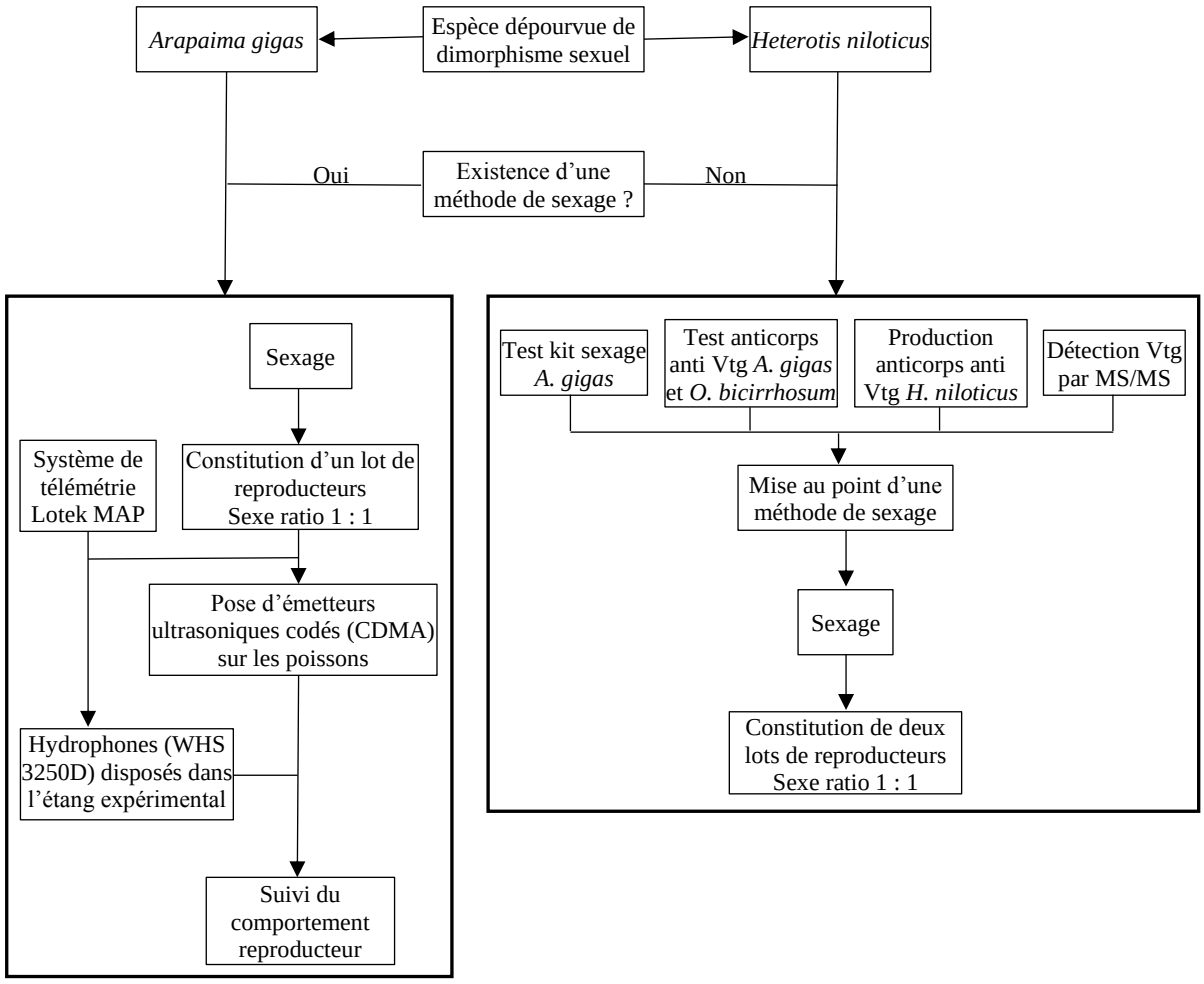
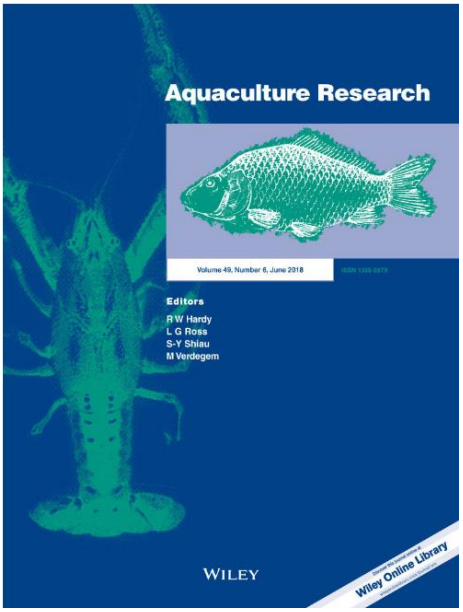


Figure 60 : Démarche suivie pour mettre au point une méthode de sexage de *H. niloticus* et réaliser une étude des interactions mâle-femelle de *A. gigas* par télémétrie ultrasonique.

3. Utilisation d'un réseau de télémétrie acoustique pour suivre le comportement reproducteur de *A. gigas* en captivité



L'étude du comportement reproducteur de *A. gigas* en captivité a fait l'objet d'un article publié dans la revue Aquaculture Research en 2018 intitulé « Use of an acoustic telemetry array for fine scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas*, breeders ».

Cet article décrit :

- la méthodologie de télémétrie Lotek (**Figure 61**) utilisée ;
- les données sur un couple formé, en guise d'exemple de l'adéquation de cette technique pour le suivi du comportement des poissons dans des environnements où la turbidité de l'eau ne favorise pas des observations directes ou des enregistrements vidéo.

La méthodologie Lotek est basée sur l'équipement de reproducteurs mâles et femelles (10 de chaque sexe) d'émetteurs ultrasoniques codés et sur leur suivi dans un étang contenant des hydrophones fixés sur des supports.

Les 20 poissons ont survécu et ont été suivis avec succès pendant une période de 6 mois, 24 heures par jour. Les données ont été téléchargées une fois par semaine à partir des huit hydrophones. En moyenne, un nombre maximum possible de 17 280 enregistrements par individu et par jour correspondant à une détection toutes les 5 s est obtenu, soit l'intervalle des impulsions des émetteurs.

Un seul émetteur positionné approximativement au centre de l'étang, qui est théoriquement la meilleure position de détection par le réseau d'hydrophones, a été utilisé pour tester la précision des positions calculées par le package U-Map.

La détection de l'efficacité du réseau d'hydrophones a été analysée à l'aide du logiciel Qgis 2.12 (Equipe de développement QGIS, 2016. Système d'information géographique QGIS. Projet Open Source Geospatial Foundation. Http://www.qgis.org/) en traçant les positions non filtrées calculés par U-Map puis filtrées suivant la forme de l'étang. Toutes les positions figurant hors de l'étang ont été éliminés. Un autre filtre a ensuite été appliqué pour éliminer les points successifs séparés par une distance supérieure à celle obtenue avec une vitesse de déplacement > 5 km / h, soit la vitesse moyenne maximale observée lors des tests précédents.

Les données filtrées avec le logiciel QGIS ont été traitées à l'aide de macros R afin de générer par interpolation les positions manquantes et de définir une séquence de données synchronisées dans le temps pour les déplacements mâle et femelle. Le pas de temps retenu entre deux positions successives a été fixé à 30 s afin de réduire le nombre de données pour chaque calcul.

Les données synchronisées dans le temps obtenues avec le logiciel R sont formatées pour être analysées avec OpenJump. L'interaction des poissons mâles et femelles a été déterminée en utilisant la méthodologie du domaine vital (Vokoun, 2003 ; Worton, 1989). Les calculs du domaine vital ont été effectués à l'aide du progiciel Horae (Steiniger & Hunter, 2012) pour OpenJump (Steiniger & Bocher, 2009). Le processus de réduction des données (toutes les 30 s) n'a pas sensiblement altéré la précision. L'estimation de la densité du noyau (KDE) est déterminée avec une probabilité de 95%. Cela signifie que 95% des positions se situent dans la zone de couverture d'origine calculée.

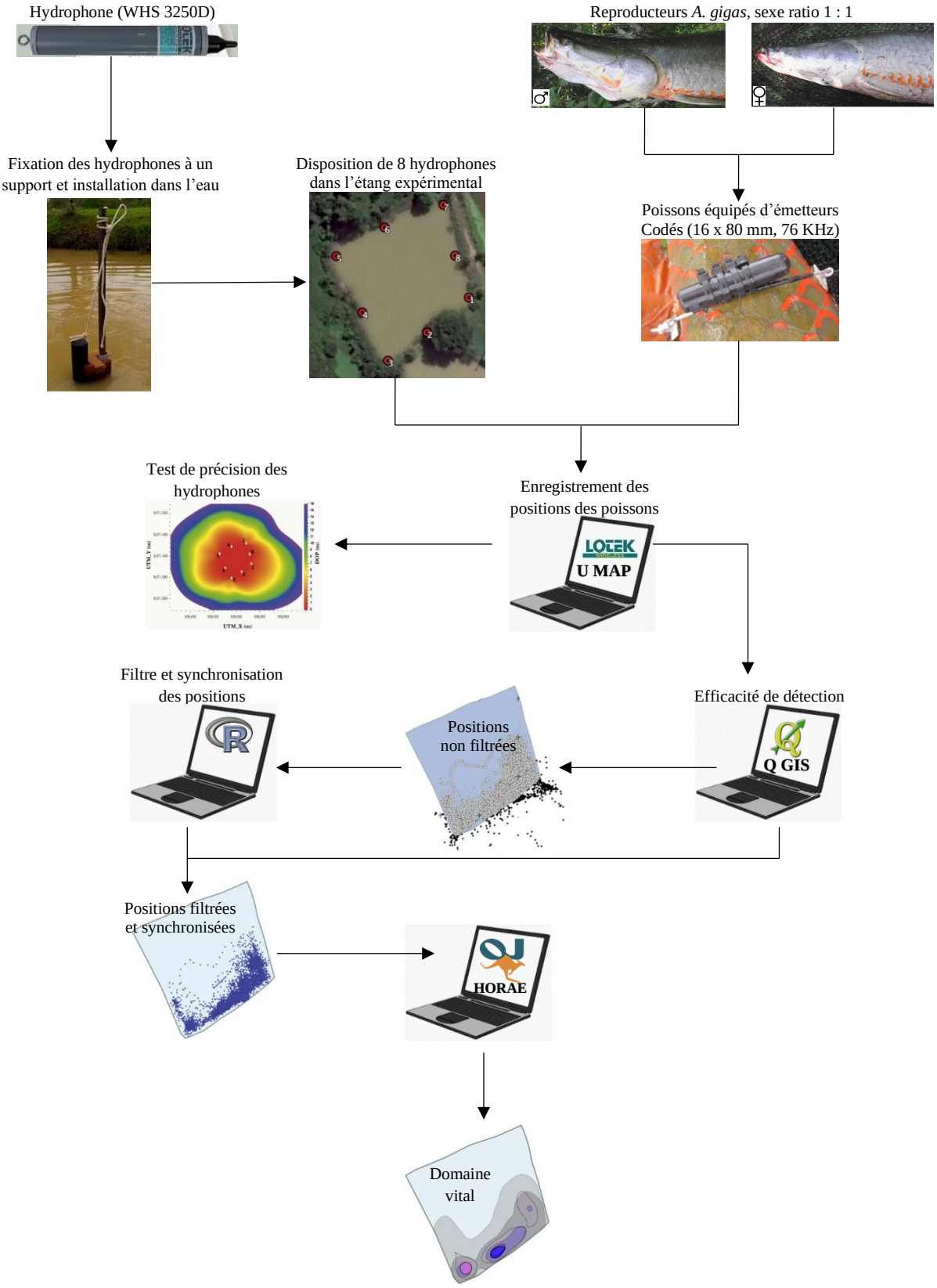


Figure 61 : Méthodologie de télémétrie Lotek utilisée pour étudier le comportement reproducteur de *A. gigas*.

DOI: 10.1111/are.13692

ORIGINAL ARTICLE

WILEY Aquaculture Research

Use of an acoustic telemetry array for fine scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas*, breeders

Jesús Núñez-Rodríguez[1,2] | Antonia Vela Díaz[3] | Roger Bazan-Albitez[3] | Carmela Rebaza Alfaro[3] | Daniel Koua[1] | Lucie Núñez[2] | Baptiste Testi[4] | Jean-François Renno[1,2] | Fabrice Duponchelle[1,2] | Hervé Pella[5]

[1]Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR BOREA - MNHN, CNRS-7208, UPMC, UCBN, IRD-207), Montpellier, France

[2]Laboratoire Mixte International - Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI - EDIA), Montpellier, France

[3]Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Pucallpa, Perú

[4]DYNAM, IRSTEA, Villeurbanne, France

[5]RECOVER, IRSTEA, Aix-en-Provence, France

Correspondence
Jesús Núñez-Rodríguez, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR BOREA - MNHN, CNRS-7208, UPMC, UCBN, IRD-207), Montpellier, France.
Emails: Jesus.Nunez@ird.fr and nunez@ird.fr

Funding information
Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, Innóvate-Perú; Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

Abstract

As *Arapaima gigas* is one of the most valuable species for the growing production of Amazonian aquaculture, knowledge of its reproductive behaviour and its application to increase reproduction success in captivity is of great importance as no hormonal spawning induction technique exists for this species. An acoustic positioning system (LOTEK Inc.) was used to observe the interactions of adult fish to better understand the formation of mating pairs. Fish were placed in a 4,500 m^2 aquaculture pond over a 6-month period in the IIAP field station of Pucallpa, Perú. This paper describes the methodological protocols used to set up and test the hydrophone array and presents the methodology used for the analysis of the huge amount of collected data. This methodology is illustrated by the analysis of a 6-day period for a mating pair that showed a spawning event. The results indicated that male and female occupied mostly one preferential area in one pond edge where the nesting area is located. Different activity patterns were observed during the spawning event, with male and female being closer during the spawning day. The results also showed that male travelled less distance than female during the studied period. Finally these results demonstrated the suitability of such equipment to monitor fish interactions at fine spatial (sub meter) and temporal (5 s) scales in confined environments like aquaculture ponds.

KEYWORDS
accoustic telemetry, *Arapaima*, fine scale positioning, paiche, reproductive behaviour

1 | INTRODUCTION

Arapaima gigas is an air-breathing, giant fish of the Amazon basin and the largest scaled freshwater fish in the neotropics with over 3.5 m and 250 kg. In spite of the tremendous economic and cultural importance of this species in the Amazon ragion, behavioural studies of this species are scarce. As *A. gigas* has been over-exploited for decades (Castello, Arantes, McGrath, Stewart, & Sousa, 2015), the natural populations are now seriously depleted and the species is listed in CITES Appendix II as an endangered species (CITES, 2018) and IUCN Red List of Threatened Species as a data deficient species (IUCN, 2017). This situation has led to introduce in many areas *A. gigas* into lagoons and ponds for aquaculture purposes to face the decline of wild populations and it was hoped that it would adapt to pond culture environment. One of the first difficulties encountered was the low reproduction rate in captivity as there was no artificial propagation technique for this species because of its complex behaviour and anatomical characteristics of the reproductive system

 © 2018 John Wiley & Sons Ltd

(Chu-Koo et al., 2009). Fry production relies only on spontaneous reproduction in earthen ponds after one or more pairs have formed. Under these conditions, the current production of fry remains low because of the few number of pairs formed in captivity. The purpose of our work is to better understand male–female interactions in captive pairs to improve reproductive success. Direct observation or video recordings are not possible in this earthen pond environment, the transparency of which rarely exceeds 20 cm, so we looked for other indirect means, like ultrasonic telemetry, that nevertheless allowed a precise spatiotemporal follow-up of several individuals at the same time.

Remote tracking of mobile aquatic animals in water bodies with limited visibility is the best technique to study individual movements or behaviour, social interactions and territory extension of each individual or group using generally the home range proxy (Vokoun, 2003; Worton, 1989). It is critical to know the locations of individuals over a significant period of time with the greatest possible accuracy when studying interactions between individuals, habitat preferences or reproductive behaviour. Such studies are generally based on radio telemetry (Baras, 1998; Koehn et al., 2009; Núñez-Rodríguez et al., 2015; Økland, Thorstad, Hay, Næsje, & Chanda, 2005). With manual positioning, animal detection is performed with the aid of a receiver and a "Yagi"-type antenna in the case of radio transmitters or with a hydrophone operated from a boat. Once located, coordinates of a transmitter are registered using a GPS receiver. With automatic positioning systems, the detection of transmitters is performed automatically with a few antennas or hydrophones strategically positioned and connected to data loggers, which record time and transmitter code detected the by antenna or hydrophone. The manual methods are used mainly when continuous monitoring and high accuracy or resolution of the position of more than one individual at a time is not required.

In studies that require precise positioning (at meter range or less) an array of several transmitters is necessary to obtain a coarse detection network associated with calculation systems by triangulation. In aquatic environments, this can only be done with a system of ultrasonic coded transmitters and a network of hydrophones.

Technical and miniaturization improvements have permitted the development of ultrasonic telemetry equipment in aquatic environments (Crossin et al., 2017; Hussey et al., 2015) or GPS system in aerial or terrestrial studies, which allow a much higher positioning frequency (Abecasis, Bentes, Lino, Santos, & Erzini, 2013; Bellquist, Lowe, & Caselle, 2008; Binder, Holbrook, Hayden, & Krueger, 2016; Binder et al., 2017; Espinoza, Farrugia, Webber, Smith, & Lowe, 2011; Espinoza, Heupel, Tobin, & Simpfendorfer, 2016; Farmer, Ault, Smith, & Franklin, 2013; Lowe, Topping, Cartamil, & Papastamatiou, 2003; Martins et al., 2014; Mason & Lowe, 2010; Pursche, Suthers, & Taylor, 2013; Semmens, 2008; Simpfendorfer, Heupel, & Hueter, 2002; Topping, Lowe, & Caselle, 2006; Villegas-Ríos et al., 2013).

In aquatic environments this technology is based on sound speed propagation in water (approx. 1,500 m/s at 25°C) where 1 m corresponds to 0.6 millisecond transmission delay.

At least three hydrophones are necessary to process the signal by an hyperbolic triangulation routine (Bégout & Lagardère, 1995). The best accuracy is obtained when the transmitter is equidistant from three hydrophones. Due to these characteristics, the design of the hydrophone network will depend mainly on the size and shape of the water body in which the fish movements are studied. Reception strength will also depend on some parameters such as soil type and vegetation, water stratification and acoustic noise that can generate reverberations of ultrasonic waves (Pincock & Johnston, 2012). Distance between hydrophones will depend on the hydrophone characteristics and the power of the transmitters used. An approximate range of 100–200 m to several kilometres depending on the chosen systems and topography of the water body is generally admitted.

This type of fine scale monitoring is expected to generate information, at detailed spatial and temporal ranges, on simultaneous behaviour of all fish in the pond and their interactions (Baktoft et al., 2015; Cooke et al., 2013; Pincock, Welch, McKinley, & Jackson, 2010). This paper describes the methodology used and the positioning accuracy within the hydrophones array as well as some data on a specific pair as an example of the suitability of this technique for monitoring fish behaviour in such environments. We expect that the information collected with this system will allow a better understanding of *A. gigas* reproductive ethology, which can contribute to improve management of captive breeding stocks.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study area

All individuals were placed together the same day in a sub-square 4,500 m^2 and 1 m average depth aquaculture earthen pond at the IIAP research station of Pucallpa, Peru (Figure 1). These ponds represent the typical breeding environments used by local fish farmers to manage *A. gigas* reproduction in captivity.

2.2 | Fish

Twenty adult *A. gigas* specimens, 10 females and 10 males of 5–6 year-old, born in captivity were selected for this study and gender was determined using the specific *Arapaima* sexing technique (Chu-Koo et al., 2009). At the same time each fish was permanently identified by an 11 mm Pit Tag injected with an appropriate syringe in the medio-anterodorsal musculature for posterior identification. All fish used were sexually mature and size and weight ranged from 144 to 188 cm TL and 26 to 65 kg respectively.

2.3 | Fish transmitter implantation

Transmitters (16 × 80 mm, 76 KHz) weighing 35 g (MM-M- 16-50-PM, LOTEK Inc.) were attached externally according to the technique described previously for radio transmitters of similar size and weight (Núñez-Rodríguez et al., 2015). Briefly, a stainless steel

FIGURE 1 Aerial view (Google © DigitalGlobe 2016) of the zone where the experimental pond (8°24′02″S–74°38′26″W) is situated and positions of the eight hydrophones (numbered circles) forming the array inside the pond

plastic coated cable was inserted using an adapted needle near the dorsal fin after local anaesthesia with 0.5% lidocaine (0.5 ml on each side), and transmitter were fixed to the cable with plastic clamps. The needles and cables were previously sterilized with 70% ethanol and an anti-bacterial solution (10% Povidone) was applied on the injection sites. The whole tagging procedure lasted less than 2 min. The manipulation did not alter fish behaviour notably since fish recovered a normal quiet swimming immediately after their release in the experimental pond.

2.4 | Hydrophones array geometry

Eight hydrophones (WHS 3250D, LOTEK Inc.) have been immersed at the periphery of the 4500 m^2 square-shaped pond (Figure 1), fixed on metal poles (3 cm in diameter, 2 m long) placed approximately every 25 m and 1 m away from the shoreline. The average depth of the pond varied from 0.8 m at the shoreline to 1.20 m in the central area with a relatively smooth muddy bottom. Hydrophone antennas were placed approximately 50 cm above the bottom of the pond and 30–50 cm from the water surface depending on water depth at each location. The exact coordinates of each hydrophone and pond-shoreline were determined using a sub meter GPS (Trimble GeoExplorer 6000 XH 3.5G) giving a position accuracy of approximately 30 cm according to manufacturer's indications.

3 | RESULTS

All 20 adult fish implanted with acoustic transmitters survived and were tracked successfully for a 6 month-period, 24 hr a day. Data were downloaded from the eight receivers located at the periphery of the pond (Figure 1) on a weekly basis. In average, from a maximum possible number of 17,280 bearings per individual and per day corresponding to one detection every 5 s which was the pulse interval of transmitters, 11,500 ± 2,800 bearings were recorded, representing a detection efficiency of 66.55%. Over the 6 months monitoring, an average of 2,070,000 ± 504,000 bearings were recorded for each individual. The data processing methodology is described hereafter to illustrate the behavioural assessment of the single mating pair that showed a spawning event during this period (data correspond to a 6-day period from which only 2.5 days were analysed in detail).

3.1 | Array accuracy

A single transmitter positioned approximately in the centre of the pond, which is theoretically the best detection position by the array (Figure 2), was used to test the precision of the positions calculated by the U-Map package. The transmitter was maintained 50 cm above the bottom of the pond and approximately 40 cm from the water surface. Bearings calculations were possible only when at least three hydrophones received the tag signal. The positions were recorded every minute for 1,378 successive positions (Figure 3). The results showed that bearings were not exactly randomly distributed around the mean position of the transmitter as standard deviations on both axes, calculated on average position, were slightly different (*x* axis ± 0.65 cm *SD*; *y* axis ± 0.56 cm *SD*). A preferential distribution in the W-SW to E-NE direction was observed (r^2 = .13, n = 1378).

3.2 | Detection efficiency

Detection of hydrophone array efficiency was analysed using Qgis 2.12 package (QGIS Development Team, 2016. QGIS Geographic

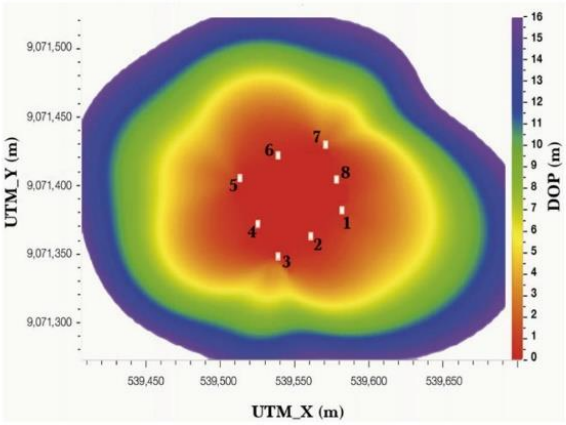


FIGURE 2 Dilution of precision (DOP) of the hydrophone array as calculated by Lotek's U-Map software (right axis). Hydrophone positions are given in UTM (Universal Transverse Mercator) system (in meters). Numbers correspond to the location of the eight hydrophones of the array. Pond limit is indicated by a solid line

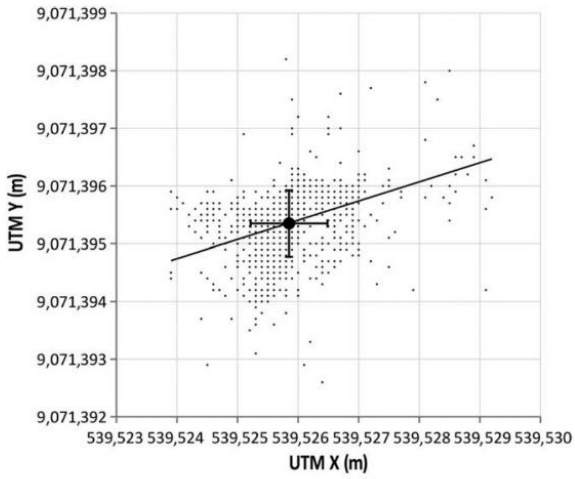


FIGURE 3 Precision of acoustic telemetry array. Data represent the coordinates recorded every minute (n = 1,378) of a single transmitter (not all points are visible due to overlapping) positioned approximately at the middle of the pond, 50 cm above the bottom. Solid black circle corresponds to the average position (± standard deviation error bars) and black line represents the linear regression over all bearings ($y = 0.33X + 8.89.\ 10E6$, $R^2 = .14$). Axes values are expressed in meters using UTM system.

Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://www.qgis.org/) by plotting unfiltered bearings calculated by U-Map and then filtered by pond shape. All bearings falling out of the pond area were discarded (Figure 4). Another filter was then applied to eliminate successive points that were separated by a distance higher than that obtained with a displacement speed >5 km/hr which was the maximum average speed observed in previous tests. During this 2.5-day monitoring period, from a total of 38,558 bearings recorded, 6.4% (pond shape filter) and 1.1% (speed filter) of the calculated positions were discarded for this male. Similar procedure applied to six other fish bearings allowed us to calculate that recorded bearings represented more than 90% of real positions (90.3 ± 2.8%). Please note that due to overlapping specially in the pond area all points are not visible.

3.3 | Space occupation and activity

Interaction of male and female fish was first determined using the home range methodology. The filtered data by pond shape and speed filter (Figure 5a,b) were processed using a R macro to set a time-synchronized data sequence for male and female bearings and then formatted for OpenJump import filter. The fixed time here between two successive positions was set at 30 s in order to lower the number of data for each calculation run. Home range calculations (Figure 5c,d) have been performed using Horae (Steiniger & Hunter, 2012) package for OpenJump (Steiniger & Bocher, 2009). The data reduction process (one bearing per 30 s) did not significantly alter the accuracy (results not shown). In Figure 5c,d grey shaded areas represent the Kernel density estimation (KDE) at 95% of probability. This means that 95% of the bearings fall into the calculated home range area. In this particular case the two fish (male and female) were mostly present only in one edge of the pond, the female showing a higher displacement activity than the male. The same technique was applied for 50% and 10% probabilities of presence (Figure 6). Both fish spent most of their time on two specific areas in one edge of the pond where two nests were detected. But in only one occasion during the 2.5 day period, male and female travelled simultaneously all around half of the pond area very closely (Video S1) and then returned to the nesting zone (Figure 7). We do not know if spawning took place before or after this particular behavior observed only once during this survey. The straight travelling line for the female corresponded to interpolated trajectories for the time where no detections were received by hydrophones. The travelled distance during the 6-day period was higher for female (22,813 m) than for male (12,804 m) indicating that male spent more time around the nesting area than the female (Figure 7).

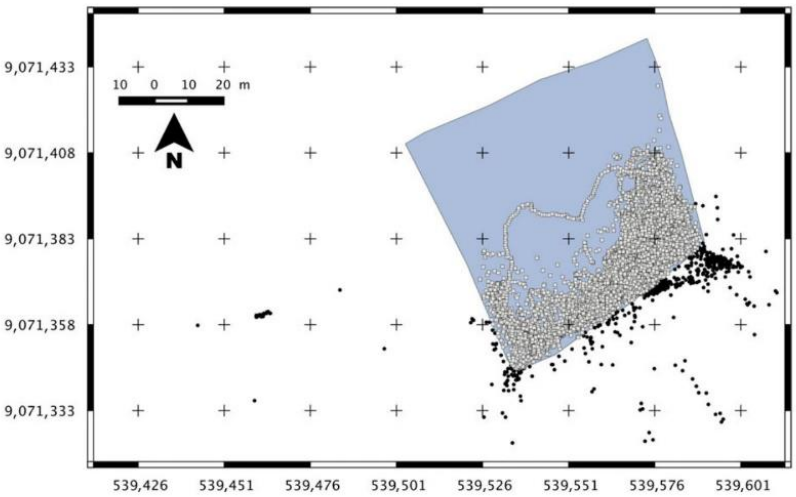


FIGURE 4 Detection efficiency of the 8-hydrophone array. Coordinates are expressed in meters using the UTM system. Data correspond to the bearings of a male *Arapaima gigas*. Black dots represent unfiltered bearings (n = 30,558); grey squares represent filtered bearings (n = 28,603) by pond shape (blue background). Out of pond points (n = 1,955) represented 6.4% of total bearings. Not all points are visible due to overlapping

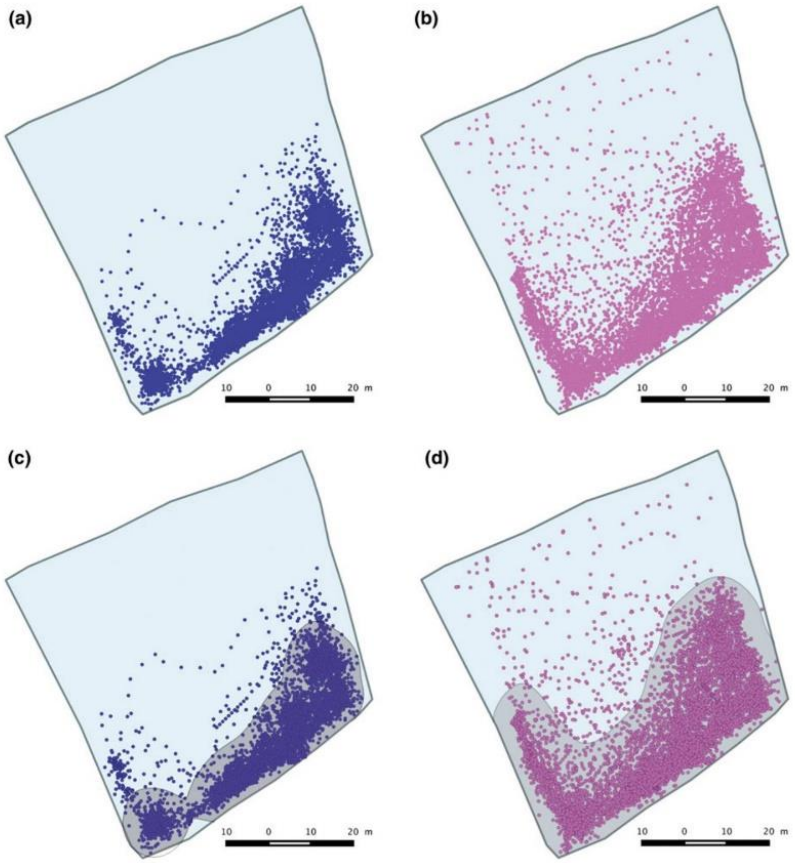


FIGURE 5 Space occupation of a mating pair of *Arapaima gigas* in the pond (2.5 days of survey). Points represent calculated positions every 30 s. (a) Male bearings (blue dots); (b) Female bearings (purple dots). (c, d) grey shaded area corresponds to 95% KDE (Kernel Density estimation) of male (c) and female (d)

The distance between both fish was calculated during a 6-day period including the 2.5 days of detailed survey where the spawning day occurred. Male–female distance varied from less than a meter to 45 m (results not shown), but the mean daily distance reached a minimum of 4.71 ± 0.15 m *SE* the day of spawning (Figure 8). During the three previous days the distance progressively decreased significantly ($p < .01$) from 13.14 ± 0.34 m *SEM* to 4.71 ± 0.15 m *SEM* and then significantly ($p < .01$) increased during the following days to reach 14.82 ± 0.33 m *SEM* and 13.14 ± 0.42 m *SEM* on day 1 and 2 respectively (Figure 8).

4 | DISCUSSION

4.1 | Accuracy

Array accuracy has been determined using a fixed transmitter at known coordinates in the geometric centre of the detectors array. As described in another study (James, Fischer, Laube, & Spindler, 2014) we were expecting an homogeneous distribution on all directions as the test transmitter was placed approximately at the centre of the array. Nevertheless as previously mentioned (Bergé et al., 2012; Binder et al., 2016) this finding showing an oriented distribution could be attributed to sound wave reflection on the pond shoreline, which slope is not perfectly similar on all its length. But if we consider the observed accuracy (<1 m) we still have highly reliable position accuracy as fish average size was 1.67 ± 0.15 m. This accuracy around the meter range is similar to that obtained with Chinook salmon in similar 4,000 m^2 enclosure using a 9-hydrophone array (Semmens, 2008) and an 8-hydrophone array in a 10,000 m^2 natural lake (Baktoft et al., 2015). Although this technique gives the best accuracy over all other telemetry techniques in turbid environment, the underwater video observation would be of great interest to get complementary and detailed data on fish behaviour as reported for other aquatic animals (Ebner, Clear, Godschalx, & Beitzel, 2009; Fatsini, Rey, Ibarra-Zatarain, Mackenzie, & Duncan, 2017; Mills, Verdouw, & Frusher, 2005; Struthers, Danylchuk, Wilson, & Cooke, 2015). Nevertheless in turbid environments the video option is not possible.

4.2 | Detection efficiency

Theoretical detection distance (few-hundred meters) was virtually higher than the largest possible distance (diagonal) of the pond used in this study, which corresponded to 102 m. Nevertheless the effective average detection rate reached only 66.55%. The reason, as mentioned in other studies (Binder et al., 2016; Hartill,

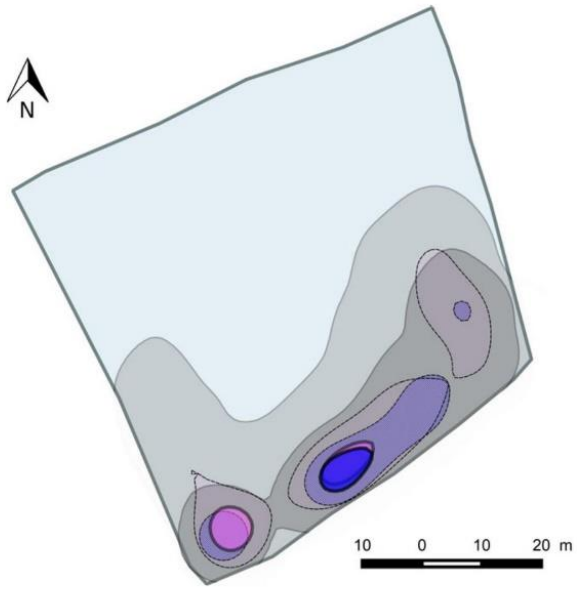


FIGURE 6 Home range areas of male and female *Arapaima gigas* using KDE at 95% (light grey: female; dark grey: male), KDE50% (doted line shaded purple: female; shaded blue: male) and KDE10% (solid purple: female; solid blue: male). Each position is calculated every 30 s for a 2.5 days period

Morrison, Smith, Boubée, & Parsons, 2003), is probably due to fish orientation or position close to the shore inducing signal absorption, background noise or signal collisions when numerous transmitters are present that did not allow a valid calculation position by the LOTEK's U-Map software. A small percentage of detections corresponded to out of pond bearings (6.4%) and some in-pond wrong bearings too (1.1%) identified by the speed filter. Finally the corrected detection rate reached around 50%, which means a valid detection every 10 s in average which is of the same order of magnitude reported for 0.01 km^2 natural lake with similar equipment using an array of eight hydrophones (Baktoft et al., 2015). Nevertheless this detection rate allowed to monitor fish movements and interactions quite precisely as showed by the male–female interaction during a spawning event.

4.3 | Space occupation and activity

Fish were most of the time close to the shore probably because of nest building and cleaning activity in the pre-spawning period as the male and female observed showed a spawning event during the studied period and generally nests are built in the vicinity of the shore area where the water depth is smaller (Bard & Imbiriba, 1986; Imbiriba, 1991). The short distance between male and female might be a good indicator of mating behaviour and proximity of a spawning event. In this pair, the lower distance between male and female and the duration of the period when both fish were closer coincided with an effective spawning. We will apply this parameter to all fish present in the pond to detect potential mating pairs during the 6 month-period of survey and look to the permanency of these pairs. In previous observations on reproductive behaviour of *A. gigas*, it was thought that only one nest was built by male and female (Bard & Imbiriba, 1986; Imbiriba, 1991) but for this particular pair

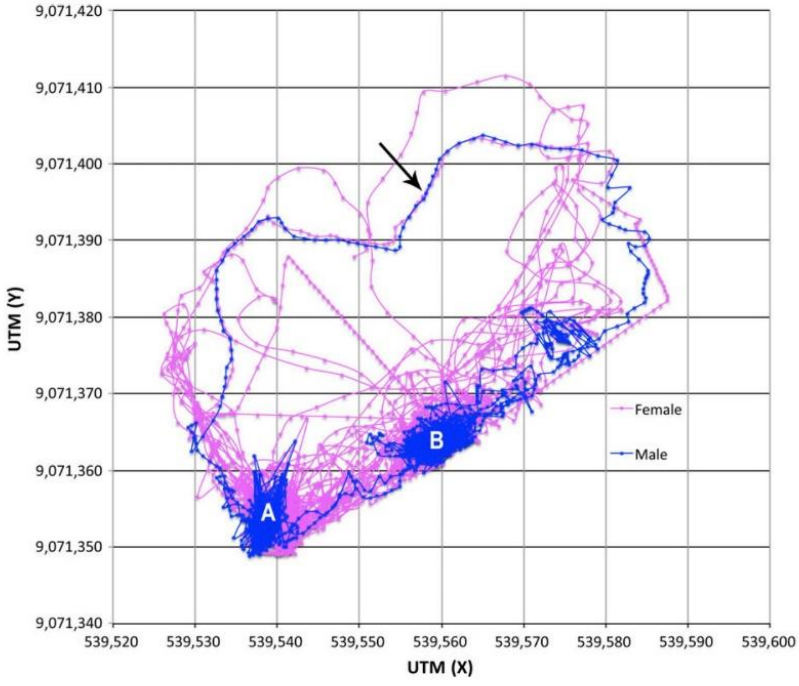


FIGURE 7 Visualization of the positions and trajectories of two paiches, Male (blue) and Female (purple) during 9.5 hr (from 0:00 to 9:30 a.m.) corresponding to the period of spawning. Each position is determined every 10 s. The arrow indicates a very peculiar trajectory where both male and female are travelling together towards the middle of the pond and then coming back to the nesting areas (here two areas labelled A and B)

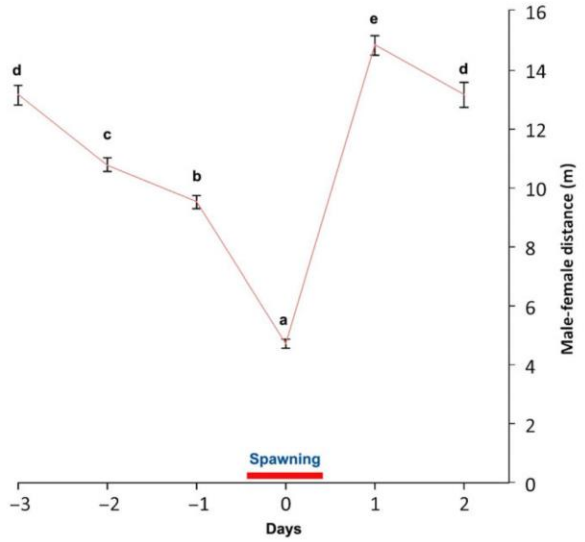


FIGURE 8 Male–Female *Arapaima gigas* proximity for a mating pair during a 6-day period (−3, −2, −1, 0, 1, 2) in the course of a spawning event (which occurred the fourth day of this follow-up, noted 0 in X graph axis and indicated by the red line). Data represent averaged distances in meters between male and female, calculated every minute, for an entire day (0:00–24:00 hr). Error bars represent standard error of the means and different superscript letters indicate significant differences between means at $p < .001$, using Tambane's T2 post hoc test for unequal variance samples

we observed during the survey period that two different nests were built although only one was used for egg deposition.

5 | CONCLUSION

The results obtained with the acoustic telemetry array deployed in this study establish the suitability of such ultrasonic telemetry equipment to monitor, at fine spatial and temporal scales, multiple fish interactions in confined turbid environments like aquaculture ponds. The first results presented here in *A. gigas*, provides new information on fish movements, space occupation, male–female interactions and reproductive behaviour in an earthen pond. This preliminary work will be extended to the analysis of all data collected on the survey of 20 *A. gigas* individuals (10 males and 10 females) during a 6-month period.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to all the technical staff of the IIAP–Pucallpa for their help during the handling and follow-up of the arapaimas. This work was funded in the framework of the Peruvian project 192-FINCyT-IA-201 (Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, Innóvate-Perú) and the IRD, International Joint Laboratory "Evolution and Domestication of the Amazonian Ichthyofauna" (LMI EDIA) as part of the scientific collaborations between IRD and IIAP, both members of the Research Network on Amazonian Ichthyofauna (Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica, RIIA). Thanks to Mitch Sisak from LOTEK for ultrasonic telemetry material deployment and testing.

ORCID

Jesús Núñez-Rodríguez http://orcid.org/0000-0003-3668-5446

REFERENCES

Abecasis, D., Bentes, L., Lino, P. G., Santos, M. N., & Erzini, K. (2013). Residency, movements and habitat use of adult white seabream (Diplodus sargus) between natural and artificial reefs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *118*, 80–85. https://doi.org/doi: 10.1016/j.ecss.2012.12.014

Baktoft, H., Zajicek, P., Klefoth, T., Svendsen, J. C., Jacobsen, L., Pedersen, M. W., … Arlinghaus, R. (2015). Performance assessment of two whole-lake acoustic positional telemetry systems - is reality mining of free-ranging aquatic animals technologically possible? *PLoS ONE*, *10*, e0126534. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126534

Baras, E. (1998). Selection of optimal positioning intervals in fish tracking: An experimental study on Barbus barbus. *Hydrobiologia*, *371–372*, 19–28. https://doi.org/doi: 10.1023/A:1017026127846

Bard, J., & Imbiriba, E. P. (1986). *Piscicultura de pirarucu, Arapaima gigas* EMBRAPA-CPATU N° 52 (Vol. *52*, p. 52). Belém, Brazil: EMBRAPA-CPATU.

Bégout, M.-L., & Lagardère, J.-P. (1995). An acoustic telemetry study of seabream (Sparus aurata L.): First results on activity rhythm, effects of environmental variables and space utilization. *Hydrobiologia*, *300*, 417–423. https://doi.org/10.1007/BF00024483

Bellquist, L. F., Lowe, C. G., & Caselle, J. E. (2008). Fine-scale movement patterns, site fidelity, and habitat selection of ocean whitefish (Caulolatilus princeps). *Fisheries Research*, *91*, 325–335. https://doi.org/doi: 10.1016/j.fishres.2007.12.011

Bergé, J., Capra, H., Pella, H., Steig, T., Ovidio, M., Bultel, E., & Lamouroux, N. (2012). Probability of detection and positioning error of a hydro acoustic telemetry system in a fast-flowing river: Intrinsic and environmental determinants. *Fisheries Research*, *125–126*, 1–13. https://doi.org/doi: 10.1016/j.fishres.2012.02.008

Binder, T., Farha, S., Thompson, H., Holbrook, C., Bergstedt, R., Riley, S., … Krueger, C. (2017). Fine-scale acoustic telemetry reveals unexpected lake trout, Salvelinus namaycush, spawning habitats in northern Lake Huron, North America. *Ecology of Freshwater Fish*, *1–12*, https://doi.org/doi: 10.1111/eff.12373

Binder, T., Holbrook, C., Hayden, T. A., & Krueger, C. C. (2016). Spatial and temporal variation in positioning probability of acoustic telemetry arrays: Fine-scale variability and complex interactions. *Animal Biotelemetry*, *4*, 1–15. https://doi.org/doi: 10.1186/s40317-016-0097-4

Castello, L., Arantes, C. C., McGrath, D. G., Stewart, D. J., & Sousa, F. S. D. (2015). Understanding fishing-induced extinctions in the Amazon. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *25*, 587–598. https://doi.org/10.1002/aqc.2491

Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., … Nuñez, J. (2009). Gender determination in the Paiche or Pirarucu (Arapaima gigas) using plasma

vitellogenin, 17β-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*, 125–136. https://doi.org/doi: 10.1007/s10695-008-9211-8

CITES. (2018). Retrieved from http://www.cites.org/eng/gallery/species/fish/arapaima_gigas.html Downloaded on 08/03/2018.

Cooke, S. J., Midwood, J. D., Thiem, J. D., Klimley, P., Lucas, M. C., Thorstad, E. B., … Ebner, B. C. (2013). Tracking animals in freshwater with electronic tags: Past, present and future. *Animal Biotelemetry*, *1*, 5. https://doi.org/10.1186/2050-3385-1-5

Crossin, G. T., Heupel, M. R., Holbrook, C. M., Hussey, N. E., Lowerre-Barbieri, S. K., Nguyen, V. M., … Cooke, S. J. (2017). Acoustic telemetry and fisheries management. *Ecological Applications*, *27*, 1031–1049. https://doi.org/10.1002/eap.1533

Ebner, B., Clear, R., Godschalx, S., & Beitzel, M. (2009). In-stream behaviour of threatened fishes and their food organisms based on remote video monitoring. *Aquatic Ecology*, *43*, 569–576. https://doi.org/10.1007/s10452-008-9192-9

Espinoza, M., Farrugia, T. J., Webber, D. M., Smith, F., & Lowe, C. G. (2011). Testing a new acoustic telemetry technique to quantify long-term, fine-scale movements of aquatic animals. *Fisheries Research*, *108*, 364–371. https://doi.org/doi: 10.1016/j.fishres.2011.01.011

Espinoza, M., Heupel, M. R., Tobin, A. J., & Simpfendorfer, C. A. (2016). Evidence of partial migration in a large coastal predator: Opportunistic foraging and reproduction as key drivers? *PLoS ONE*, *11*, e0147608. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147608

Farmer, N. A., Ault, J. S., Smith, S. G., & Franklin, E. C. (2013). Methods for assessment of short-term coral reef fish movements within an acoustic array. *Movement Ecology*, *1*, 1–13. https://doi.org/doi: 10.1186/2051-3933-1-7

Fatsini, E., Rey, S., Ibarra-Zatarain, Z., Mackenzie, S., & Duncan, N. J. (2017). Dominance behaviour in a non-aggressive flatfish, Senegalese sole (Solea senegalensis) and brain mRNA abundance of selected transcripts. *PLoS ONE*, *12*, e0184283. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184283

Hartill, B. W., Morrison, M. A., Smith, M. D., Boubée, J., & Parsons, D. M. (2003). Diurnal and tidal movements of snapper (<emph type="2">Pagrus auratus,</emph> Sparidae) in an estuarine environment. *Marine and Freshwater Research*, *54*, 931–940. https://doi.org/doi: 10.1071/MF02095

Hussey, N. E., Kessel, S. T., Aarestrup, K., Cooke, S. J., Cowley, P. D., Fisk, A. T., … Whoriskey, F. G. (2015). Aquatic animal telemetry: A panoramic window into the underwater world. *Science*, *348*, 1255642. https://doi.org/10.1126/science.1255642

Imbiriba, E. P. (1991). Produção e manjo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier). Technical Report EMBRAPA-CPATU, 57, 19 p.

IUCN. (2017). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. Retrieved from http://www.iucnredlist.org Downloaded on 08 March 2018.

James, D. A., Fischer, J. L., Laube, J. D., & Spindler, M. E. (2014). An accuracy assessment of ultrasonic transmitter locations determined by mobile telemetry in aquatic systems. *Fisheries Management and Ecology*, *21*, 421–425. https://doi.org/doi: 10.1111/fme.12089

Koehn, J. D., McKenzie, J. A., O'Mahony, D. J., Nicol, S. J., O'Connor, J. P., & O'Connor, W. G. (2009). Movements of Murray cod (Maccullochella peelii peelii) in a large Australian lowland river. *Ecology of Freshwater Fish*, *18*, 594–602. https://doi.org/doi: 10.1111/j.1600-0633.2009.00375.x

Lowe, C. G., Topping, D. T., Cartamil, D. P., & Papastamatiou, Y. P. (2003). Movement patterns, home range, and habitat utilization of adult kelp bass *Paralabrax clathratus* in a temperate no-take marine reserve. *Marine Ecology Progress Series*, *256*, 205–216. https://doi.org/10.3354/meps256205

Martins, E., Gutowsky, L. F., Harrison, P., Flemming, J. E., Jonsen, I., Zhu, D., … Cooke, S. (2014). Behavioral attributes of turbine entrainment risk for adult resident fish revealed by acoustic telemetry and state-space modeling. *Animal Biotelemetry*, *2*, 13. https://doi.org/10.1186/2050-3385-2-13

Mason, T. J., & Lowe, C. G. (2010). Home range, habitat use, and site fidelity of barred sand bass within a southern California marine protected area. *Fisheries Research*, *106*, 93–101. https://doi.org/doi: 10.1016/j.fishres.2010.07.008

Mills, D. J., Verdouw, G., & Frusher, S. D. (2005). Remote multi-camera system for in situ observations of behaviour and predator/prey interactions of marine benthic macrofauna. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, *39*, 347–352. https://doi.org/10.1080/00288330.2005.9517315

Núñez-Rodríguez, J., Duponchelle, F., Cotrina-Doria, M., Renno, J. F., Chavez-Veintimilla, C., Rebaza, C., … Baras, E. (2015). Movement patterns and home range of wild and re-stocked *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) monitored by radio-telemetry in Lake Imiria, Peru. *Journal of Applied Ichthyology*, *31*, 10–18. https://doi.org/doi: 10.1111/jai.12972

Økland, F., Thorstad, E. B., Hay, C. J., Næsje, T. F., & Chanda, B. (2005). Patterns of movement and habitat use by tigerfish (Hydrocynus vittatus) in the Upper Zambezi River (Namibia). *Ecology of Freshwater Fish*, *14*, 79–86. https://doi.org/doi: 10.1111/j.1600-0633.2004.00080.x

Pincock, D. G., & Johnston, S. V. (2012). Acoustic telemetry overview. In J. W. B. Noah, S. Adams, & J. H. Eiler (Eds.), *Telemetry techniques: A user guide for fisheries research* (p. 543). Bethesda, MD: American Fisheries Society.

Pincock, D., Welch, D., McKinley, S., & Jackson, G. (2010). Acoustic telemetry for studying migration movements of small fish in rivers and the ocean—current capabilities and future possibilities. PNAMP Special Publication: Tagging, Telemetry and Marking Measures for Monitoring Fish Populations—A Compendium of New and Recent Science For Use in Informing Technique and Decision Modalities: Pacific Northwest Aquatic Monitoring Partnership Special Publication, *2*, 105–118.

Pursche, A. R., Suthers, I. M., & Taylor, M. D. (2013). Post-release monitoring of site and group fidelity in acoustically tagged stocked fish. *Fisheries Management and Ecology*, *20*, 445–453. https://doi.org/doi: 10.1111/fme.12031

Semmens, B. X. X. (2008). Acoustically derived fine-scale behaviors of juvenile Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) associated with intertidal benthic habitats in an estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *65*, 2053–2062. https://doi.org/10.1139/f08-107

Simpfendorfer, C. A., Heupel, M. R., & Hueter, R. E. (2002). Estimation of short-term centers of activity from an array of omnidirectional hydrophones and its use in studying animal movements. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *59*, 23–32. https://doi.org/10.1139/f01-191

Steiniger, S., & Bocher, E. (2009). An overview on current free and open source desktop GIS developments. *International Journal of Geographical Information Science*, *23*, 1345–1370. https://doi.org/doi: 10.1080/13658810802634956

Steiniger, S., & Hunter, A. J. S. (2012). OpenJUMP HoRAE—A free GIS and toolbox for home-range analysis. *Wildlife Society Bulletin*, *36*, 600–608. https://doi.org/doi: 10.1002/wsb.168

Struthers, D. P., Danylchuk, A. J., Wilson, A. D. M., & Cooke, S. J. (2015). Action cameras: Bringing aquatic and fisheries research into view. *Fisheries*, *40*, 502–512. https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1082472

Topping, D. T., Lowe, C. G., & Caselle, J. E. (2006). Site fidelity and seasonal movement patterns of adult California sheephead *Semicossyphus pulcher* (Labridae): An acoustic monitoring study. *Marine Ecology*

Progress Series, *326*, 257–267. https://doi.org/doi: 10.3354/meps326257

Villegas-Ríos, D., Alós, J., March, D., Palmer, M., Mucientes, G., & Saborido-Rey, F. (2013). Home range and diel behavior of the ballan wrasse, Labrus bergylta, determined by acoustic telemetry. *Journal of Sea Research*, *80*, 61–71. https://doi.org/doi: 10.1016/j.seares.2013.02.009

Vokoun, J. C. (2003). Kernel density estimates of linear home ranges for stream fishes: Advantages and data requirements. *North American Journal of Fisheries Management*, *23*, 1020–1029. https://doi.org/10.1577/M02-141

Worton, B. J. (1989). Kernel methods for estimating the utilization distribution in home-range studies. *Ecology*, *70*, 164–168. https://doi.org/doi: 10.2307/1938423

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information section at the end of the article.

How to cite this article: Núñez-Rodríguez J, Vela Díaz A, Bazan-Albitez R, et al. Use of an acoustic telemetry array for fine scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas*, breeders. *Aquac Res*. 2018;00:1–9. https://doi.org/10.1111/are.13692

4. Sexage de reproducteurs de *H. niloticus* pour suivre leur comportement reproducteur en étang de pisciculture

4.1 Résultats avec le test du kit de sexage de *A. gigas*

Le kit de sexage mis au point pour *A. gigas* (Chu-Koo et al., 2009 ; Nuñez, 2008) a été testé sur 24 individus mâtures de *H. niloticus* en période de reproduction. L'apparition des spots de contrôle négatif (**Figure 62**) a permis de valider tous les tests réalisés. Le spot de contrôle positif indiquant la détection de la Vtg a été observé chez un seul individu avec une coloration moins marquée que le spot de contrôle négatif (**Figure 62**). Après avoir sacrifié tous les poissons testés, on a constaté que ce lot comprend 10 femelles dont le poisson contrôlé positif à la Vtg, soit un taux de succès du kit de sexage de *A. gigas* de 10% sur *H. niloticus*.

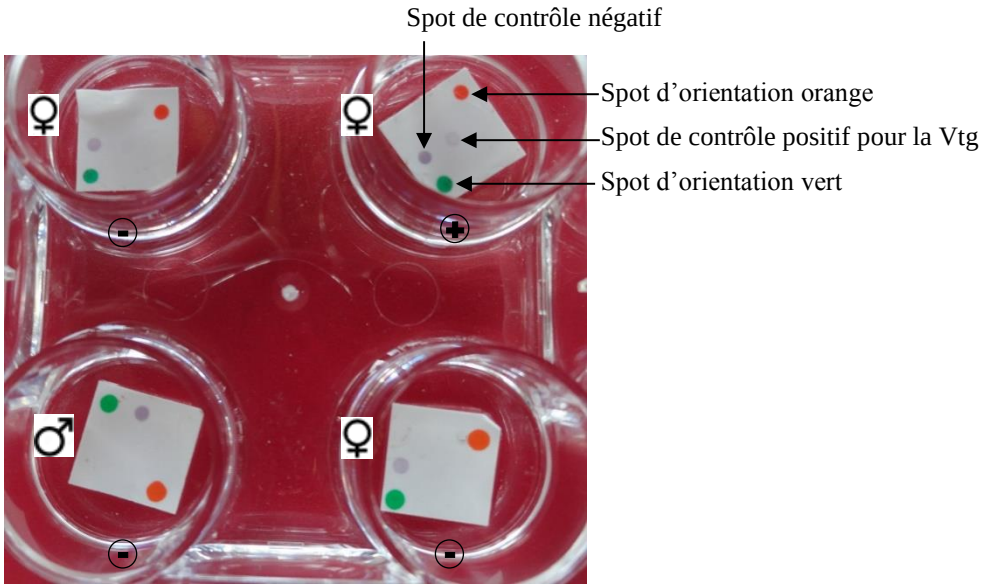


Figure 62 : Test du kit de sexage de *A. gigas* réalisé sur quatre individus en vitellogenèse de *H. niloticus* dont trois femelles. Le spot de contrôle positif de détection à la Vtg est observé chez une seule femelle. Les deux autres femelles ont été anormalement contrôlées négatives comme le mâle.

4.2 Résultats avec l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* et de *O. bicirrhosum*

Des échantillons de plasma de *H. niloticus* et *A. gigas* prélevés sur des individus mâles et femelles mâtures en période de reproduction ont été testés par la méthode ELISA avec les anticorps anti Vtg1 de *A. gigas* (**Figure 63a**) et anti Vtg de *O. bicirrhosum* (**Figure 64a**) dans des conditions optimales pour éviter les liaisons non spécifiques.

Avec l'anticorps anti Vtg1 de *A. gigas* (**Figure 63b**), les individus mâles affichent une DO inférieure à 0,206 pour une liaison non spécifique moyenne de 0,123. Les femelles de *H. niloticus* et *A. gigas* affichent des DO comprises respectivement entre 0,268 et 0,449 (dilution de plasma du 1000^{e} au 10000^{e}) et entre 0,383 et 1,433 (dilution de plasma du 1000^{e} au 80000^{e}).

Avec l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum*, quel que soit le sexe de *H. niloticus* et *A. gigas*, la valeur de DO moyenne qui est de 0,086 est similaire à celle de la liaison non spécifique (**Figure 64b)**.

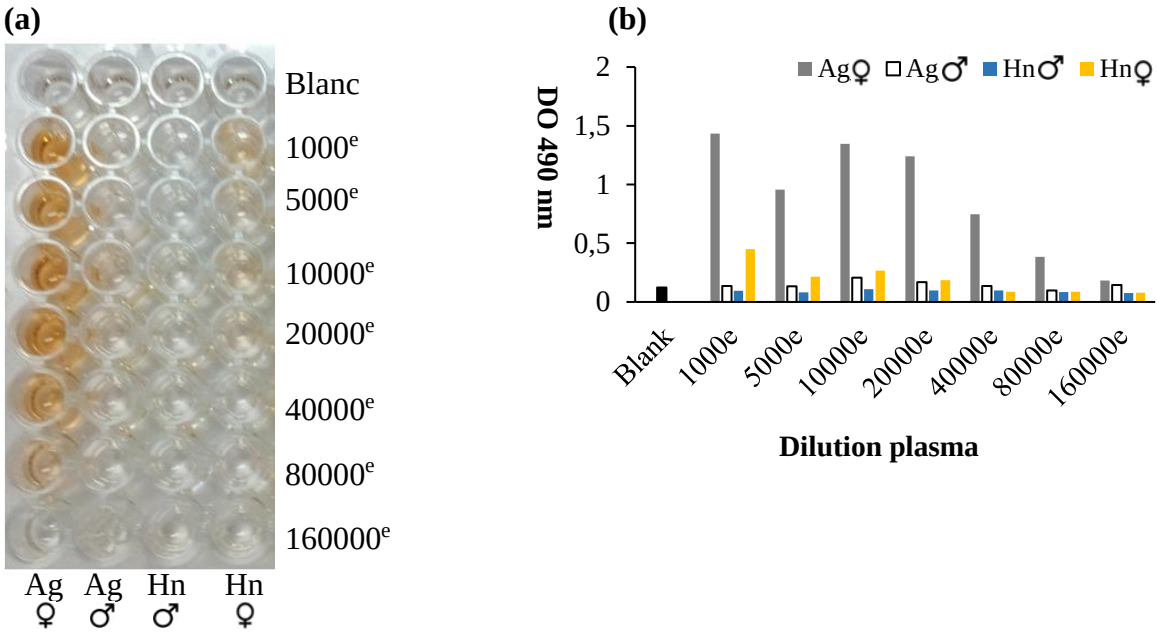


Figure 63 : Révélation de la série de dilution de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg1 de *A. gigas* dans des puits de plaque ELISA (a). Les valeurs de la DO 490 nm de chaque puits sont représentées graphiquement (b).

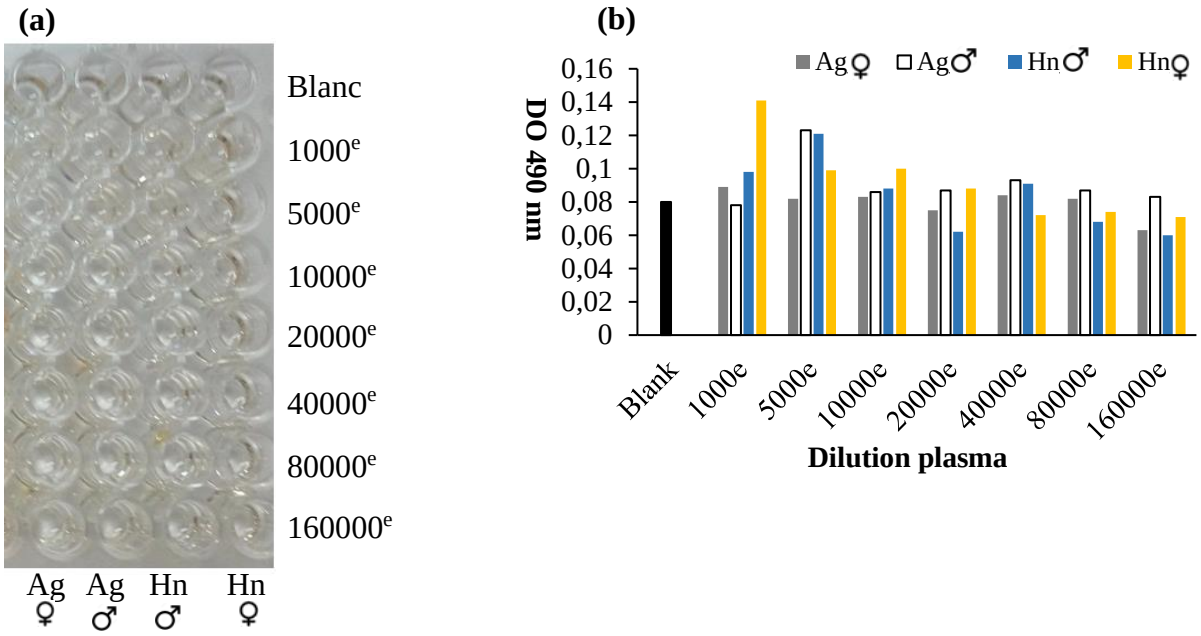


Figure 64 : Révélation de la série de dilutions de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum* dans des puits de plaque ELISA (a). Les valeurs de la DO 490 nm de chaque puits sont représentées graphiquement (b).

4.3 Résultats avec l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*

4.3.1 Purification de la Vtg et production d'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*

Le traitement de 12 poissons immatures de *H. niloticus* au 17β-estradiol a induit la sécrétion de Vtg dans le sang qui a été révélée par SDS-PAGE avec une bande majeure absente des plasmas non induits **(Figure 65)**.

L'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* produit par l'un des deux lapins a été retenu car il présentait les meilleures réactions avec la Vtg plasmatique et une plus faible liaison non spécifique avec le plasma des individus mâles.

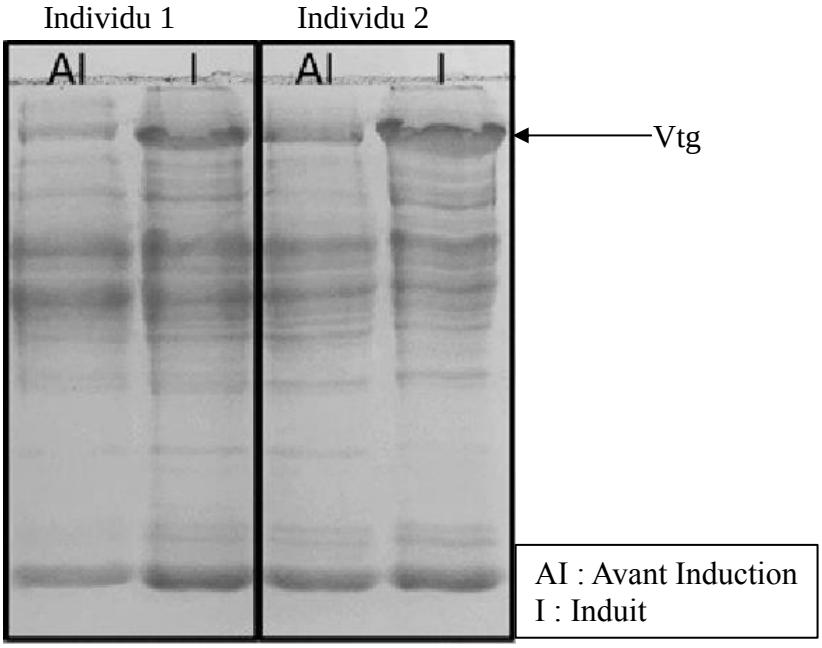


Figure 65 : SDS-PAGE de plasma de *H. niloticus* d'individus avant induction et induits au 17β-estradiol. Les bandes indiquant la présence de Vtg sont observées dans les plasmas de poisson induits.

4.3.2 Test de l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*

L'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* dilué au 10000^{e} a été testé sur des plasmas mâles et femelles d'individus matures de *H. niloticus* et *A. gigas* en période de reproduction. Les résultats de l'ELISA sur une série de dilutions des plasmas sont présentés dans la **Figure 66a**.

Les mesures de l'absorbance de chaque puits (**Figure 66a**) montrent que les femelles de *A. gigas* et les individus mâles des deux espèces affichent une DO inférieure à 0,21 pour une liaison non spécifique moyenne de 0,075. Pour les femelles de *H. niloticus* les DO sont comprises entre 0,336 et 0,565 (dilution de plasma du 1000^{e} au 10000^{e}) au-dessus des valeurs obtenues avec l'anticorps anti Vtg1 de *A. gigas*.

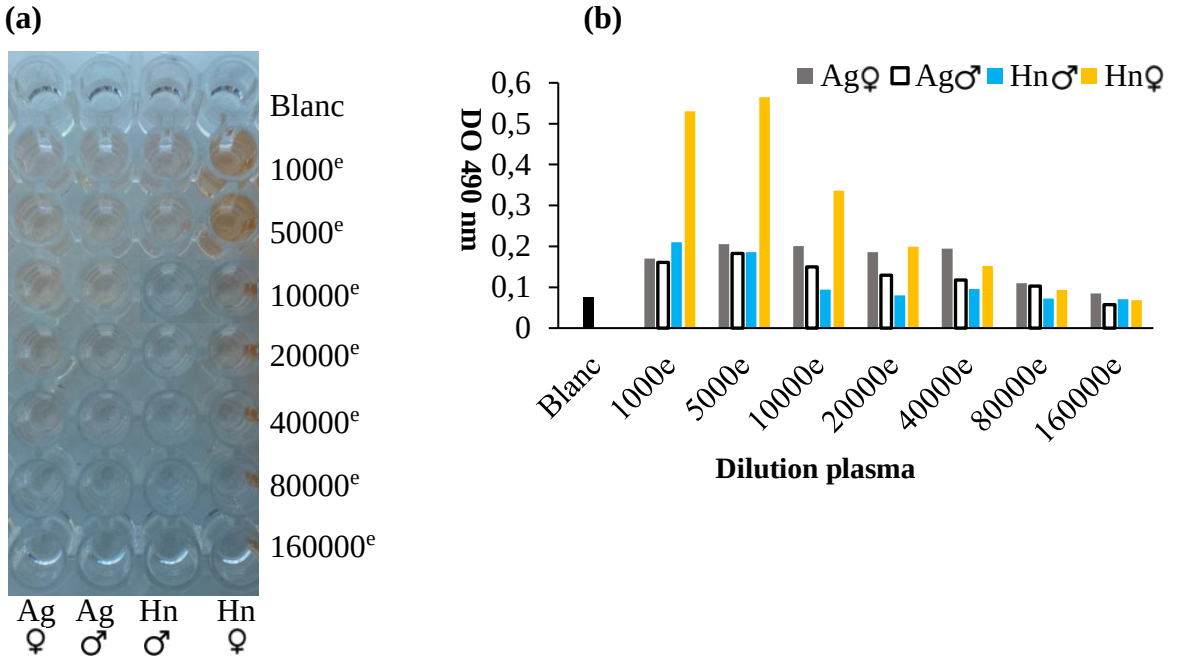


Figure 66 : Révélation de la série de dilution de plasmas mâles et femelles de *A. gigas* et *H. niloticus* incubés avec l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* dans des puits de plaque ELISA (a). Les valeurs de la DO 490 nm de chaque puits sont représentées graphiquement (b).

4.4 Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse

Pour tester la possibilité de déterminer le sexe d'individus matures en vitellogenèse de *H. niloticus* par une analyse en spectrométrie de masse, la Vtg ou ses produits de clivage ont été recherchés dans des extraits protéiques de sang et de mucus d'individus mâles et femelles. Cette analyse a permis de détecter dans le mucus de quatre femelles la présence de Vtg avec des scores de Mascot compris entre 96 et 2050 (**Figure 67)**. Dans le mucus de trois poissons mâles, aucune Vtg ni aucun produit de clivage n'a été détecté (scores de Mascot nul). Chez un poisson mâle, le score de Mascot de la Vtg est de 29,309.

Le score de Mascot pour une protéine est le score total des peptides individuels, par exemple masses peptidiques et masses ioniques des fragments peptidiques, pour tous les peptides correspondant à une protéine donnée. Pour une identification de protéine positive, le score de Mascot doit être supérieur au niveau de confiance de 95%. Pour une recherche dans la base de données de protéines nrbd de NCBI contenant 18 millions de séquences protéiques connues, le

niveau de confiance de 95% se situe autour d'un score de 90 (Hamidi et al., 2017 ; http://www.matrixscience.com/).

C'est ce seuil qui a été utilisé comme critère de détermination du sexe. Les individus ayant un score de détection de Vtg supérieur à 90 sont considérés comme des femelles et ceux ayant des scores inférieurs à 90 sont considérés comme des mâles. Quatre poissons ont été sacrifiés pour confirmer la détermination du sexe par la détection de la Vtg en MS/MS et 100% des poissons ont été correctement sexés (2 mâles et 2 femelles).

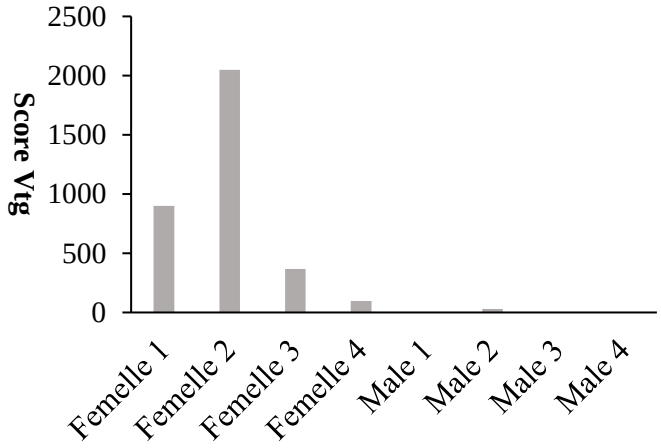


Figure 67 : Niveau de détection de la Vtg ou ses produits de clivages par spectrométrie de masse dans le mucus d'individus mâles et femelles de *H. niloticus* en vitellogenèse. Les individus mâles ont des scores<50 et les individus femelles ont des scores>96.

Par la suite, l'analyse en MS/MS d'extraits protéiques de sang a été utilisée pour sexer deux lots de poissons matures (59 individus) destinés à la réalisation d'une étude du comportement reproducteur.

Dans le lot de reproducteurs stockés dans une ferme piscicole de Daloa (centre-ouest de la Côte d'Ivoire), 18 individus sur 31 ont montré une forte réaction positive à la détection de Vtg ou ses produits de clivages, indiquant que ce sont des femelles et les 13 autres reproducteurs sont considérés comme des mâles (**Figure 68a**).

Pour le lot de reproducteurs stockés dans une ferme piscicole de Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire), ce sont 20 individus sur 28 considérés comme des femelles qui ont été détectés positifs à la présence de Vtg ou ses produits de clivage ; les 8 autres reproducteurs sont considérés comme des mâles (**Figure 68b**).

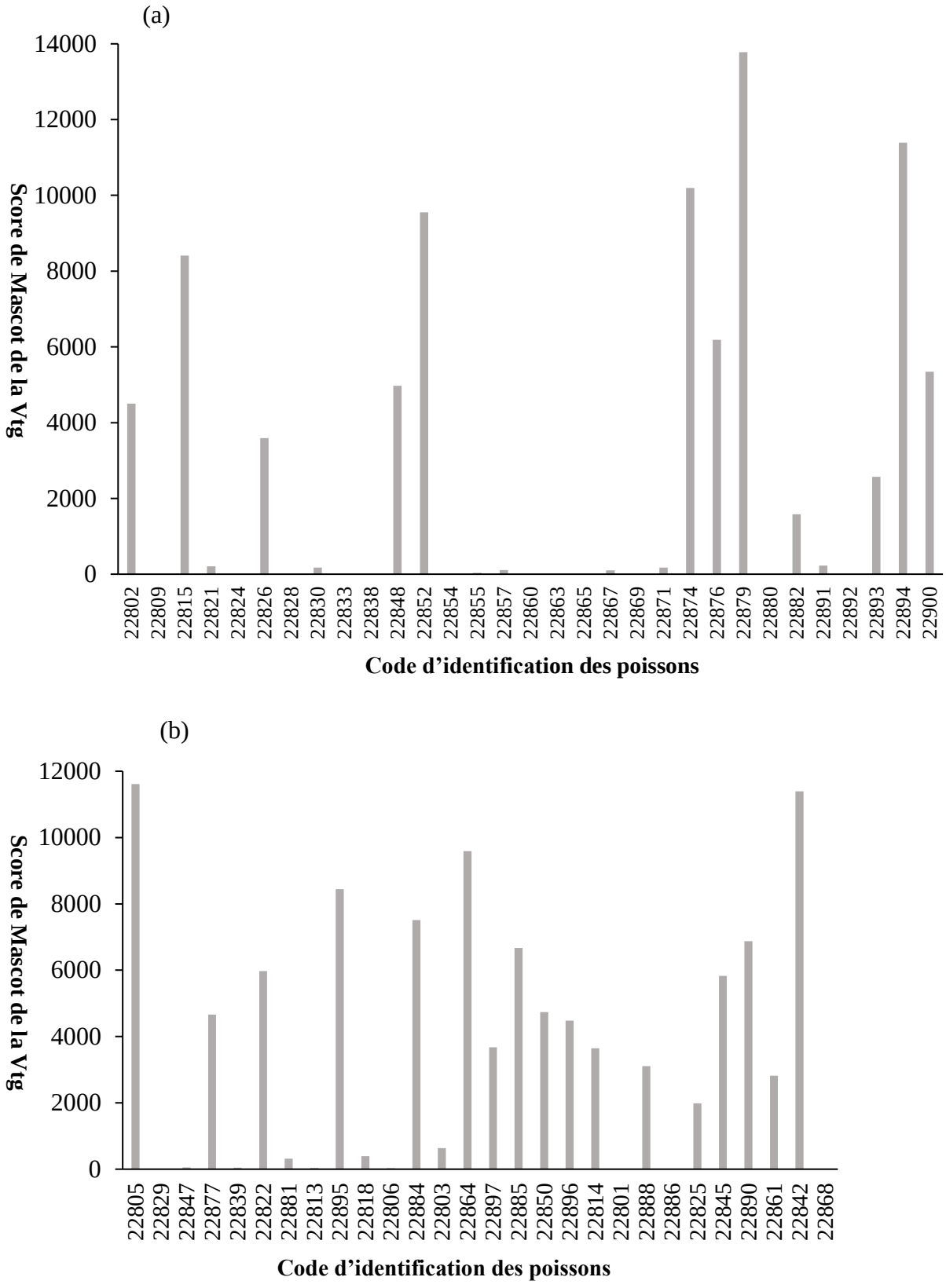


Figure 68 : Détermination du sexe par analyse en spectrométrie de masse de deux lots de reproducteurs stockés dans des fermes piscicoles à Daloa (a) et Yamoussoukro (b), deux localités de la Côte d'Ivoire. Les poissons ayant un score de détection de Vtg>90 considérés comme des femelles sont indiqués par des bandes grise, les autres individus considérés comme des mâles ont un score de détection de Vtg<90.

4.5 Discussion

Au cours de cette étude, cinq méthodes de sexage peu invasives et basées sur la détection de la Vtg ont été testées pour la première fois sur des individus matures de *H. niloticus*. La Vtg a été utilisée comme marqueur de sexage chez de nombreuses espèces telles que l'esturgeon de Sibérie (Ceapa et al., 2002), l'albacore (Takemura & Oka, 1998) et les truites de mer (Pottinger et al., 2005).

Chez *H. niloticus*, aucun caractère sexuel externe n'est disponible pour distinguer le sexe alors que l'identification du sexe des individus matures de la plupart des espèces se fait par l'observation de caractères externes. Dans certains cas, le recours à des biopsies ou des endoscopies sur des animaux anesthésiés a permis l'identification du sexe, même en dehors de la saison de reproduction ou même chez des poissons immatures (Bryan et al., 2007 ; Carreiro et al., 2011 ; Kynard & Kieffer, 2002 ; Swenson et al., 2007). Chez le bonytongue africain, du fait de sa respiration aérienne obligatoire, un risque très élevé de mortalité est possible en cas d'anesthésie. Les lamelles ovariennes nues et exposées dans la cavité générale du poisson ne favorisent pas la canulation (Adite et al., 2006 ; Bard & Imbiriba, 1986 ; Chu-Koo et al., 2009 ; Godinho et al., 2005 ; Moreau, 1982 ; Oladosu et al., 2007). De plus, une technique de sexage basée sur des données morphométriques a donnée des résultats peu fiables (Oladosu et al., 2007).

Les tests du kit de sexage de *A. gigas* sur des femelles de *H. niloticus* s'est avéré positif à seulement 10%. Avec l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* dilué au 10000^{e}, les résultats de l'ELISA ont permis de confirmer son efficacité pour le sexage de *A. gigas* avec une DO>0,25 pour les femelles et une DO<0,25 pour les mâles tels que rapportés par Chu-Koo et al. (2009). Le test a été également concluant pour les individus mâles de *H. niloticus* (DO<0,25) quel que soit le niveau de dilution de plasma alors que pour les femelles, seules les dilutions au 1000^{e}, 5000^{e} et 10000^{e} ont permis de les identifier correctement (DO>0,25). Toutefois, les valeurs de DO de femelles de *H. niloticus* (0,268<DO<0,449) sont inférieures à celles de *A. gigas* obtenues dans cette étude (0,383<DO<1,43) et par Chu-Koo et al. (2009) pour une dilution de plasma au 80000^{e} et de l'anticorps au 10000^{e} (1,4<DO<2,95). Ces résultats montrent une certaine affinité de la Vtg de *H. niloticus* pour l'anticorps anti Vtg de *A. gigas*, due probablement à la proximité phylogénétique de ces deux espèces démontrée dans cette thèse et signalée par d'autres auteurs (Betancur-R et al., 2017 ; Guo-Qing & Wilson, 1996 ; Hilton, 2001, 2003 ;

Lavoué, 2016 ; Lavoué & Sullivan, 2004 ; Nelson, 1968, 1969). En vue du sexage d'individus matures de *H. niloticus*, le test sur plaque ELISA avec l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* contenu dans le plasma de lapins immunisés semble plus sensible et recommandable que le kit de sexage de *A. gigas* dans lequel cet anticorps est incorporé aux membranes Mini Array. Une technique d'immuno diffusion basé sur la détection de la Vtg pour sexer l'albacore (Takemura & Oka, 1998) s'avère également moins sensible que le test direct avec le protocole ELISA (Chu-Koo et al., 2009).

Contrairement aux méthodes de sexage développées pour *A. gigas* qui ont donné dans une certaine mesure des résultats positifs sur *H. niloticus*, le test de l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum*, une autre espèce d'Ostéoglossiformes, a fourni des valeurs de DO similaires à la liaison non spécifique (DO<0,141) pour *H. niloticus* et *A. gigas*. Cette méthode qui n'a pas permis de différencier les deux sexes chez *H. niloticus* ne peut donc être recommandée pour sexer des individus mâtures. On peut donc également faire l'hypothèse que compte tenu de la plus grande distance phylogénétique entre *A. gigas* et *O. bicirrhosum*, leurs vitellogénines sont sans doute plus dissemblables entrainant une non reconnaissance de la Vtg d'*O. bicirrhosum* par l'anticorps anti Vtg de *A. gigas*.

L'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* mis au point dans le cadre de cette thèse a montré une liaison non spécifique (DO<0,21) avec le plasma des individus mâles de *H. niloticus* et *A. gigas*. Alors qu'on s'attendait à avoir une réaction positive de cet anticorps avec le plasma de femelles de *A. gigas*, comme ce fut le cas de *H. niloticus* avec l'anticorps anti Vtg1 de *A. gigas*, le résultat obtenu s'est avéré similaire à celui des individus mâles (DO<0,205), donc non spécifique. Pour les femelles de *H. niloticus*, avec des dilutions au 1000^{e}, 5000^{e}, et 10000^{e}, les valeurs de DO sont supérieures à 0,25 (0,336<DO<0,565) traduisant que le test est positif si on tient compte du seuil défini par Chu-Koo et al. (2009). On peut conclure que l'anticorps développé au cours de ces travaux de thèse est spécifique à *H. niloticus* et peut être utilisé pour sexer les individus matures de cette espèce, par contre le non croisement avec la Vtg d'*A. gigas* est plus surprenant.

Les analyses en spectrométrie de masse d'extraits protéiques de plasma et de mucus a permis d'obtenir chez des femelles matures de *H. niloticus* des scores Mascot de détection de la Vtg supérieurs à 90. Chez les mâles, les scores sont inférieurs à 90. Ce seuil de score au-delà duquel on a une identification positive de la Vtg (Hamidi et al., 2017 ; http://www.matrixscience.com/) a été utilisé pour sexer deux lots de 59 reproducteurs. Le sacrifice de quatre d'entre eux a

confirmé à 100% les sexes préalablement définis (deux femelles et deux mâles). Les analyses protéomiques sont de plus en plus utilisées pour identifier des protéines/peptides d'intérêt (López et al., 2002 ; Sun et al., 2003) qui sont impliquées dans divers processus. Par exemple, un test de sexage similaire à celui de *H. niloticus* a été réalisé sur des individus de *Epinephelus lanceolatus* à partir de prélèvement sanguin et s'est révélé également efficace (Om et al., 2013). A travers des études protéomiques, le statut de reproduction et le degré de maturation sexuelle de plusieurs espèces ovipares ont été évalués en fonction des taux plasmatiques de Vtg (Cohen & Banoub, 2011). Non seulement l'analyse en spectrométrie de masse constitue une approche efficace pour sexer les individus matures de *H. niloticus*, mais aussi les variation de score de Mascot pourraient traduire le degré de maturation des femelle sexées dans la mesure où la Vtg est corrélée au développement de l'ovocyte chez les poissons au cours du cycle de reproduction (Ndiaye et al., 2006 ; Nuñez-Rodriguez et al., 1989 ; Nunez Rodriguez et al., 1997).

5. Conclusion

Les résultats obtenus avec le réseau de télémétrie acoustique utilisé dans cette étude établissent la pertinence d'un tel équipement de télémétrie à ultrasons pour suivre, à des échelles spatiales et temporelles fines, de multiples interactions de poissons dans des environnements confinés et turbides tels que des étangs d'aquaculture. Les premiers résultats présentés ici pour un couple de *A. gigas* fournissent de nouvelles informations sur les mouvements des poissons, l'occupation de l'espace, les interactions mâle-femelle et le comportement reproducteur dans un étang en terre. Ce travail préliminaire sera étendu à l'analyse de toutes les données recueillies sur les 20 poissons (10 mâles et 10 femelles) présents dans l'étang expérimental au cours d'une période de 6 mois.

Il a été démontré que désormais des méthodes peu invasives (à partir de prélèvement sanguin) basées sur la détection de Vtg plasmatique sont disponibles pour sexer des individus matures de *H. niloticus*. Le test du Kit de sexage de *A. gigas* a donné des résultats mitigés et l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum* n'est pas adapté non plus. L'anticorps anti Vtg de *A. gigas*, l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* et l'approche protéomique ont permis de déterminer avec succès le sexe de *H. niloticus*. Deux lots de reproducteurs de sexe connu ont pu être constitués ; ce qui permet d'envisager une étude du comportement reproducteur de *H. niloticus* par télémétrie ultrasonique dans les mêmes conditions que celle de *A. gigas*. Le matériel nécessaire à la réalisation de cette expérimentation est en cours d'acquisition en attendant que les poissons sexés atteignent une taille suffisante (>3kg) pour espérer avoir une meilleure résistance à la pose des émetteurs.

Sixième partie

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Plusieurs approches existent pour étudier les paramètres de reproduction des poissons. Certaines analyses nécessitent le sacrifice pour la dissection des poissons, l'utilisation d'anesthésie souvent préjudiciable à la survie du poisson, ou au contraire l'utilisation de méthodes peu invasives qui préservent la vie des individus. Nous avons privilégié dans le cas de nos travaux, les méthodes peu invasives, basées sur (i) des prélèvements sanguins et de mucus pour la détermination des sexes, (ii) la collecte d'échantillons de nageoires pour des analyses de génétique des populations et (iii) l'étude du comportement de reproducteurs équipés d'émetteurs ultrasoniques. Néanmoins, certaines actions de recherche ont nécessité le sacrifice d'individus, notamment celles qui concernent l'étude des aspects transcriptomiques et protéomiques. Les études réalisées au cours de cette thèse dont l'objectif général est de contribuer à la domestication de *H. niloticus* et *A. gigas* sont résumés dans la **Figure 69**. L'identification et la comparaison des acteurs moléculaires impliqués dans la vitellogenèse et sa régulation a été réalisée chez les 2 espèces sœurs. Le comportement reproducteur de *A. gigas* en captivité a été étudié et chez *H. niloticus* la caractérisation génétique des populations et la mise au point de méthodes de sexage ont été réalisées.

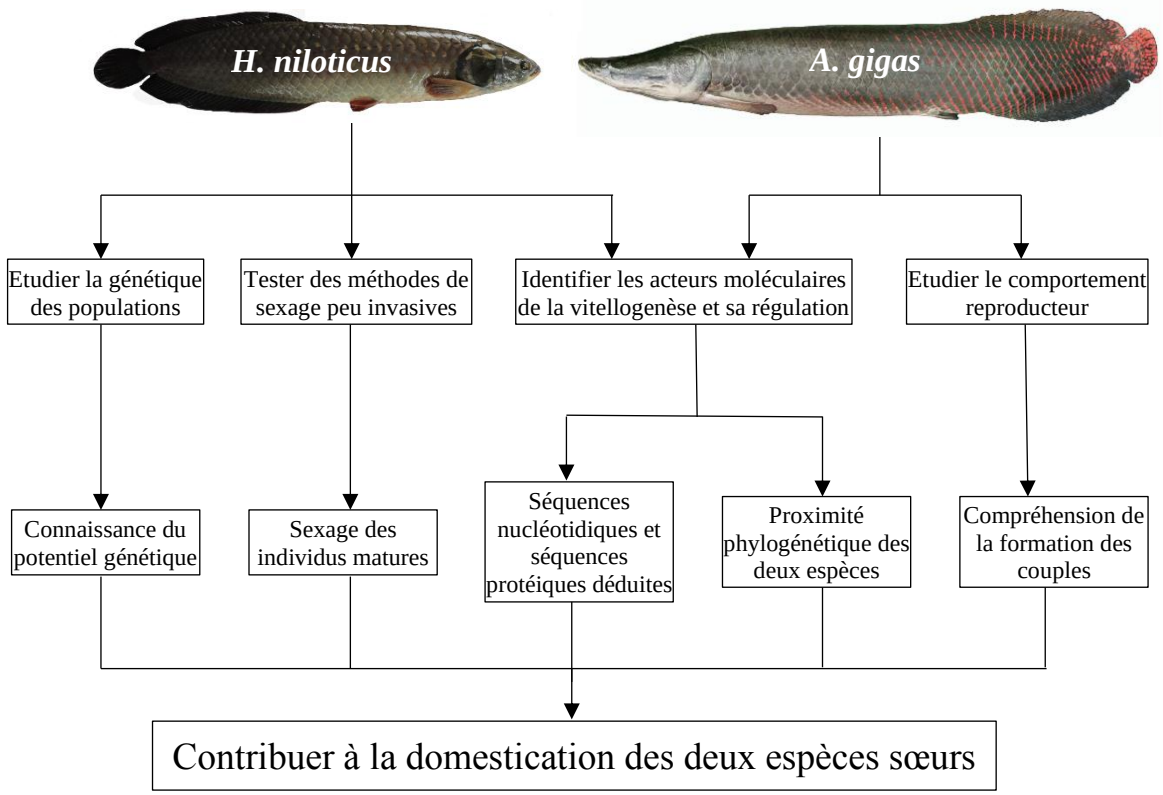


Figure 69 : Etudes réalisées au cours de cette thèse qui contribuent à la domestication de H. niloticus et *A. gigas*.

1. *H. niloticus* en Côte d'Ivoire, un poisson d'origine « camerounaise » à faible variabilité génétique ?

Le maintien de ressources génétiques est un gage pour un développement durable des pêcheries et de l'aquaculture des espèces de poissons. La domestication des espèces passe nécessairement par la connaissance du potentiel génétique des populations sauvages et stocks d'élevage présents dans une zone ichthyologique donnée. En Côte d'Ivoire par exemple, *H. niloticus* a été introduit entre 1957 et 1960 et depuis ces introductions, aucune étude n'a été réalisée sur la génétique des populations de poissons sauvages et de pisciculture. Cette thèse s'est alors intéressée à la caractérisation des ressources génétiques d'*Heterotis* qui constitue la deuxième espèce de pisciculture en Côte d'Ivoire et dont les pêcheries sont surexploitées.

Des marqueurs mitochondriaux ont été utilisés pour analyser des échantillons prélevés dans des cours d'eaux et des fermes piscicoles de Côte d'Ivoire, de la Guinée et du Cameroun.

Les résultats ont permis d'identifier 6 haplotypes du gène Cyt b et 2 haplotypes du segment NADH1 (rRNA 16S+tRNA-Leu+NADH1+tRNA-Ile). Malgré l'absence de partage de même haplotype entre le Cameroun et la Côte d'Ivoire, on a pu établir que certains haplotypes observés en Côte d'Ivoire dérivent des haplotypes du Cameroun, traduisant ainsi que l'*Heterotis* de Côte d'Ivoire pourrait avoir une origine « camerounaise ». Il n'est pas aussi exclu qu'un échantillonnage plus important permette de retrouver au Cameroun, les haplotypes observés uniquement en Côte d'Ivoire. Dans le cas contraire, les *Heterotis* de Côte d'Ivoire auraient de multiple origine géographique qu'il faudra rechercher à partir d'échantillonnage dans d'autres bassins versants de l'aire de distribution de l'espèce. Dans l'immédiat, on pourra s'intéresser à l'échantillonnage des *Heterotis* natifs présents dans les bassins versants de pays limitrophes de la Côte d'Ivoire tel que le Burkina Faso qui d'ailleurs a fourni par le passé des alevins aux chercheurs ivoiriens pour ensemencer les cours d'eaux et les pisciculture.

Concernant le niveau de diversité génétique, les analyses des échantillons de Côte d'Ivoire ont montré généralement une absence de différenciation haplotypique entre les stocks de pisciculture et les populations sauvages d'un même bassin. Il pourrait donc avoir des transferts de poissons entre ces deux milieux dans le but d'assurer une production halieutique et aquacole

de cette espèce dont la reproduction n'est pas encore maitrisée. Entre bassin versant, la différentiation haplotypique est plutôt importante.

Les indices de diversité d'*Heterotis* déterminés pour les échantillons collectés demeurent faibles pour les gènes examinés. Une question mérite donc d'être posée :

Est-ce que l'échantillonnage réalisé est suffisamment représentatif pour conclure que *H. niloticus* constitue une ressource génétiquement faible non seulement en Côte d'Ivoire, mais également dans les stocks d'élevage de la Guinée et dans le bassin du Nyong au Cameroun ?

Il apparait donc nécessaire d'utiliser un échantillonnage plus important, étendu à d'autres zones pour établir si oui ou non la faible diversité génétique est une caractéristique de *H. niloticus* en Côte d'Ivoire et dans d'autres pays de sa zone de distribution. L'utilisation d'autres marqueurs mitochondriaux telle que la région de contrôle combinés aux microsatellites peut être envisager pour obtenir des informations complémentaires et tenter de mieux connaitre les ressources génétiques d'*Heterotis*.

2. Caractérisation et identification des acteurs moléculaires de la vitellogenèse, une étape pour comprendre la physiologie de la reproduction des *Arapaimidae*

La vitellogenèse est un processus important dans la physiologie de la reproduction des espèces ovipares. Elle permet l'incorporation de la Vtg sous formes de protéines vitellines dans les ovocytes pour le développement de l'embryon. Elle fait intervenir l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien ainsi que des organes comme le foie.

Chez les deux espèces étudiées dans cette thèse, les données moléculaires liées à la vitellogenèse et à sa régulation étaient très peu abondantes chez *A. gigas* et totalement inexistantes chez *H. niloticus*. Une combinaison d'approches « omiques » a donc été mise en

œuvre pour caractériser et identifier les neuropeptides régulateurs issus de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien ainsi que leurs récepteurs au niveau de l'ovaire, les récepteurs du 17β-estradiol, les différentes Vtg et leur récepteur ovarien.

C'est par une approche basée sur la construction de transcriptomes tissulaires spécifiques, ici l'hypophyse, l'ovaire et le foie, associée à une analyse in silico approfondie grâce à divers outils du web et surtout au logiciel Peptraq, que les transcrits ont été extraits. Le logiciel Peptraq a permis la traduction et la filtration des données sur des critères structuraux. Les résultats obtenus sont compilés dans le **Tableau 33**.

Tableau 33 : Acteurs moléculaires de la vitellogenèse et sa régulation identifiés chez *H. niloticus* et *A. gigas*. Les molécules suivies d'un astérisque ont été décrites dans des études antérieures pour *A. gigas*. Les croix, les tirets et les points d'interrogation indiquent respectivement l'identification de la séquence complète, la non identification et l'identification de la séquence incomplète.

	H. niloticus	*A. gigas*
GPα*	X	X
FSHβ*	X	X
FSHR	X	-
LHβ*	X	X
LHR	X	-
PRL	X	X
PRLR	X	?
ERα	-	-
ERβ	X	X
ERγ	X	-
Vtg hépatique	?	-
Vtg ovarienne	?	-
VLDLR	X	-

Si la plupart des transcrits identifiés ont permis d'obtenir des produits d'expression complets, certains, minoritaires, présentent des séquences partielles ou incomplètement assemblées. Dans ce dernier cas citons la Vtg hépatique d'*Heterotis* dont le domaine phosvitine est constitué

d'une série de sérines que l'assembleur TRINITY peine à assembler compte tenu de la répétition du codon AGC. Par ailleurs, il semble que l'ARNm des Vtg ait tendance à se fragmenter au niveau du domaine polysérine de la phosvitine ; ce qui rend difficile l'assemblage à ce niveau.

Il a été également réalisé une analyse fonctionnelle sur la Vtg présente dans le mucus dont il était suspecté qu'elle puisse jouer un rôle dans la détection olfactive des femelles matures par les mâles. Les tests réalisés sur le mucus en spectrométrie de masse n'ont pas permis de mettre en évidence la capacité de la Vtg ou de ses produits de clivage à diffuser dans le milieu aquatique. Ce qui signifie que le signal chimique qui est suspecté de jouer un rôle dans la formation des couples est sans doute d'une autre nature.

Chez les Cichlides où ces mécanismes ont été bien décrits (Maruska & Fernald, 2012), les mâles libèrent avec l'urine des phéromones sexuelles de structure complexes qui permettent de synchroniser la ponte de 2 ou 3 femelles.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ouvrent des perspectives d'investigation importantes chez les Ostéoglossiformes et permettent désormais d'envisager une exploration fonctionnelle constituée d'approches in vitro et in vivo, ces dernières étant fondamentales dans un contexte qui s'inscrit dans le développement d'une pisciculture durable et respectueuse de l'environnement. Il s'agira par exemple :

- de suivre les niveaux circulants des neurohormones hypophysaires avec des outils quantitatifs spécifiques tels que l'ELISA ou la spectrométrie de masse ;
- de caractériser l'ensemble du neuropeptidome et d'une façon générale l'ensemble du peptidome régulateur pour faciliter l'interprétation des études physiologiques ;
- d'utiliser des outils moléculaires pour faciliter la formulation d'aliments adaptés aux différentes phases d'élevage.

3. Trois méthodes pour sexer *H. niloticus*, un poisson dépourvu de dimorphisme sexuel

Depuis les premiers essais du développement de la pisciculture de *H. niloticus* en 1955, constituer des couples de reproducteurs pour la production d'alevins est rendu difficile à cause de l'absence de dimorphisme sexuel et de techniques de sexage fiables.

A partir de ces travaux de thèse, le sexe d'individus matures de *H. niloticus* peut être déterminé selon trois techniques mises au point. On a le choix entre l'analyse en spectrométrie de masse et l'utilisation de tests ELISA de l'anticorps anti Vtg de *A. gigas* et de l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*. Le kit de sexage de *A. gigas* et l'anticorps anti Vtg de *O. bicirrhosum* n'ont pas donné de résultats satisfaisants et ne peuvent être recommandés pour sexer des individus matures de *H. niloticus*.

Détection de la Vtg par spectrométrie de masse. Les analyses protéomiques apparaissent de plus en plus comme de puissants outils pour identifier des protéines d'intérêt impliquées dans les processus physiologiques comme la vitellogenèse. Dans un environnant non exposé aux substances mimétiques des œstrogènes naturels, appelés xénoestrogènes, le précurseur des protéines vitellines (la Vtg) sont présents uniquement chez les femelles matures des poissons qui y vivent. Cette caractéristique a été utilisée pour rechercher la Vtg ou ses produits de clivage dans le plasma et le mucus de reproducteurs de *H. niloticus*. Les bases de données transcriptomiques et protéomiques ont donc permis de valider chez *H. niloticus* le sexage des géniteurs par la détection en spectrométrie de masse de Vtg dans le sang et le mucus de femelles matures ou en gamétogenèse. Ces analyses à la fois qualitatives et quantitatives révèlent en outre des niveaux très variables de concentrations en Vtg dans le mucus. On peut donc se poser la question de l'existence d'une corrélation entre la concentration détectée dans le mucus et le stade de maturité. Si cette corrélation est avérée, le stade de maturité pourrait ainsi être déterminé par une méthode non invasive grâce à un simple prélèvement de mucus. De nouvelles investigations sont prévues pour vérifier cette hypothèse chez les 2 espèces étudiées. La Vtg est un biomarqueur intéressant pour le sexage d'espèces ne présentant pas de dimorphismes sexuels évidents.

Anticorps anti Vtg de *A. gigas* / anticorps anti Vtg de *H. niloticus*. Le sexage de *H. niloticus* peut aussi être réalisé en effectuant un dosage plasmatique par ELISA comme celui développé par (Chu-Koo et al., 2009) pour *A. gigas*. L'anticorps anti Vtg de *A. gigas* a été produit spécialement pour sexer des individus matures de cette espèce qui ne présentent pas de dimorphisme sexuel en dehors de la saison de reproduction. En raison de la proximité phylogénétique des deux espèces d'*Arapaimidae*, cet anticorps a été testé sur *H. niloticus* et les résultats obtenus ont permis de différencier les deux sexes pour une dilution au 10000^{e} de l'anticorps et des dilutions au 1000^{e}, 5000^{e} et 10000^{e} du plasma de *H. niloticus*.

Quant à l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus*, il a été produit au cours de cette thèse et a permis de différencier également les deux sexes de *H. niloticus* et non ceux de *A. gigas* malgré leur proximité phylogénétique. Les résultats satisfaisants ont été observés dans les mêmes conditions de dilution que celles de l'anticorps anti Vtg de *A. gigas*. L'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* peut être considéré comme très spécifique en attendant que des expérimentations montrent son éventuelle réaction positive avec d'autres Vtg.

Le protocole pour produire ces deux anticorps est facile à mettre en place et l'utilisation de lapins immunisés avec des solutions émulsifiées de Vtg purifiée est autorisée dans les pays de leurs zones de distribution. Les équipements de laboratoire utilisés sont très courants ce qui permet de développer un anticorps spécifique en quelques mois seulement. L'appartenance des deux espèces sœurs à des bassins hydrographiques transcontinentaux (Afrique et Amérique du Sud) milite en faveur de l'anti corps anti Vtg de *H. niloticus* à cause de la disponibilité de plasma sur place pour le produire. En plus, la Vtg de *H. niloticus* semble plus sensible à cet anticorps que ne l'est l'anticorps anti Vtg de *A. gigas*.

Les deux approches – spectrométrie de masse et ELISA – sont complémentaires avec un avantage pour l'ELISA qui est pour l'instant la seule à être adaptée sur le terrain, ce qui n'est évidemment pas possible avec l'autre technique. La spectrométrie de masse possède par contre une sensibilité plus élevée que l'ELISA et permet de facilement discriminer les différentes Vtg quand elles existent, même si elles possèdent certains domaines en commun. Par contre, la mise en œuvre est beaucoup plus lourde avec une préparation d'échantillon plus complexe.

4. Comprendre le comportement reproducteur des *Arapaimidae* en étang de pisciculture, c'est désormais possible

Le développement de l'élevage des espèces de poissons passe par une maitrise de leur reproduction. Chez *A. gigas*, depuis quelques années, l'absence de dimorphisme sexuel ne constitue plus un obstacle pour différencier les sexes grâce à des méthodes de sexages fiables mises au point. La possibilité de distinguer les individus mâles des femelles en dehors de la saison de reproduction permet de constituer des lots de reproducteurs de sexe ratio 1 : 1 pour étudier le comportement reproducteur. La particularité de cette espèce est que sa reproduction n'est possible pour l'instant que dans des étangs en terre où la turbidité de l'eau ne permet pas des observations directes ou des enregistrements vidéo. A la suite de l'analyse de données préliminaires enregistrées chez un couple formé, une méthodologie de télémétrie acoustique mise en œuvre a montré son efficacité pour suivre le comportement reproducteur de *A. gigas*. Cette méthodologie est maitrisée et peut être transférée à *H. niloticus* qui se reproduit dans les conditions similaires à celles de *A. gigas*. Le suivi du comportement reproducteur de *H. niloticus* se fera avec des poissons choisis parmi les 59 individus mâtures qui ont pu être sexés par une analyse en spectrométrie de masse. Les équipements nécessaires à la réalisation de cette expérimentation sont en cours d'acquisition.

Septième partie

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aagaard, M. M., Siersbæk, R., & Mandrup, S. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Molecular basis for gene-speci fi c transactivation by nuclear receptors ☆. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1812*, 824–835. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.018

Acharjee, A., Chaube, R., & Joy, K. P. (2015). Molecular Cloning and Characterization of the Gonadotropin Subunits GP a , FSH b , and LH b Genes in the Stinging Cat fi sh Heteropneustes fossilis : Phylogeny , Seasonal Expression , and Pituitary Localization. *Journal of Experimental Zoology*, *323A*, 567–585. https://doi.org/10.1002/jez.1949

Adeyemo, A. O. (2013). Estimation of fillet yield for four tropical freshwater fish species. *Merit Research Journal of Environmental Science and Toxicology*, *1*(2), 12–15.

Adite, A., Winemiller, K. O., & Fiogbe, E. D. (2005). Ontogenetic, seasonal, and spatial variation in the diet of Heterotis niloticus (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) in the Sô River and Lake Hlan, Benin, West Africa. *Environmental Biology of Fishes*, *73*, 367–378. https://doi.org/10.1007/s10641-004-5563-9

Adite, A., Winemiller, K. O., & Fiogbe, E. D. (2006). Population structure and reproduction of the African bonytongue Heterotis niloticus in the So River-floodplain system (West Africa): implications for management. *Ecology of Freshwater Fish*, *15*(1), 30–39. https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2005.00119.x

Agulleiro, M. J., André, M., Morais, S., Cerdà, J., & Babin, P. J. (2007). High Transcript Level of Fatty Acid-Binding Protein 11 but Not of Very Low-Density Lipoprotein Receptor Is Correlated to Ovarian Follicle Atresia in a Teleost Fish (Solea senegalensis)1. *Biology of Reproduction*, *77*(3), 504–516. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061598

Akinneye, J. O., Amoo, I. A., & Arannilewa, S. T. (2007). Effect of Drying Methods on the Nutritional Composition of Three Species of Fish (Bonga sp. Sardinella sp. and Heterotis niloticus). *Journal of Fisheries International*, *2*(1), 99–103. https://doi.org/jfish.2007.99.103

Alarcón, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., & Alvarez, M. C. (2004).

Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (Sparus aurata). *Aquaculture*, *230*(1–4), 65–80. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00434-4

An, H. S., Hong, S. W., Lee, J. U., Park, J. Y., & Kim, K.-K. (2010). Genetic diversity of wild and farmed black sea bream populations in Jeju. *Animal Cells and Systems*, *14*(1), 37–44. https://doi.org/10.1080/19768351003765020

Aquadro, C., & Greenberg, B. D. (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution : analysis of nucleotide sequences from seven indivduals. *Genetics*, *103*, 287–312.

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, *81*(3), 1269–1304. https://doi.org/0031-9333/01

Arantes, C. C., Castello, L., Cetra, M., & Schilling, A. (2013). Environmental influences on the distribution of arapaima in Amazon floodplains. *Environmental Biology of Fishes*, *96*(10–11), 1257–1267. https://doi.org/10.1007/s10641-011-9917-9

Arantes, C. C., Castello, L., Stewart, D. J., Cetra, M., & Queiroz, H. L. (2010). Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian river-floodplain. *Ecology of Freshwater Fish*, *19*(3), 455–465. https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00431.x

Arao, Y., & Korach, K. S. (2008). The F domain of estrogen receptor alpha is involved in species-specific , tamoxifen-mediated transactivation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *195*(1–2), 94–100. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001212

Araripe, J., Rêgo, P. S. do, Queiroz, H., Sampaio, I., & Schneider, H. (2013). Dispersal Capacity and Genetic Structure of Arapaima gigas on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers. *PLoS ONE*, *8*(1), e54470. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054470

Arthofer, W., Heussler, C., Krapf, P., Schlick-Steiner, B. C., & Steiner, F. M. (2018). Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: A case study in fly culturing. *Fly*, *12*(1), 13–22. https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1396400

Arukwe, A., & Røe, K. (2008). Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (Salmo salar) exposed to nonylphenol. *Cell and Tissue Research*, *331*(3), 701–712. https://doi.org/10.1007/s00441-007-0543-y

Audet-Walsh, É., & Giguère, V. (2015). The multiple universes of estrogen-related receptor α and γ in metabolic control and related diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*, 51–61. https://doi.org/10.1038/aps.2014.121

Avarre, J. C., Lubzens, E., & Babin, P. J. (2007). Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipophorin II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evolutionary Biology*, *7*, 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-3

Avise, J. C. (2009). Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, *36*(1), 3–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x

Avise, J. C. (2010). Perspective : conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics*, *11*, 665–669. https://doi.org/10.1007/s10592-009-0006-y

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., … Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1), 489–522. https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (2008). Intraspecific Phylogeography : The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1987), 489–522.

Baillard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, *13*, 729–744. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x

Bajari, T. M., Lindstedt, K. A., Riepl, M., Mirsky, V. M., Nimpf, J., Wolfbeis, O. S., … Schneider, W. J. (1998). A minimal binding domain of the low density lipoprotein receptor family. *Biological Chemistry*, *379*(8–9), 1053–1062.

Baker, A. J., Piersma, T., & Rosenmeier, L. (1994). Unraveling the Intraspecific Phylogeography of Knots Calidris canutus : a Progress Report on the Search for Genetic Markers. *Journal of Ornithology*, *135*, 599–608.

Baktoft, H., Zajicek, P., Klefoth, T., Svendsen, J. C., Jacobsen, L., Pedersen, M. W., … Arlinghaus, R. (2015). Performance Assessment of Two Whole-Lake Acoustic Positional Telemetry Systems - Is Reality Mining of Free-Ranging Aquatic Animals Technologically Possible ? *PLoS ONE*, *10*, e0126534. https://doi.org/10.5061/dryad.24bg4

Balland, P., & Roux, A. (2005). Pêche et gestion piscicole en Guyane. *Ministère de L'écologie et Du Développement Durable. Rapport de L'inspection Générale de L'environnement*, 1–55.

Bandelt, H.-J., Forster, P., & Rohl, A. (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecic Phylogenies. *Molecular Biology*, *16*(1), 37–48. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Bard, J. (1973). Les poissons de la famille des osteoglossidae et la piscicultura. *Revue Bois et Forets Des Tropiques*, *147*, 63–73.

Bard, J., & Imbiriba, E. P. (1985). Pisciculture du Pirarucu. *Bois et Forêts Des Tropiques*, *209*, 83–89.

Bard, J., & Imbiriba, E. P. (1986). Piscicultura do pirarucu, Arapaima gigas. *Series Documentos - Circular Técnica*, *52*, 17.

Bauchot, R., Ridet, J.-M., & Diagne, M. (1993). The epibranchial organ, its innervations and its probable functioning in Heterotis niloticus (Pisces, Teleostei, Osteoglosssidae). *Environmental Biology of Fishes*, *37*, 307–315.

Baudiffier, D. (2012). Modes de perturbation de la stéroïdogenèse testiculaire et de la spermatogenèse chez le poisson zèbre (Danio rerio) par des fongicides azolés. *Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1*, 1–178.

Baumann, L., Holbech, H., Keiter, S., Kinnberg, K. L., Knörr, S., Nagel, T., & Braunbeck, T. (2013). The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. *Aquatic*

Toxicology, *128–129*, 34–42. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.016

Begout, M., & Lagardere, J. (1995). An acoustic telemetry study of seabream (Sparus aurata L .): first results on activity rhythm , effects of environmental variables and space utilization. *Hydrobiologia*, *300/301*, 417–423.

Bennetau-Pelissero, C., Latonnelle, K. G., Lamothe, V., Shinkaruk-Poix, S., & Kaushik, S. J. (2004). Screening for oestrogenic activity of plant and food extracts using in vitro trout hepatocyte cultures. *Phytochemical Analysis*, *15*(1), 40–45. https://doi.org/10.1002/pca.741

Bernacsek, G. M., & Powles, H. (1992). Potentialités piscicoles des écosystèmes fluvio-lacustres de la Côte d'Ivoire. *Centre de Recherche Pour Le Développement International*, 1–426.

Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., … Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 162. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0958-3

Bhanu, S. V, & Philip, B. (2011). Effect of ethanol on branchial adenosine triphosphatases in Oreochromis mossambicus (Peters). *Toxicology International*, *18*(1), 27. https://doi.org/10.4103/0971-6580.75849

Birky, C. W., Fuerst, P., & Maruyamat, T. (1989). Organelle Gene Diversity Under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach h to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to Nuclear Gen. *Genetics*, *121*, 613–627.

Birky, C. W., Maruyama, T., & Fuerst, P. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, *103*(3), 513–527.

Boettcher, P. J., Tixier-Boichard, M., Toro, M. A., Simianer, H., Eding, H., Gandini, G., … Ajmone-Marsan, P. (2010). Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, *41*(SUPPL. 1), 64–77. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02050.x

Bony, K. Y., Avit, J.-B. L. F., Gouan, C., Konan, K. F., Kouadio, K. C., & Yté, W. (2015).

Environmental parameters for the production of juveniles African bonytongue, Heterotis niloticus (Cuvier, 1829) in rice-fish pond. *European Journal of Zoological Research*, *4*(1), 12–18.

Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acuds Research*, *27*(8), 1767–1780.

Borella, M. I., Venturieri, A. R., & Mancera, A. J. M. (2009). Immunocytochemical identification of adenohypophyseal cells in the pirarucu (Arapaima gigas), an Amazonian basal teleost. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*, 3–16. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9254-x

Boursot, P., & Bonhomme, F. (1986). Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. *Génétique, Séléction, Evolution*, *18*(1), 73–98. https://doi.org/10.1186/1297-9686-18-1-73

Bousfield, G. R., & Dias, J. A. (2011). Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, (12), 289–302. https://doi.org/10.1007/s11154-011-9191-3

Braford, M. R. (1986). De Gustibus Non Est Disputandem: A Spiral Center for Taste in the Brain of the Teleost Fish, Heterotis niloticus. *Science (New York, N.Y.)*, *232*(4749), 489–491. https://doi.org/10.1126/science.232.4749.489

Brander, S. M., Cole, B. J., & Cherr, G. N. (2012). An approach to detecting estrogenic endocrine disruption via choriogenin expression in an estuarine model fish species. *Ecotoxicology*, *21*(4), 1272–1280. https://doi.org/10.1007/s10646-012-0879-2

Brauner, C. J., Matey, V., Wilson, J. M., Bernier, N. J., & Val, A. L. (2004). Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from Arapaima gigas, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. *Journal of Experimental Biology*, *207*(9), 1433–1438. https://doi.org/10.1242/jeb.00887

Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal RNA-Seq quantification. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 525–527.

Brooks, C. L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, *33*(4), 504–525. https://doi.org/10.1210/er.2011-1040

Brummett, R. E., Lazard, J., & Moehl, J. (2008). African aquaculture: Realizing the potential. *Food Policy*, *33*(5), 371–385. https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2008.01.005

Bry, C., Billard, R., & De Montalembert, G. (1978). Induction de la maturation ovocytaire et de l'ovulation par traitement hormonal chez le brochet (Esox lucius). *Bulletin Français de Pisciculture*, *271*, 21–32. https://doi.org/10.1051/kmae:1978003

Bryan, J. L., Wildhaber, M. L., Papoulias, D. M., Delonay, A. J., Tillitt, D. E., & Annis, M. L. (2007). Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology*, *23*(4), 411–419. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00889.x

Bryant, D. M., Johnson, K., Di Tommaso, T., Tickle, T., Couger, B. M., Payzin-Dogru, D., … Whited, J. L. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports*, *18*(3), 762–776. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063.A

Bu, G., Liang, X., Li, J., & Wang, Y. (2015). General and Comparative Endocrinology Extra-pituitary prolactin (PRL) and prolactin-like protein (PRL-L) in chickens and zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, *220*, 143–153. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.001

Buathong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Naaglor, T., Taamasri, P., Suwannahitatorn, P., & Tan-ariya, P. (2015). Development and evaluation of PCR methods based on cytochrome c oxidase subunit one (cox1) and NADH dehydrogenase subunit one gene (nad1) to detect Opisthorchis viverrini in human fecal samples. *Parasitology Research*, *114*(9), 3547–3549. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4640-7

Bulukin, E., Meucci, V., Minunni, M., Pretti, C., Intorre, L., Soldani, G., & Mascini, M. (2007). An optical immunosensor for rapid vitellogenin detection in plasma from carp (Cyprinus carpio). *Talanta*, *72*(2), 785–790. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.007

Carreiro, C. R. P., Furtado-Neto, M. A. D. A., Mesquita, P. E. C., & Bezerra, T. A. (2011). Sex determination in the Giant fish of Amazon Basin, Arapaima gigas (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy. *Acta Amazonica*, *41*(3), 415–

419. https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300012

Carrera, E., Renshaw, M. A., Winemiller, K. O., & Hurtado, L. A. (2011). Isolation and characterization of nuclear-encoded microsatellite DNA primers for the African bonytongue, Heterotis niloticus. *Conservation Genetics Resources*, *3*(3), 537–539. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9398-3

Carvajal-Vallejos, F. M., Van Damme, P. A., Cordova, L., & Coca, C. (2011). La introducción de Arapaima gigas (paiche) en la amazonía boliviana. In *Los peces y delfines de la Amazonía boliviana: hábitats, potencialidades y amenazas* (pp. 367–396).

Carvalho, F. R., Casatti, L., Manzotti, A. R., & Ravazzi, D. C. W. (2015). First record of Arapaima gigas (Schinz, 1822) (teleostei: Osteoglossomorpha), the "pirarucu", in the upper paraná river basin, southeast Brazil. *Check List*, *11*(5), 9–12. https://doi.org/10.15560/11.5.1729

Castellanos-Gell, J. (2012). Structure génétique des populations de trois espèces de poissons de récifs cubains : Stegastes partitus , Haemulon flavolineatum et Acanthurus tractus . *Thèse de Doctorat. Université Paris-Sud 11*, 1–138.

Castellanos-Gell, J., Robainas-Barcia, A., Casane, D., Chevalier-Monteagudo, P., Pina-Amargós, F., & García-Machado, E. (2012). The surgeonfish, Acanthurus bahianus, has crossed the Amazon-Orinoco outflow barrier. *Marine Biology*, *159*(7), 1561–1565. https://doi.org/10.1007/s00227-012-1942-5

Castello, L. (2004). A Method to Count Pirarucu Arapaima gigas : Fishers, Assessment, and Management. *North American Journal of Fisheries Management*, *24*(2), 379–389. https://doi.org/10.1577/M02-024.1

Castello, L. (2008a). Lateral migration of Arapaima gigas in floodplains of the Amazon. *Ecology of Freshwater Fish*, *17*(1), 38–46. https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2007.00255.x

Castello, L. (2008b). Nesting habitat of Arapaima gigas (Schinz) in Amazonian floodplains. *Journal of Fish Biology*, *72*(6), 1520–1528. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01778.x

Castello, L., Arantes, C. C., Mcgrath, D. G., Stewart, D. J., & De Sousa, F. S. (2015).

Understanding fishing-induced extinctions in the Amazon. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *25*(5), 447–458. https://doi.org/10.1002/aqc.2491

Castello, L., & Stewart, D. J. (2010). Assessing CITES non-detriment findings procedures for Arapaima in Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, *26*(1), 49–56. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01355.x

Ceapa, C., Williot, P., Le Menn, F., & Davail-Cuisset, B. (2002). Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (acipenser stellatus Pallas) during spawning migration in the Danube River. *Journal of Applied Ichthyology*, *18*(4–6), 391–396. https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00370.x

Celius, T., & Walther, B. T. (1998). Oogenesis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Endocrinology*, *158*(2), 259–266. https://doi.org/10.1677/joe.0.1580259

Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1986). Identification of primary transcriptional start sites of mouse mitochondrial DNA: accurate in vitro initiation of both heavy- and light-strand transcripts. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(5), 1446–1453. https://doi.org/10.1128/MCB.6.5.1446.Updated

Chatakondi, N. G., & Kelly, A. M. (2013). Oocyte Diameter and Plasma Vitellogenin as Predictive Factors to Identify Potential Channel Catfish, Ictalurus punctatus, Suitable for Induced Spawning. *Journal of the World Aquaculture Society*, *44*(1), 115–123. https://doi.org/10.1111/jwas.12001

Chen, Q., Takahashi, Y., Oka, K., & Ma, J. (2016). Functional Differences of Very-Low-Density Lipoprotein Receptor Splice Variants in Regulating Wnt Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(20), 2645–2654. https://doi.org/10.1128/MCB.00235-16.Address

Choi, C. Y., & Habibi, H. R. (2003). Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *204*(1–2), 169–177. https://doi.org/S030372070200182X [pii]

Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., … Nuñez, J. (2009). Gender determination in the Paiche or

Pirarucu (Arapaima gigas) using plasma vitellogenin, 17β-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*(1), 125–136. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9211-8

Chung-Davidson, Y. W., Huertas, M., & Li, W. (2011). A Review of Research in Fish Pheromones. *Chemical Communication in Crustaceans*, 467–482. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77101-4

CITES. (2018). Arapaima gigas. Retrieved March 8, 2018, from https://www.cites.org/eng/gallery/species/fish/arapaima_gigas.html

Cohen, A. M., & Banoub, J. H. (2011). Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism. In J. Banoub (Ed.), *Detection of biological agents for the prevention of bioterrorism* (pp. 301–318). https://doi.org/10.1007/978-90-481-9815-3

Cooke, S. J., Midwood, J. D., Thiem, J. D., Klimley, P., Lucas, M. C., Thorstad, E. B., … Ebner, B. C. (2013). Tracking animals in freshwater with electronic tags : past , present and future. *Animal Biotelemetry*, *1*, 5.

Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K. A. J., Gustafsson, J.-åke, & Korach, K. S. (1997). Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor-α (ERα) and Estrogen Receptor-β (ERβ) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ERα-Knockout Mouse. *Endocrinology*, *138*(11), 4613–4621.

Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., & Parker, M. G. (1997). Estrogen Receptors alpha and beta Form Heterodimers on DNA *. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(32), 19858–19862.

Cox, C. B. (1974). Vertebrate palaeodistributional patterns and continental drift. *Journal of Biogeography*, *1*(2), 75–94.

Da Costa, K. S., Gourène, G., Tito De Morais, L., & Van Den Audenaerde, D. F. E. T. (2000). Caracterisation des peuplements ichtyologiques de deux fleuves cotiers Ouest-Africains soumis a des amenagements hydroagricoles et hydroelectriques. *Vie et Milieu*, *50*(2), 65–77.

Da Costa, K. S., Traoré, K., & Tito De Morais, L. (1998). Effort de pêche et production exploitée dans les petites retenues du Nord de la Côte d'Ivoire. *Bull. Fr. Pêche Piscic*,

348, 65–78.

Dabbadie, L. (2002). Le pirarucu Arapaima gigas (Pisces, Osteoglossidae) : biologie, écologie et exploitation. *Formation CIRAD*, 1–12.

DAP. (2016a). Suivi des débarquements de la pêche continentale et lagunaire en Côte d'Ivoire. *Bulletin Statistique de La Direction de l'Aquaculture et Des Pêches*, *2*, 1–24.

DAP. (2016b). Suivi des débarquements de la pêche continentale et lagunaire en Côte d'Ivoire. *Bulletin Statistique de La Direction de l'Aquaculture et Des Pêches*, *4*, 1–24.

DAP. (2016c). Suivi des débarquements de la pêche continentale et lagunaire en Côte d'Ivoire. *Bulletin Statistique de La Direction de l'Aquaculture et Des Pêches*, *3*, 1–24.

DAP. (2016d). Suivi des débarquements de la pêche continentale et lagunaire en Côte d'Ivoire. *Bulletin Statistique de La Direction de l'Aquaculture et Des Pêches*, *5*, 1–24.

DCH. (1979). *Annuaire hydrographique de Côte d'ivoire* (Ministère). Abidjan, Côte d'Iboire.

Depierre, D., & Vivien, J. (1977). Une réussite du service forestier du Cameroun: L'introduction d'Heterotis niloticus dans le Nyong. *Bois et Forêts Des Tropiques*, *173*, 59–68.

Dettai, A., Gallut, C., Brouillet, S., Pothier, J., Lecointre, G., & Debruyne, R. (2012). Conveniently Pre-Tagged and Pre-Packaged: Extended Molecular Identification and Metagenomics Using Complete Metazoan Mitochondrial Genomes. *PLoS ONE*, *7*(12), e51263. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051263

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, *208*(3–4), 191–364. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1

DeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000). MicrosDeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine , freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 56, 461–473. https://doi.org/10.1006/jfbi.1999.1210atellite variation in marine , fres. *Journal of Fish Biology*, *56*, 461–473. https://doi.org/10.1006/jfbi.1999.1210

Dominguez, G. A., Bisesi, J. H., Kroll, K. J., Denslow, N. D., & Sabo-Attwood, T. (2014).

Control of Transcriptional Repression of the Vitellogenin Receptor Gene in Largemouth Bass (Micropterus Salmoides) by Select Estrogen Receptors Isotypes. *Toxicological Sciences*, *141*(2), 423–431. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu145

Dominguez, G. A., Quattro, J. M., Denslow, N. D., Kroll, K. J., Prucha, M. S., Porak, W. F., … Sabo-Attwood, T. L. (2012). Identification and Transcriptional Modulation of the Largemouth Bass, Micropterus salmoides, Vitellogenin Receptor During Oocyte Development by Insulin and Sex Steroids1. *Biology of Reproduction*, *87*(3), 1–12. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099812

Doudet, T. (1979). La Pêche artisanale dans la retenue artificielle d'Ayamé (Côte-d4Ivoire). *Bois et Forêts Des Tropiques*, *185*, 57–70.

Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, *19*, 11–15. Retrieved from https://ci.nii.ac.jp/naid/10021087108

Dugué, R., Chu Koo, F., Alcántara Bocanegra, F., Duponchelle, F., Renno, J. F., & Nuñez, J. (2008). Purification and assay of Arapaima gigas vitellogenin : Potential use for sex determination by. *Cybium*, *32*(2), 111.

Duvernell, D. D., Lindmeier, J. B., Faust, K. E., & Whitehead, A. (2008). Relative influences of historical and contemporary forces shaping the distribution of genetic variation in the Atlantic killifish , Fundulus heteroclitus. *Molécular Ecology*, *17*, 1344–1360. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03648.x

Edoghotu, A. J., & Hart, I. A. (2014). Feeding Habit of Heterotis niloticus of Kugbo Creek in Niger Delta, Nigeria.\n\n. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, *8*(10), 26–29. Retrieved from www.iosrjournals.org

Edwards, A. L., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, T., & Chakraborty, R. (1992). Genetic Variation at Five Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in Four Human Population Groups chromosomes. *Genomics*, *12*, 241–253.

Edwards, C. E., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2008). Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to test hypotheses of current hybridization , ancient hybridization and incomplete lineage sorting in Conradina (Lamiaceae). *Molecular Ecology*, *17*, 5157–5174. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03985.x

Ekanem, A. P., Ndome, C. B., & Osuagwu, M. N. (2010). Techniques in the improvement of consumers' taste of Heterotis niloticus. *African Journal of Food Science*, *4*(10), 676–678.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–567. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

Excoffier, L., & Slatkin, M. (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, *12*(5), 921–927. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040269

Ezekiel, E. N., & Abowei, J. F. N. (2013). Length-Weight Relationship and Condition Factor of Heterotis niloticus from Amassoma flood plain , Niger Delta , Nigeria . *Applied Science Report*, *4*(1), 164–172.

Faria, M. T., Carvalho, R. F., Sevilhano, T. C. A., Oliveira, N. A. J., Silva, C. F. P., Oliveira, J. E., … Bartolini, P. (2013). Isolation of the pituitary gonadotrophic α-subunit hormone of the giant amazonian fish: Pirarucu (Arapaima gigas). *Fish Physiology and Biochemistry*, *39*(3), 683–693. https://doi.org/10.1007/s10695-012-9730-1

Farias, I. P., Hrbek, T., Brinkmann, H., Sampaio, I., & Meyer, A. (2003). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for Arapaima gigas , an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, *3*, 128–130. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286

Farias, I. P., Leão, A., Almeida, Y. S., Verba, J. T., Crossa M., M., Honczaryk, A., & Hrbek, T. (2015). Evidence of polygamy in the socially monogamous Amazonian fish Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes, Arapaimidae). *Neotropical Ichthyology*, *13*(1), 195–204. https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140010

Feng, W., Matzuk, M. M., Mountjoy, K., Bedows, E., Ruddon, R. W., & Boime, I. (1995). Ehe Asparagine-linked Oligosaccharides of the Human Chorionic Gonadotropin β Subunit Facilitate Correct Disulfide Bond Pairing. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 11851–11859.

Finn, R. N. (2007). Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins1. *Biology of Reproduction*, *76*(6), 926–935.

https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059766

Finn, R. N., & Kristoffersen, B. A. (2007). Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the “3R hypothesis”: Correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE*, *2*(1), e169. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000169

Flores, H. G. (1980). Desarrollo sexual del paiche (Arapaima gigas) en mas zonas reservadas del estado (ríos Pacaya y Samiria) 1971-1975. *Inf. Inst. Mar*, *67*, 1–14.

Ford, P. (2017). Les Pirarucus de Mamirauá. *Voyages de Pêche*, 54–62.

Fox, J. (2005). The R Commander. *Journal of Statistical Software*, *14*(9), 1–42.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1523–1631. https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50037-3

Fujita, T., Scott, A. P., Katsiadaki, loanna, Amano, H., Hong, L., Hiramatsu, N., … Hara, A. (2009). Purification of Multiple Precursors for Egg Chorion Proteins in Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Zoological Science*, *26*(12), 870–877. https://doi.org/10.2108/zsj.26.870

Fujita, T., Shimizu, M., Hiramatsu, N., Fukada, H., & Hara, A. (2002). Purification of serum precursor proteins to vitelline envelope (choriogenins) in masu salmon, Oncorhynchus masou. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *132*(3), 599–610. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00075-1

Galdames-portus, M. I., Noble, R. W., Farmer, M., Powers, D. A., Riggs, A., Brunori, M., … Fyhn, U. E. H. (1978). Studies of the functional properties of the hemoglobins of Osteoglossum bicirrhosum an Arapaima gigas. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *62A*, 145–154. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/0300962979907473/1-s2.0-0300962979907473-main.pdf?_tid=935954a8-937b-11e7-a459-00000aab0f27&acdnat=1504754642_b84e6a73670ba375b84b8c2272586223

Gao, X. M., Zhou, Y., Zhang, D. D., Hou, C. C., & Zhu, J. Q. (2019). Multiple vitellogenin genes (vtgs) in large yellow croaker (Larimichthys crocea): molecular characterization and expression pattern analysis during ovarian development. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*, 829–848. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0569-y

Garcia-Davila, C., Castro-Ruiz, D., Chota-Macuyama, W., Biffi, C., Deza, S., Bazan, R., … Renno, J.-F. (2011). Caracterización genética de ejemplares de paiche Arapaima gigas (cuvier , 1829) utilizados en el repoblamiento del lago Imiria (cuenca del río Ucayali). *Folia Amazónica*, *20*(1–2), 67–75.

Genovese, G., Regueira, M., Da Cuña, R. H., Ferreira, M. F., Varela, M. L., & Lo Nostro, F. L. (2014). Nonmonotonic response of vitellogenin and estrogen receptor α gene expression after octylphenol exposure of Cichlasoma dimerus (Perciformes, Cichlidae). *Aquatic Toxicology*, *156*, 30–40. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.019

Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors : From Gene to Function *. *Endocrine Reviews*, *20*(5), 689–725.

Girard, G., Sircoulon, J., & Touchebeuf, P. (1970). *Aperçu sur les régimes hydrologiques de Côte d'Ivoire*. 1–60.

Glover, K. A., Dahle, G., & JØrstad, K. E. (2011). Genetic identification of farmed and wild Atlantic cod, Gadus morhua, in coastal Norway. *ICES Journal of Marine Science*, *68*(5), 901–910. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsr048

Glover, K. A., Dahle, G., Westgaard, J. I., Johansen, T., Knutsen, H., & Jørstad, K. E. (2010). Genetic diversity within and among Atlantic cod (Gadus morhua) farmed in marine cages: A proof-of-concept study for the identification of escapees. *Animal Genetics*, *41*(5), 515–522. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02025.x

Godinho, H. P., Santos, J. E., Formagio, P. S., & Guimarães-cruz, R. J. (2005). Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish Rapaima gigas (Scinz, 1822). *Acta Zoologica*, *86*, 289–294.

Godinho, R., Crespo, G., & Ferrand, N. (2008). The limits of mtDNA phylogeography : complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology*, *17*, 4670–4683. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03929.x

Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., & Martial, J. A. (1996). Sequence-Function Relationships Within the Expanding. *Endocrine Reviews*, *17*(4), 385–410.

Gontier-Latonnelle, K., Cravedi, J. P., Laurentie, M., Perdu, E., Lamothe, V., Le Menn, F., & Bennetau-Pelissero, C. (2007). Disposition of genistein in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and siberian sturgeon (Acipenser baeri). *General and Comparative Endocrinology*, *150*(2), 298–308. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.10.001

Gourène, G., Teugels, G. G., & Van Den Audenaerde, D. F. E. T. (1995). Manuel pratique d'identification des poissons du lac d'Ayamé (Rivière Bia, Côte-d'Ivoire). *Centre de Recherche Océanographique, Archives Scientifiques*, *XIV*(1), 1–41.

Grabherr, M., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., … Regev, A. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883.Trinity

Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The American Genetic Association*, *89*, 415–426. Retrieved from https://pdfs.semanticscholar.org/7a16/7f39e62354c15e9f243398891c9a615d5bfc.pdf

Guo-Qing, L., & Wilson, M. V. H. (1996). The discovery of Heterotidinae (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene Paskapoo Formation of Alberta, Canada. *Journal of Vertebrate Paleontology*, *16*(2), 198–209. https://doi.org/10.1080/02724634.1996.10011308

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., … Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. In *Nature Protocols* (Vol. 8). https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084.De

Hallerman, E. M. (2006). Use of Molecular Tools for Research and Improvement of Aquaculture Stocks. *Aquaculture*, *58*(4), 286–296.

Hamidi, Z., Tejero, E., Schmidt, R., Tucker, R., & Pedro, A. (2017). Identification of potential blood-derived extracellular vesicles biomarkers to diagnose and predict distant metastases in ER+ breast cancer patients. *bioRxiv*, 202291. https://doi.org/10.1101/202291

Hamoy, I. G., Santos, E. J. M., & Santos, S. E. B. (2008). Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in Arapaima gigas by PCR multiplex panel of eight microsatellites. *Genetics and Molecular Research*, *7*(1), 29–32. https://doi.org/10.4238/vol7-1gmr394

Hara, A., Hiramatsu, N., & Fujita, T. (2016). Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, *82*(2), 187–202. https://doi.org/10.1007/s12562-015-0957-5

Hare, M. P., Nunney, L., Schwartz, M. K., Ruzzante, D. E., Burford, M., Waples, R. S., … Palstra, F. (2011). Understanding and Estimating Effective Population Size for Practical Application in Marine Species Management. *Conservation Biology*, *25*(3), 438–449. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01637.x

Hartl, D. L., & Clark, A. G. (2007). *Principles of population genetics*. *4th editio*, 1–652. https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90076-4

Hawkins, M. B., & Thomas, P. (2004). The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERβa are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology*, *145*(6), 2968–2977. https://doi.org/10.1210/en.2003-0806

Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A., & Thomas, P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(20), 10751–10756. https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10751

Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., & Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, *70*(1), 273–290.

Hilton, E. J. (2001). Tongue Bite Apparatus of Osteoglossomorph Fishes: Variation of a Character Complex. *Copeia*, *2001*(2), 372–381.

Hilton, E. J. (2003). Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society*, *137*(1), 1–100. https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00032.x

Hiramatsu, N., Fukadal, H., Sullivan, C. V, & Hara, A. (2001). Simple and Sensitive Detection of Vitellogenin Receptor (s) in Sakhalin Taimen (Hucho perryi). *Bull. Fish*

Sci. Hokkaido Univ., *52*(1), 5–9.

Hiramatsu, N., Luo, W., Reading, B. J., Sullivan, C. V., Mizuta, H., Ryu, Y.-W., … Hara, A. (2013). Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts. *Fish Physiol Biochem*, *39*, 29–32. https://doi.org/10.1007/s10695-012-9612-6

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C. V., & Hara, A. (2006). Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, *149*(1), 35–47. https://doi.org/10.1007/s00227-005-0214-z

Honeycutt, R. L., Nedbal, M. A., Adkins, R. M., & Janecek, L. L. (1995). Mammalian Mitochondrial DNA Evolution : A Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase II Genes. *Journal of Molecular Evolution*, *40*, 260–272.

Hrbek, T., Crossa, M., & Farias, I. P. (2007). Conservation strategies for Arapaima gigas (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, *67*(4 suppl), 909–917. https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000500015

Hrbek, T., & Farias, I. P. (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (Arapaima gigas, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genetics and Molecular Biology*, *31*(1 suppl), 293–302. https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200024

Hrbek, T., Farias, I. P., Crossa, M., Sampaio, I., Porto, J. I. R., & Meyer, A. (2005). Population genetic analysis of Arapaima gigas, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, *8*(3), 297–308. https://doi.org/10.1017/S1367943005002210

Hrbek, T., & Meyer, A. (2003). Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of Eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae)\rDepartment of Biology, University of Konstanz, Konstanz, Germany. *Journal of Evolutionary Biology*, *16*, 17–36. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00475.x

Huang, X., Hui, M. N. Y., Liu, Y., Yuen, D. S. H., Zhang, Y., Chan, W. Y., … Cheng, C. H. K. (2009). Discovery of a Novel Prolactin in Non-Mammalian Vertebrates : Evolutionary Perspectives and Its Involvement in Teleost Retina Development. *PLoS ONE*, *4*(7), e6163. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006163

Huertas, M., Almeida, O. G., Canário, A. V. M., & Hubbard, P. C. (2014). Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology*, *196*, 106–111. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.024

Hurtado, L. A., Carrera, E., Adite, A., & Winemiller, K. O. (2013). Genetic differentiation of a primitive teleost, the African bonytongue Heterotis niloticus, among river basins and within a floodplain river system in Benin, West Africa. *Journal of Fish Biology*, *83*(3), 682–690. https://doi.org/10.1111/jfb.12198

Inoue, J. G., Kumazawa, Y., Miya, M., & Nishida, M. (2009). The historical biogeography of the freshwater knifefishes using mitogenomic approaches : A Mesozoic origin of the Asian notopterids (Actinopterygii : Osteoglossomorpha) African notopterids Asian notopterids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *51*(3), 486–499. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.020

IRD. (2008). Vers la domestication du plus grand poisson de l'Amazone. *Actualité Scientifiques*, *306*, 1–2.

Ishibashi, H., Uchida, M., Koyanagi, A., Kagami, Y., Kusano, T., Nakao, A., … Arizono, K. (2016). Gene expression analyses of vitellogenin, choriogenin and estrogen receptor subtypes in the livers of male medaka (Oryzias latipes) exposed to equine estrogens. *Journal of Applied Toxicology*, *36*(11), 1392–1400. https://doi.org/10.1002/jat.3292

IUCN. (2017). The IUCN Red List of Threatened Species. version 2017-3. Retrieved March 8, 2018, from https://www.iucnredlist.org/species/1991/9110195

Kashi, Y., King, D., & Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, *13*(2), 74–78.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., … Chambon, P. (1995). Activation of the Estrogen Receptor Through ~hosphorylation by Mi togen-Activated Protein Kinase. *Science*, *270*, 1491–1494. https://doi.org/10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2011.17.025

Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Shimizu, A., Sano, K., Iuchi, I., & Nishida, M. (2010). Conservation of the egg envelope digestion mechanism of hatching enzyme in euteleostean fishes. *FEBS Journal*, *277*(23), 4973–4987. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07907.x

Kimou, N. B., Koumi, R. A., Koffi, M. K., Atsé, C. B., Ouattara, I. N., & Kouamé, P. L. (2016). Utilisation des sous-produits agroalimentaires dans l'alimentation des poissons d'élevage en Côte d'Ivoire. *Cahiers Agricultures*, *25*(2). https://doi.org/10.1051/cagri/2016012

Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D. F., & Koide, S. (2007). Identification of Regions within the F Domain of the Modulating Transactivation and Protein-Protein Interactions. *Molecular Endocrinology*, *21*(4), 829–842. https://doi.org/10.1210/me.2006-0203

Kong, H. J., Kim, J. L., Moon, J. Y., Kim, W. J., Kim, H. S., Park, J. Y., … An, C. M. (2014). Characterization, expression profile, and promoter analysis of the Rhodeus uyekii vitellogenin Ao1 gene. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18804–18818. https://doi.org/10.3390/ijms151018804

Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA : Fast and accurate filtering of BIOINFORMATICS SortMeRNA : Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211–3217. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611

Koshi, Y., & King, D. G. (2006). Simple sequence repeats as advantageous molecular markers –mutations in evolution. *Trends in Genetics* ., *22*(5), 252–259.

Kottelat, M. (2013). The fishes of the inland waters of Southeast Asia: A catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries. *Raffles Bulletin of Zoology*, (SUPPL.27), 1–663.

Kouakou, F. K. I., Koné, T., Agnissan, A. J.-P., Soro, Y., & N'Da, K. (2016). Régime et éthologie alimentaires de Heterotis niloticus (Cuvier, 1829) dans la rivière Agnéby. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, *14*(3), 721–732.

Kouakou, F. K. I., Koné, T., Soro, Y., N'Da, K., & Ouattara, M. (2016). Reproduction De Heterotis Niloticus (Cuvier, 1829) De La Riviere Agneby (Cote d'Ivoire). *European Scientific Journal*, *12*(6), 83–96. https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n6p83

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580.

https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315

Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., … Jasuja, R. (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, *2011*, 1–7. https://doi.org/10.4061/2011/812540

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Kumazawa, Y., & Nishida, M. (2000). Molecular Phylogeny of Osteoglossoids : A New Model for Gondwanian Origin and Plate Tectonic Transportation of the Asian Arowana. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(12), 1869–1878.

Kynard, B., & Kieffer, M. (2002). Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *Journal of Applied Ichthyology*, *18*(4–6), 505–508. https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00388.x

Labadie, P. (2004). *Détermination des stéorides hormonaux dans l'environnement : développements analytiques et applications*. Université de Bordeau I.

Ladoukakis, E. D., & Zouros, E. (2001). Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (Mytilus galloprovincialis) Mitochondrial DNA. *Molecular Biology*, *18*(7), 1168–1175.

Lavoué, S. (2016). Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *99*, 34–43. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.008

Lavoué, S., Miya, M., Arnegard, M. E., McIntyre, P. B., Mamonekene, V., & Nishida, M. (2011). Remarkable morphological stasis in an extant vertebrate despite tens of millions of years of divergence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1708), 1003–1008. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1639

Lavoué, S., & Sullivan, J. P. (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes

(Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *33*(1), 171–185. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.021

Lazard, J. (1990). Transferts de poissons et développement de la production piscicole. *Revue Hydrobiologie Tropicale*, *23*(3), 251–265.

Le Menn, F. (1979). Induction of vitellogenin by estradiol and androgens in a teleostean fish: Gobius niger L. *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences*, *289*(4), 413–416. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/117947

Le Menn, F. (1979). Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: Gobius niger L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *62*(2), 495–499. https://doi.org/10.1016/0300-9629(79)90092-6

Leduc, A., Zatylny-Gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, G. Le, Castel, H., … Henry, J. (2018). Dietary aquaculture by-product hydrolysates: Impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (Dicentrarchus labrax) fed low fish meal diets. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0

Lee, C., Jeon, S. H., Na, J.-G., Choi, Y.-J., & Park, K. (2002). Sensitivities of mRNA Expression of Vitellogenin, Choriogenin and Estrogen Receptor by Estrogenic Chemicals in Medaka, Oryzias latipes. *Journal of Health Science*, *48*(5), 441–445. https://doi.org/10.1248/jhs.48.441

Lee, C., Jeon, S. H., Na, J. G., & Park, K. (2002). Sequence analysis of choriogenin H gene of medaka (*Oryzias latipes*) and mRNA expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(8), 1709–1714. https://doi.org/10.1002/etc.5620210824

Lemasson, L. (1957). Chronique piscicole. *Bois et Forêts Des Tropiques*, *54*, 53–55.

Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S. (2006). Estrogen receptor (ER) beta isoforms : A key to understanding ER beta signaling. *PNAS*, *103*(35), 13162–13167.

Lévêque, C., & Paugy, D. (1999). *Les poissons des eaux continentales africaines: Diversité, écologie, utilisation par l'homme*.

Lévêque, C., & Paugy, D. (2006). Distribution géographique et affinités des poissons d'eau douce africains. In C. Lévêque & D. Paugy (Eds.), *Les poissons des eaux continentales*

africaines: Diversité, écologie, utilisation par l'homme (IRD, pp. 59–74). Paris.

Lévêque, C., Paugy, D., & Teugels, G. G. (1990). Faune des poisson d'eaux douces et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest Tome 1. *Faune Tropicale, XXVIII*, 1–384.

Li, A., Sadasivam, M., & Ding, J. L. (2003). Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. The first three ligand-binding repeats of VtgR interact with the amino-terminal region of Vtg. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(5), 2799–2806. https://doi.org/10.1074/jbc.M205067200

Li, Z., Chen, F., Huang, C., Zheng, W., Yu, C., Cheng, H., & Zhou, R. (2017). Genome-wide mapping and characterization of microsatellites in the swamp eel genome. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03330-7

López, J. L., Marina, A., Álvarez, G., & Vázquez, J. (2002). Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics*, *2*(12), 1658–1665. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200212)2:12<1658::AID-PROT1658>3.0.CO;2-4

Lüling, K. H. (1964). Zur biologie und ökologie von Arapaima gigas (Pisces; Lüling; Osteoglossidae). *Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere*, *54*, 436–530.

Lundrigan, T. A., Reist, J. D., & Ferguson, M. M. (2005). Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (Salvelinus alpinus) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture*, *244*(1–4), 63–75. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.027

Luo, W., Ito, Y., Mizuta, H., Massaki, K., Hiramatsu, N., Todo, T., … Hara, A. (2013). Molecular cloning and partial characterization of an ovarian receptor with seven ligand binding repeats, an orthologue of low-density lipoprotein receptor, in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *166*(2), 263–271. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.026

Lynch, M., & Crease, T. J. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, *7*(4), 377–394. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040607

Macnaughton, A. E. A. E., Carvajal-Vallejos, F. M. F. M., Argote, A., Rainville, T. K. T. K., Van Damme, P. A. P. A., & Carolsfeld, J. (2015). "Paiche reigns!" species introduction and indigenous fisheries in the Bolivian Amazon. *Maritime Studies*, *14*(1), 11. https://doi.org/10.1186/s40152-015-0030-0

Magrané, J., Casaroli-Marano, R. P., Reina, M., Gafvels, M., & Vilaro, S. (1999). The role of O-linked sugars in determining the very low density lipoprotein receptor stability or release from the cell. *FEBS Letters*, *451*, 56–62.

Mañanós, E., Núñez-Rodríguez, J., Le Menn, F., Zanuy, S., & Carrillo, M. (2007). Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (Dicentrarchus labrax). *Reproduction Nutrition Development*, *37*, 51–61. https://doi.org/10.1051/rnd:19970106

Manzon, L. A. (2002). The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation : A Review. *General and Comparative Endocrinology*, *125*, 291–310. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7746

Marcos, P. L., & Adalberto, L. V. (2015). Differentially expressed genes in the pituitary of the Amazonian fish Arapaima gigas. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, *7*(8), 132–141. https://doi.org/10.5897/IJFA15.0473

Marlatt, V. L., Martyniuk, C. J., Zhang, D., Xiong, H., Watt, J., Xia, X., … Trudeau, V. L. (2008). Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17β-estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *283*(1–2), 38–48. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.10.013

Marre, P. (2011). Arapaima, roi de l'Amazonie. *Produits de La Mer*, *128*, 70–71.

Maruska, K. P., & Fernald, R. D. (2011). Social Regulation of Gene Expression in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Physiology*, *26*(6), 412–423. https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2011

Maruska, K. P., & Fernald, R. D. (2012). Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *Journal of Experimental Biology*, *215*(1), 68–74. https://doi.org/10.1242/jeb.062794

Mcmillan, W. O., & Palumbi, S. R. (1997). Rapid Rate of Control-Region Evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution*, *45*, 473–484.

Mehdi, Y., & Ehsan, S. (2013). A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. *International Journal of Agricultural Research*, *1*(1), 15–21.

Meier, F., Beck, S., Grassl, N., Lubeck, M., Park, M. A., Raether, O., & Mann, M. (2015). Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device. *Journal of Proteome Research*, *14*(12), 5378–5387. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00932

Meisner, J. D., & Shuter, B. J. (1992). Assessing potential effects of global climate change on tropical freshwater fishes. *GeoJournal*, *28*(1), 21–27. https://doi.org/10.1007/BF00216403

Métivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hübner, M. R., Brand, H., Penot, G., … Gannon, F. (2002). A Dynamic Structural Model for Estrogen Receptor alpha Activation by Ligands , Emphasizing the Role of Interactions between Distant A and E Domaines. *Molecular Cell*, *10*, 1019–1032.

Meucci, V., & Arukwe, A. (2005). Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (Salmo salar) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *73*(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.021

Miranda-Chumacero, G., Wallace, R., Calderón, H., Calderón, G., Willink, P., Guerrero, M., … Chuqui, D. (2012). Distribution of arapaima (Arapaima gigas) (Pisces: Arapaimatidae) in Bolivia: implications in the control and management of a non-native population. *BioInvasions Records*, *1*(2), 129–138. https://doi.org/10.3391/bir.2012.1.2.09

Mizuta, H., Luo, W., Ito, Y., Mushirobira, Y., Todo, T., Hara, A., … Hiramatsu, N. (2013). Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *166*(1), 81–90. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.07.005

Molnar, R. I., Witte, H., Dinkelacker, I., Villate, L., & Sommer, R. J. (2012). Tandem-Repeat Patterns and Mutation Rates in Microsatellites of the Nematode Model Organism

Pristionchus pacificus. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *2*(9), 1027–1034. https://doi.org/10.1534/g3.112.003129

Moncaut, N., Nostro, F. Lo, & Maggese, M. C. (2003). Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish Cichlasoma dimerus (Heckel, 1840) induced by estradiol-17beta. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *63*(2), 127–137. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00175-3

Monentcham, S.-E., Whatelet, B., Pouomogne, V., & Kestemont, P. (2010). Egg and whole-body amino acid profile of African bonytongue (Heterotis niloticus) with an estimation of their dietary indispensable amino acids requirements. *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*(3), 531–538. https://doi.org/10.1007/s10695-009-9323-9

Monentcham, S. E., Kouam, J., Pouomogne, V., & Kestemont, P. (2009). Biology and prospect for aquaculture of African bonytongue, Heterotis niloticus (Cuvier, 1829): A review. *Aquaculture*, *289*(3–4), 191–198. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.019

Monentcham, S. E., Pouomogne, V., & Kestemont, P. (2010). Growth, feed utilization and body composition of African bonytongue, Heterotis niloticus, fingerlings fed diets containing various protein and lipid levels. *Aquaculture Research*, *41*(10), 438–445. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02480.x

Moreau, J. (1982). Exposé synoptique des données biologiques sur Heterotis niloticus (Cuvier, 1829). *FAO Synop. Pêches*, *131*, 1–45.

Moreau, J., & Moreau, I. (1982). Étude du cycle annuel de la gamétogenèse ches Heterotis niloticus au lac Ivakoina (zone des Pangalanes) Madagascar. *Rev. Hydrobiol. Trop*, *15*(3), 271–280.

Moreau, J., Palomares, M. L. D., Torres Jr., F. S. B., & Pauly, D. (1995). Atlas démographique des populations de poissons d'eau douce d'Afrique. *ICLARM Rapp. Tech.*, *45*, 1–140.

Mu, X., Wang, X., Song, H., Yang, Y., Luo, D., Gu, D., … Hu, Y. (2012). Mitochondrial DNA as effective molecular markers for the genetic variation and phylogeny of the family Osteoglossidae. *Gene*, *511*(2), 320–325. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.087

Murata, K., Conte, F. S., McInnis, E., Fong, T. H., & Cherr, G. N. (2014). Identification of the Origin and Localization of Chorion (Egg Envelope) Proteins in an Ancient Fish, the White Sturgeon, Acipenser transmontanus1. *Biology of Reproduction*, *90*(6), 1–12. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116194

Mushirobira, Y., Mizuta, H., Luo, W., Todo, T., Hara, A., Reading, B. J., … Hiramatsu, N. (2015). Molecular cloning and partial characterization of a low-density lipoprotein receptor-related protein 13 (Lrp13) involved in vitellogenin uptake in the cutthroat trout (Oncorhynchus clarki). *Molecular Reproduction and Development*, *82*(12), 986–1000. https://doi.org/10.1002/mrd.22579

Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Reproduction and Broodstock Management General and Comparative Endocrinology Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *165*, 516–534. https://doi.org/10.1002/9781444392210.ch4

Nagler, J. J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D. G., & Rexroad, C. (2007). The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: Discovery of the novel ERα2 and both ERβ isoforms. *Gene*, *392*(1–2), 164–173. https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.030

Ndiaye, P., Forgue, J., Lamothe, V., Cauty, C., Tacon, P., Lafon, P., … Núñez, J. (2006). Tilapia (Oreochromis niloticus) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *305A*(7), 576–593. https://doi.org/10.1002/jez.a.290

Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. , (1987).

Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2010). Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology*, *151*(4), 1668–1676. https://doi.org/10.1210/en.2009-1447

Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, *192*, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032

Nelson, E. R., Wiehler, W. B., Cole, W. C., & Habibi, H. R. (2007). Homologous Regulation of Estrogen Receptor Subtypes in Goldfish (Carassius auratus). *Molecular Reproduction and Development*, *74*(1), 1105–1112. https://doi.org/10.1002/mrd

Nelson, G. J. (1968). Gill arches of teleostean fishes of the division Osteoglossomorpha. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, *47*(312), 261–277. https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1968.tb00511.x

Nelson, G. J. (1969). Infraorbital bones and their bearing on the phylogeny and geography of Osteoglossomorph fishc. *American Museum Novitates*, *2394*, 1–37.

Nikolic, N. (2009). *Diversité génétique et taille efficace chez les populations de poissons sauvages: le cas du saumon atlantique un poisson migrateur amphihalin menacé*. Université de Toulouse III.

Norris, D. O., & Lopez, K. H. (2011). Hormones and reproduction of vertebrates, Volume 1 - Fishes. In *Saudi Med J* (Vol. 1).

Noso, T., Nicoll, C. S., Polenov, A. L., & Kawauchi, H. (1993). The primary structure of sturgeon prolactin: Phylogenetic implication. *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 91, pp. 90–95. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1108

Núñez-Rodríguez, J., Bon, E., & Le Menn, F. (1996). Vitellogenin receptors during Vitellogenesis in the rainbow troutOncorhynchus mykiss. *The Journal of Experimental Zoology*, *274*, 163–170. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19960215)274:3<163::aid-jez3>3.0.co;2-m

Nuñez-Rodriguez, J., Duponchelle, F., Cotrina-Doria, M., Renno, J. F., Chavez-Veintimilla, C., Rebaza, C., … Baras, E. (2015). Movement patterns and home range of wild and re-stocked Arapaima gigas (Schinz, 1822) monitored by radio-telemetry in Lake Imiria, Peru. *Journal of Applied Ichthyology*, *31*, 10–18. https://doi.org/10.1111/jai.12972

Nuñez-Rodriguez, J., Kah, O., Geffard, M., & Le Menn, F. (1989). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for sole (Solea vulgaris)vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *92B*(4), 741–746.

Nuñez, J. (2008). Arapaima gigas se dévoile. *Science Au Sud*, *47*, 1.

Nuñez, J., Chu-Koo, F., Berland, M., Arévalo, L., Ribeyro, O., Duponchelle, F., & Renno, J. F. (2011). Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, Arapaima gigas (Schinz), in the region of Iquitos, Perou. *Aquaculture Research*, *42*(6), 815–822. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02886.x

Núñez, J., & Duponchelle, F. (2009). Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*(1), 167–180. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9241-2

Nunez Rodriguez, J., Dugue, R., Oteme, Z. J., Hem, S., & Le Menn, F. (1997). Vitellogenin plasma levels in two cultured African catfish species, Chrysichthys nigrodigitatus (Claroteidae) and Heterobranchus longifilis (Clariidae). *Aquat. Living Resources*, *10*, 231–238.

Odo, G., Nwamba, H., & Eyo, J. (2009). Aspects Of The Biology Of Heterotis niloticus Cuvier 1829 (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) In The Anambra Flood River System, Nigeria. *Animal Research International*, *6*(2), 994–1002. https://doi.org/10.4314/ari.v6i2.48131

Oladosu, G. A., Obi, A., & Oladosu, O. O. (2007). Sex determination in Heterotis niloticus (Cuvier 1829) Based on morphometric features. *ASSET Series B*, *6*(1), 22–30.

Olivares, A. M., Hrbek, T., Escobar, M. D., & Caballero, S. (2013). Population structure of the black arowana (Osteoglossum ferreirai) in Brazil and Colombia: Implications for its management. *Conservation Genetics*, *14*(3), 695–703. https://doi.org/10.1007/s10592-013-0463-1

Oliveira, R. C., Santos, M. da C. F., Bernardino, G., Hrbek, T., & Farias, I. P. (2017). From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of Brycon amazonicus (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. *Hydrobiologia*, *805*(1), 75–88. https://doi.org/10.1007/s10750-017-3278-0

Oliveira, V. De, Poleto, S. L., & Venere, P. C. (2005). Feeding of juvenile pirarucu (Arapaima gigas, Arapaimidae) in their natural environment, lago Quatro Bocas, Araguaiana-MT, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, *3*(2), 312–314. https://doi.org/10.1590/S1679-62252005000200010

Om, A. D., Jasmani, S., Ismail, N., Yeong, S. Y., & Abol-Munafi, A. B. (2013). Application MALDI TOF on protein identification of vitellogenin in giant grouper (Epinephelus lanceolatus). *Fish Physiology and Biochemistry*, *39*(5), 1277–1286. https://doi.org/10.1007/s10695-013-9782-x

Padilla, P. P., Ismiño, R. O., Alcántara, F. B., & Tello, S. M. (2004). Efecto de la tasa de alimentación en el crecimiento del paiche, Arapaima gigas. *Memorias: Manejo de Fauna Silvestre En Amazonía Y Latinoamérica*, *3*, 59–62.

Page, T. J., & Hughes, J. M. (2010). Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, *77*(9), 2093–2122. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02821.x

Papetti, C., Liò, P., Rüber, L., Patarnello, T., & Zardoya, R. (2007). Antarctic Fish Mitochondrial Genomes Lack ND6 Gene. *Journal of Molecular Evolution*, *65*(5), 519–528. https://doi.org/10.1007/s00239-007-9030-z

Pelissero, C., Cuisset, B., & Le Menn, F. (1989). The influence of sex steroids in commercial meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon Acipense baeri. *Aquatic Living Resources*, *2*, 161–168. https://doi.org/10.1051/alr

Pelissero, C., & Sumpter, J. P. (1992). Steroids and "steroid-like" substances in fish diets. *Aquaculture*, *107*, 283–301. https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90078-Y

Pereira, S. L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, *23*(4), 745–752. https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400008

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, *8*(10), 785–786. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701

Pincock, D., Welch, D., Mckinley, S., & Jackson, G. (2010). *Acoustic Telemetry for Studying Migration Movements of Small Fish in Rivers and the Ocean — Current Capabilities and Future Possibilities. PNAMP Special Publication: Tagging, Telemetry, and Marking Measures for Monitoring Fish Populations-A Compendium of*. *2*, 105–118.

Plant, T. M. (2015). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Journal of Endocrinology*, *226*(2), T41–T54. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113

Pomacentridae, P., Chen, C. A., Carmen, M., Ablan, A., McManus, J. W., Bell, D., … Bell, J. D. (2004). Population structure and genetic variability of six bar wrasse (Thallasoma hardwicki) in Northern South China Sea revealed by mitochondrial control region sequences. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, *6*(4), 312–326. https://doi.org/10.1007/s10126-003-0028-2

Pottinger, T. G., Pulman, K. G. T., Carrick, T. R., & Scott, A. P. (2005). Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *Journal of Fish Biology*, *67*(6), 1514–1533. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00853.x

Pousis, C., Santamaria, N., Zupa, R., De Giorgi, C., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., … Corriero, A. (2012). Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (Thunnus thynnus). *Animal Reproduction Science*, *132*, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.014

Prat, F., Coward, K., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (1998). Molecular Characterization and Expression of two Ovarian Lipoprotein Receptors in the Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss 1. *Biology of Reproduction*, *58*(5), 1146–1153. https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1146

Ramos, T. P. A., Ramos, R. T. C., & Ramos, S. A. Q. A. (2014). Ichthyofauna of the Parnaíba river Basin, Northeastern Brazil. *Biota Neotropica*, *14*(1), 1–8. https://doi.org/10.1590/S1676-06032014003913

Reading, B. J., Hiramatsu, N., Schilling, J., Molloy, K. T., Glassbrook, N., Mizuta, H., … Sullivan, C. V. (2014). Lrp13 is a novel vertebrate lipoprotein receptor that binds vitellogenins in teleost fishes. *Journal of Lipid Research*, *55*(11), 2287–2295. https://doi.org/10.1194/jlr.M050286

Reading, B. J., Hiramatsu, N., & Sullivan, C. V. (2011). Disparate Binding of Three Types of Vitellogenin to Multiple Forms of Vitellogenin Receptor in White Perch 1. *Biology of Reproduction*, *84*, 392–399. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087981

Rebaza Alfaro, M., Rebaza Alfaro, C., & Deza Tabeada, S. (2003). Observaciones de la reproducción de paiche Arapaima gigas (Cuvier) en ambientes controlados en el IIAP Ucayali. In F. Alcantara Bocanegra & V. Montreuil Frias (Eds.), *Seminario taller internacional de manejo de paiche o pirarucu* (pp. 111–123). https://doi.org/10.1364/AO.7.002246

Reizer, C. (1964). Comportement et reproduction d'Heterotis niloticus en petits étangs. *Bois et Forêts Des Tropiques*, *95*, 49–60.

Rezaei, A. (2015). Phylogenetic analysis of NADH dehydrogenase subunit 1(NADH 1) gene in Salmo trutta caspius. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *3*(2), 185–193.

Rojas, H. H. F. (2005). *Contribucion al conocimiento de la reproduccion del PirarucuArapaima gigas 'Cuvier, 1817) (Pisces : Arapaimidae) en cautiverio*. Universidad de la amazonia.

Rojas Ríos, G. (2003). Experiencias en el aprovechamiento de Arapaima gigas " paiche " en la cocha El Dorado , Cuenca Yanayacu Pucate - Reserva Nacional Pacaya Samiria – 2003. *MEMORIAS: Manejo de Fauna Silvestre En Amazonia Y Latinoamérica*, 280–287.

Roy, R. L., Morin, Y., Courtenay, S. C., & Robichaud, P. (2004). Purification of vitellogenin from smooth flounder (Pleuronectes putnami) and measurement in plasma by homologous ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *139*(2), 235–244. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.006

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299–3302. https://doi.org/10.1093/molbev/msx248

Sabo-Attwood, T., Kroll, K. J., & Denslow, N. D. (2004). Differential expression of largemouth bass (Micropterus salmoides) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *218*(1–2), 107–118. https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.007

Sánchez, P., Viñas, J., Alvarado Bremer, J. R., Ambrosio, P. P., & Flos, R. (2012). Loss of genetic variability in a hatchery strain of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) revealed

by sequence data of the mitochondrial DNA control region and microsatellite markers. *Scientia Marina*, *76*(2), 225–235. https://doi.org/10.3989/scimar.03232.07E

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1093/annonc/mdp039

Santos, C. H. A., de Sá Leitão, C. S., Paula e Silva, M. de N., & e Val, V. M. F. de A. (2014). Genetic relationships between captive and wild subpopulations of Arapaima gigas (Schinz, in Cuvier, 1822). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, *6*(10), 108–123. https://doi.org/10.5897/IJFA14.0415

Sappington, T. W., & Raikhel, A. S. (1998). Ligand-binding domains in vitellogenin receptors and other LDL-receptor family members share a common ancestral ordering of cysteine-rich repeats. *Journal of Molecular Evolution*, *46*(4), 476–487. https://doi.org/10.1007/PL00006328

Schaefer, F., Kloas, W., & Würtz, S. (2012). Arapaima : Candidate For Intensive Freshwater Culture. *Global Aquaculture Advocate*, 50–51.

Schiffer, M., Kennington, W. J., Hoffmann, A. A., & Blacket, M. J. (2007). Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest Drosophila species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, *16*, 1687–1700. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03200.x

Schilling, J., Loziuk, P. L., Muddiman, D. C., Daniels, H. V., & Reading, B. J. (2015). Mechanisms of egg yolk formation and implications on early life history of white perch (Morone americana). *PLoS ONE*, *10*(11), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143225

Schultz, J. K., Feldheim, K. A., Gruber, S. H., Ashley, M. V, Mcgovern, T. M., & Bowen, B. W. (2008). Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus Negaprion). *Molecular Ecology*, *17*, 5336–5348. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04000.x

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 390–411. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013

Scott, A. P., Liley, N. R., & Vermeirssen, E. L. M. (1994). Urine of reproductively mature female rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaun), contains a priming pheromone which enhances plasma levels of sex steroids and gonadotrophin II in males. *Journal of Fish Biology*, *44*, 13.

Sekino, M., Hara, M., & Taniguchi, N. (2002). Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder Paralichthys olivaceus. *Aquaculture*, *213*(1–4), 101–122. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00885-7

Sevilhano, T., Carvalho, R. F. De, Oliveira, N. A. D. J., Oliveira, J. E., Maltarollo, V. G., Trossini, G., … Bartolini, P. (2017). Molecular cloning and characterization of pirarucu (Arapaima gigas) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunit cDNAs. *PLoS ONE*, *12*(8), e0183545.

Shen, Y., Li, J., & Feng, B. (2009). Genetic Analysis of Cultured and Wild Populations of Mytilus coruscus Based on Mitochondrial DNA. *Zoological Research*, *30*(3), 240–246. https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2009.03240

Skaala, Ø., Wennevik, V., & Glover, K. A. (2006). Evidence of temporal genetic change in wild Atlantic salmon, Salmo salar L., populations affected by farm escapees. *ICES Journal of Marine Science*, *63*(7), 1224–1233. https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2006.04.005

Skibinski, D. O. F. (2000). DNA tests of neutral theory : applications in marine genetics. *Hydrobiologia*, *420*, 137–152.

Skorupski, J., & Kmieć, M. (2013). Structural and functional characteristics of prolactin and its gene in the American mink (Neovison vison Schreb., 1777). A rewiev / Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna prolaktyny i jej genu u norki amerykańskiej (Neovison vison schreb., 1777). Pra. *Annales UMCS, Zootechnica*, *30*(4). https://doi.org/10.2478/v10083-012-0035-8

Šlechtová, T., Gilar, M., Kalíková, K., & Tesařová, E. (2015). Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences. *Analytical Chemistry*, *87*(15), 7636–7643. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00866

So, W., Kwok, H., & Ge, W. (2005). Zebrafish Gonadotropins and Their Receptors : II . Cloning and Characterization of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Subunits — Their Spatial-Temporal Expression Patterns and Receptor Specificity. *Biology of Reproduction*, *72*, 1382–1396. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038216

Stacey, N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*, *28*(1–4), 229–235. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030540.99732.2c

Steiniger, S., & Bocher, E. (2009). An overview on current free and open source desktop GIS developments. *International Journal of Geographical Information Science*, *23*(10), 1345–1370. https://doi.org/10.1080/13658810802634956

Steiniger, S., & Hunter, A. J. S. (2012). OpenJUMP HoRAE — A Free GIS and Toolbox for Home-Range Analysis. *Wildlife Society Bulletin*, *36*(3), 600–608. https://doi.org/10.1002/wsb.168

Stewart, D. J. (2013). A New Species of Arapaima (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. *Copeia*, *3*, 470–476. https://doi.org/10.1643/CI-12-017

Stiassny, M. L. J., Teugels, G. G., & Hopkins, C. D. (2007). Poissons d“ eaux douces et saumâtres de basse Guinée , ouest de l”Afrique centrale. *Faune et Flore Tropicale*, *1*, 30–45.

Stifani, S., Le Menn, F., Nunez Rodriguez, J., & Schneider, W. J. (1990). Regulation of oogenesis: The piscine receptor for vitellogenin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1045*, 271–279. https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90130-P

Sun, B., Pankhurst, N. W., & Watts, M. (2003). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin measurement in greenback flounder Rhombosolea tapirina. *Fish Physiology and Biochemistry*, *29*(1), 13–21. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000035890.17372.75

Swenson, E. A., Rosenberger, A. E., & Howell, P. J. (2007). Validation of Endoscopy for Determination of Maturity in Small Salmonids and Sex of Mature Individuals. *Transactions of the American Fisheries Society*, *136*(4), 994–998.

https://doi.org/10.1577/t06-193.1

Tah, L., Da Costa, K. S., Kouassi, J. N., & Moreau, J. (2009). Effort de pêche et production piscicole au lac d'Ayamé 1 (bassin de la Bia; Côte d'Ivoire) après le depart des pêcheurs «bozos». *Agronomie Africaine*, *21*(1), 103–115.

Takahashi, A., Kanda, S., Abe, T., & Oka, Y. (2016). Evolution of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. *Endocrinology*, *157*(10), 3994–4002. https://doi.org/10.1210/en.2016-1356

Takemura, A., & Oka, M. (1998). Immunochemical sexing of living yellowfin tuna , Thunnus albacares (Bonnaterre), using a vitellogenin- like protein. *Aquaculture Research*, *29*, 245–249.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596–1599. https://doi.org/10.1093/molbev/msm092

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., … Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 483–515. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004

Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A., & Kragelund, B. B. (2005). Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology*, *351*, 810–823. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042

Tillon, R. (1959). Elevage de l'Heterotis niloticus en station de pisciculture. *Bois et Forêts Des Tropiques*, *64*, 13–18.

Tito De Morais, L., Da Costa, K., Raffray, J., & Traoré, K. (2007). *Pêches artisanales dans les petits barrages. L'eau en partage : les pettits barrages de Côte d'Ivoire*. 215–227. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014765131500233X

Treangen, T. J., & Salzberg, S. L. (2013). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet.*, *13*(1), 36–46. https://doi.org/10.1038/nrg3117.Repetitive

Trichet, V., Buisine, N., Mouchel, N., Morán, P., Pendás, A. M., Le Pennec, J. P., & Wolff, J. (2000). Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (Oncorhynchus

mykiss) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. *Molecular and General Genetics*, *263*(5), 828–837. https://doi.org/10.1007/s004380000247

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., … Herz, J. (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, *97*(6), 689–701. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80782-5

Uchida, K., Moriyama, S., Chiba, H., Shimotani, T., Honda, K., Miki, M., … Nozaki, M. (2010). Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate , hagfish. *PNAS*, *107*(36), 15832–15837. https://doi.org/10.1073/pnas.1002208107

Ugwumba, A. A. A. (1993). Carbohydrases in the digestive tract of the African bony-tongue Heterotis niloticus (Pisces: Osteoglossidae). *Hydrobiologia*, *257*(2), 95–100. https://doi.org/10.1007/BF00005949

Ugwumba, A. A. A. (1996). Absorption of food in Heterotis niloticus (Cuvier) (Pisces: Osteoglossidae) from a small tropical man-made lake in Ibadan, Nigeria. *Hydrobiologia*, *330*, 55–58.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damián-matsumura, P., & Dias, J. A. (1999). Role of Glycosylation in Function of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrine*, *11*, 205–215. https://doi.org/10.1385/ENDO

Unal, G., Marquez, E. C., Feld, M., Stavropoulos, P., & Callard, I. P. (2014). Isolation of estrogen receptor subtypes and vitellogenin genes: Expression in female Chalcalburnus tarichi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, *172–173*(1), 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.04.002

Urquhart, A., Kimpton, C. P., Downes, T. J., & Gill, P. (1994). Variation in Short Tandem Repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Nternational Journal of Legal Medicine*, *107*, 13–20.

Väli, Ü., Einarsson, A., Waits, L., & Ellegren, H. (2008). To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations ? *Molecular Ecology*, *17*, 3808–3817. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03876.x

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2016). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *0*, 1–19. https://doi.org/10.1111/raq.12164

Van Damme, P. A., Coca Méndez, C., Zapata, M., Carvajal-Vallejos, F. M., Carolsfeld, J., & Olden, J. D. (2015). The expansion of Arapaima cf. gigas (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Bolivian Amazon as informed by citizen and formal science. *Management of Biological Invasions*, *6*(4), 375–383. https://doi.org/10.3391/mbi.2015.6.4.06

Vialle, R. A., de Souza, J. E. S., de Paiva Lopes, K., Teixeira, D. G., de Azevedo Alves Sobrinho, P., Ribeiro-dos-Santos, A. M., … Santos, S. (2018). Whole genome sequencing of the Pirarucu (Arapaima gigas) supports independent emergence of major teleost clades. *Genome Biology and Evolution*, *10*(9), 2366–2379. https://doi.org/10.1093/gbe/evy130

Vigilant, L., Penningtoni, R., Harpendingt, H., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(December), 9350–9354.

Vischer, H. F., Marques, R. B., Granneman, J. C. M., Linskens, M. H. K., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2004). Receptor-selective determinants in catfish gonadotropin seat-belt loops. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *224*, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.06.011

Vitorino, C. A., Oliveira, R. C. C., Margarido, V. P., & Venere, P. C. (2015). Genetic diversity of Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotropical Ichthyology*, *13*(3), 557–568. https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150037

Vokoun, J. C. (2003). Kernel Density Estimates of Linear Home Ranges for Stream Fishes : Advantages and Data Requirements. *North American Journal of Fisheries Management*, *23*, 1020–1029. https://doi.org/10.1577/M02-141

Walker, D., Moler, P. E., Buhlmann, K. A., & Avise, J. C. (1998). Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snappin turtle (Chelydra serpentina). *Animal Conservation*, *1*, 55–60.

Wallace, R. A., Hoch, K. L., & Carnevali, O. (1990). Placement of small lipovitellin subunits within the vitellogenin precursor in Xenopus laevis. *Journal of Molecular Biology*, *213*(3), 407–409. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80203-7

Wang, H., Tan, J. T. T., Emelyanov, A., Korzh, V., & Gong, Z. (2005). Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, Danio rerio. *Gene*, *356*(1–2), 91–100. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.041

Wang, L., Shi, X., Su, Y., Meng, Z., & Lin, H. (2012). Loss of Genetic Diversity in the Cultured Stocks of the Large Yellow Croaker, Larimichthys crocea, Revealed by Microsatellites. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 5584–5597. https://doi.org/10.3390/ijms13055584

Wang, N., Wang, R., Hu, Q., Xu, W., Zhu, Y., Yan, F., & Chen, S. (2017). Characterization of a low-density lipoprotein receptor, Lrp13, in Chinese tongue sole (Cynoglossus semilaevis) and medaka (Oryzias latipes). *Fish Physiology and Biochemistry*, *43*(5), 1289–1298. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0372-1

Wang, R., Gao, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Fang, Z., He, J., … Ma, G. (2010). Cloning, expression, and induction by 17-β estradiol (E2) of a vitellogenin gene in the white cloud mountain minnow Tanichthys albonubes. *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*(2), 157–164. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9222-5

Wang, S., Wang, Y., Ma, J., Ding, Y., & Zhang, S. (2011). Phosvitin plays a critical role in the immunity of zebrafish embryos via acting as a pattern recognition receptor and an antimicrobial effector. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(25), 22653–22664. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247635

Ward, R. H., Redd, A., Valencia, D., Frazier, B., & Pääbo, S. (1993). Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Science*, *90*, 10663–10667.

Watahiki, M., Yamamoto, M., Yamakawa, M., Tanaka, M., & Nakashima, K. (1989). Conserved and Unique Amino Acid Residues in the Domains of the Growth Hormones. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(1), 312–316.

Watkins, J. C. (2007). Microsatellite evolution : Markov transition functions for a suite of models. *Theoretical Population Biology*, *71*, 147–159.

https://doi.org/10.1016/j.tpb.2006.10.001

Watson, L. C., Stewart, D. J., & Kretzer, A. M. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of the Threatened Giant Arapaima in Southwestern Guyana: Implications for Their Conservation . *Copeia*, *104*(4), 864–872. https://doi.org/10.1643/cg-15-293

Weber, J. L., & Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, *2*(8), 1123–1128. https://doi.org/Doi 10.1093/Hmg/2.8.1123

Welcomme, R. L. (1992). A history of international introduction of inland aquatic species. *ICES Marine Science Symposium*, *194*, 3–14. https://doi.org/10.2307/1445460

Whittington, C. M., & Wilson, A. B. (2013). General and Comparative Endocrinology The role of prolactin in fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *191*, 123–136. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.027

Williams, V. N., Reading, B. J., Hiramatsu, N., Amano, H., Glassbrook, N., Hara, A., & Sullivan, C. V. (2014). Multiple vitellogenins and product yolk proteins in striped bass, Morone saxatilis: molecular characterization and processing during oocyte growth and maturation. *Fish Physiology and Biochemistry*, *40*(2), 395–415. https://doi.org/10.1007/s10695-013-9852-0

Worton, B. J. (1989). Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies. *Ecology*, *70*(1), 164–168.

Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Chicago, University of Chicago Press, v. 4.Variability within and among natural populations.* Retrieved from https://books.google.ci/books/about/Evolution_and_the_Genetics_of_Population.html?id=q0RDJf3K_aUC&redir_esc=y

Xu, C. (2016). Gene expression of the vitellogenins and the receptors in Atlantic salmon (Salmo salar) during the annual reproductive cycle. *Masters's Thesis. Norwegian University of Life Sciences*, 1–41.

Yamaguchi, A., Kato, K., Arizono, K., & Tominaga, N. (2015). Induction of the estrogen-responsive genes encoding choriogenin H and L in the liver of male medaka (Oryzias latipes) upon exposure to estrogen receptor subtype-selective ligands. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(7), 752–758. https://doi.org/10.1002/jat.3063

Yambe, H., Kitamura, S., Kamio, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Fusetani, N., & Yamazaki, F. (2006). L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15370–15374. https://doi.org/10.1073/pnas.0604340103

Yang, H. M., Wang, Y., Wang, Z. Y., & Wang, X. X. (2017). Seasonal and photoperiodic regulation of reproductive hormones and related genes in Yangzhou geese. *Poultry Science*, *96*(2), 486–490. https://doi.org/10.3382/ps/pew340

Yao, A. H., Koumi, A. R., Atse, B. C., & Kouamelan, E. P. (2017). Etat de connaissance dur la pisciculture en Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, *29*(3), 227–244.

Yasuda, A., Kawauchi, H., & Papkoff, H. (1990). The complete amino acid sequence of prolactin from the sea turtle (Chelonia mydas). *General and Comparative Endocrinology*, *80*(3), 363–371. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90185-O

Yilmaz, O., Prat, F., Ibañez, A. J., Amano, H., Koksoy, S., & Sullivan, C. V. (2015). Estrogen-induced yolk precursors in European sea bass, Dicentrarchus labrax: Status and perspectives on multiplicity and functioning of vitellogenins. *General and Comparative Endocrinology*, *221*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.018

Yilmaz, O., Prat, F., Ibáñez, A. J., Köksoy, S., Amano, H., & Sullivan, C. V. (2016). Multiple vitellogenins and product yolk proteins in European sea bass (Dicentrarchus labrax): Molecular characterization, quantification in plasma, liver and ovary, and maturational proteolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *194–195*, 71–86. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.010

Yu, R. M. K., Wong, M. M. L., Kong, R. Y. C., Wu, R. S. S., & Cheng, S. H. (2006). Induction of hepatic choriogenin mRNA expression in male marine medaka: A highly sensitive biomarker for environmental estrogens. *Aquatic Toxicology*, *77*(4), 348–358. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.01.003

Yue, G. H., Liew, W. C., & Orban, L. (2006). The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (Scleropages formosus, Osteoglossidae). *BMC Genomics*, *7*(7), 242. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-242

Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., … Henry, J. (2016). Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis : Identification,

Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *Journal of Proteome Research*, *15*, 48–67. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463

Zechel, C., Shen, X., Chen, J., Chen, Z., Chambon, P., & Gronemeyerl, H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR , RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *The EMBO Journal*, *13*(6), 1425–1433.

Zhang, S., Dong, Y., & Cui, P. (2015). Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(2), 710–715. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.011

Zhong, L., Yuan, L., Rao, Y., Li, Z., Zhang, X., Liao, T., … Dai, H. (2014). Distribution of vitellogenin in zebrafish (Danio rerio) tissues for biomarker analysis. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *149*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.022

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 438–455. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017

Annexes

Loci	Séquence de l'amorce (5'-3')	GenBank	Répétition	T (°C)	Taille (pb)
Hni94	F-GCCACCGTTTGAGTGAATTT-HEX R-TCTGAGAACACGGTAGGATGC	JF279686	(GT)13	55.0	166-174
Hni67	F-CGCCTGTAAGCAATGAATGA-6-FAM R-TGCCATGGATGTCACAAGTT	JF279687	(CA)16	55.0	307-315
Hni19	F-GGCTGTGCAATTTGACATGA-HEX R-GTGCCTACAGCCATTTACCC	JF279688	(GT)17	55.8	119-123
Hni61	F-AGCTTGCATCTGGAAGCATT-6-FAM R-GTATCCACCTGGACCCACAG	JF279689	(CA)12	55.0	327-352
Hni62	F-CCTGGCTTTAGAGGCAGTTG-6-FAM R-CAGCTGTAGCAGGTTTGCTG	JF279690	(CA)11	55.0	276-294
Hni14	F-CAACCACTGCCATAGGAGGT-HEX R-GAACCAAGTCGAGCCATCAT	JF279691	(GT)27	55.8	125-152
Hni52	F-AAGGGGACCCTTGCAGTAGT-HEX R-GATGCAACATGCACTGCTCT	JF279692	(CA)16	55.0	267-279
Hni47	F-AACACATTACGCCCTTGGAG-6-FAM R-CAGCCCTGTGTACACTTCCA	JF279693	(CA)16	55.8	270-279
Hni37	F-CCACTTCAGAAAAAGCCATTG-HEX R-CAGGACCATAACACAACACCTG	JF279694	(CA)27	52.1	234-239
Hni5	F-CAGGAAGATTTGCACCACCT-6-FAM R- TGCCATTCTGGAAAAAGGAG	-	-	60	-
HNi28	F- TCCCTGCAGTCTGA AACACA-6-FAM R- AGACCCACAAGATCCAGGTG	-	-	60	-

D'après Carrera et al. (2011) ; Hurtado et al. (2013)

Annexe 1 : Amorces microsatellites développées pour *H. niloticus*

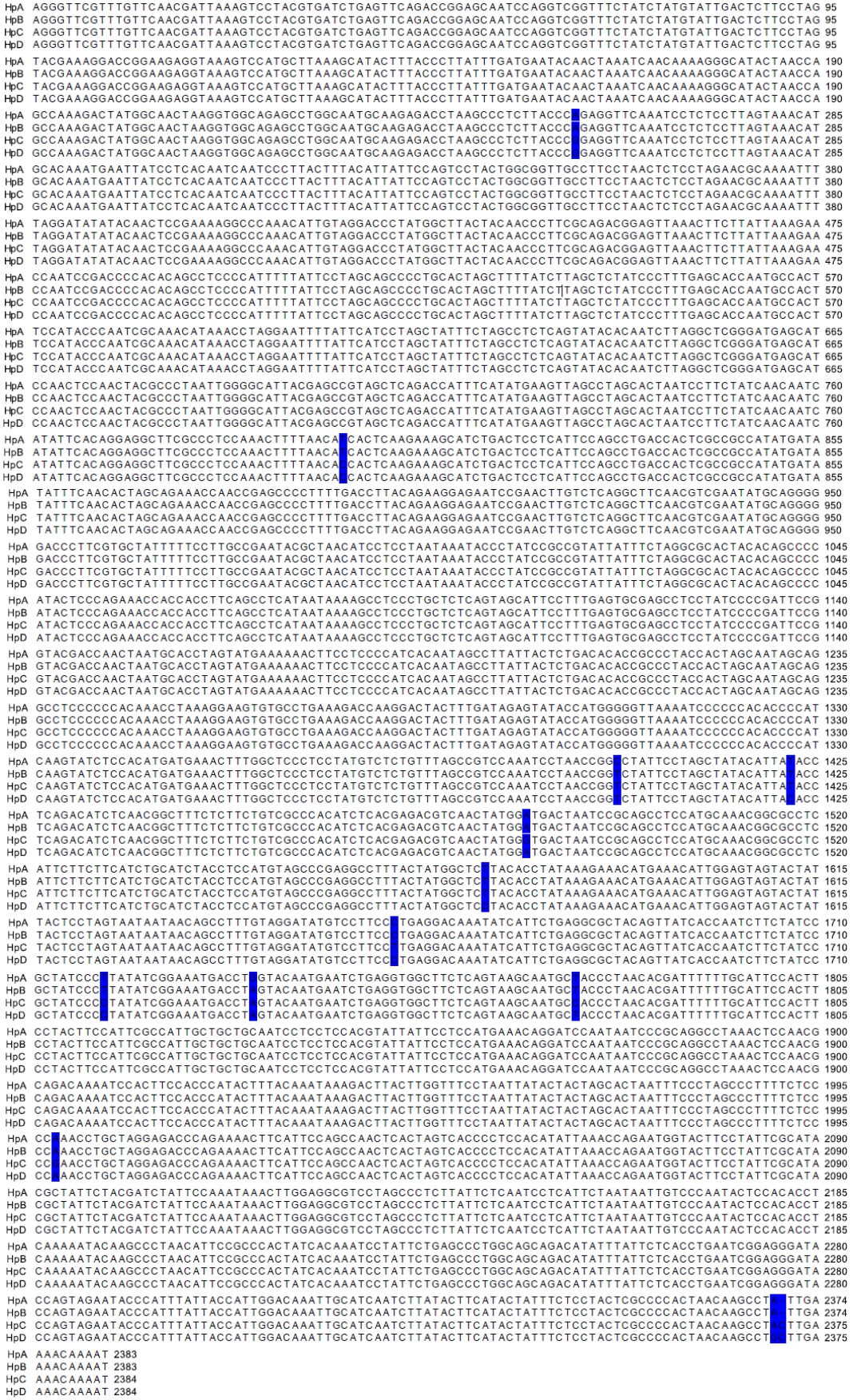
	Panel						
	1	2	3	4	5	6	7
Marqueurs microsatellites	Hni94/ Hni67	Hni52/ Hni62	Hni14/ Hni47	Hni19/ Hni61	Hni37	Hni5	Hni28
1ère dénaturalisation	95°C 2min.	95°C 2min.	95°C 2min.	95°C 2min.	95°C 2min.	95°C 2min.	95°C 2min.
2e dénaturalisation	95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s
Hybridation	55°C 30s	55°C 30s	55,8°C 30s	55,4°C 35s	52,1°C 35s	54,2°C 30s	56,5°C 50s
Polymérisation	72°C 50s	72°C 50s	72°C 50s	72°C 50s	72°C 50s	72°C 50s	72°C 50s
Rénaturalisation	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5min
Extension finale	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C
Nombres de cycles	38	38	38	35	35	35	35
Produit final PCR Panel 1 à 4 (15 µl)	1,5 µl de Buffer 10x + 0,3 µl de dNTP 2 mM + 0,3 µl de $MgCl_2$ + 0,75 µl de Primer F de chaque marqueur + 0,75 µl de Primer R de chaque marqueur + 0,1 µl de Taq + 1,5 µl d'ADN + 8,3 µl de H_2O pure						
Produit final PCR Panel 5 à 7 (15 µl)	1,5 µl de Buffer 10x + 0,3 µl de dNTP 2 mM + 0,3 µl de $MgCl_2$ + 0,75 µl de Primer F + 0,75 µl de Primer R + 0,1 µl de Taq + 1,5 µl d'ADN + 9,8 µl de H_2O pure						

Annexe 2 : Panels microsatellites définis pour *H. niloticus*

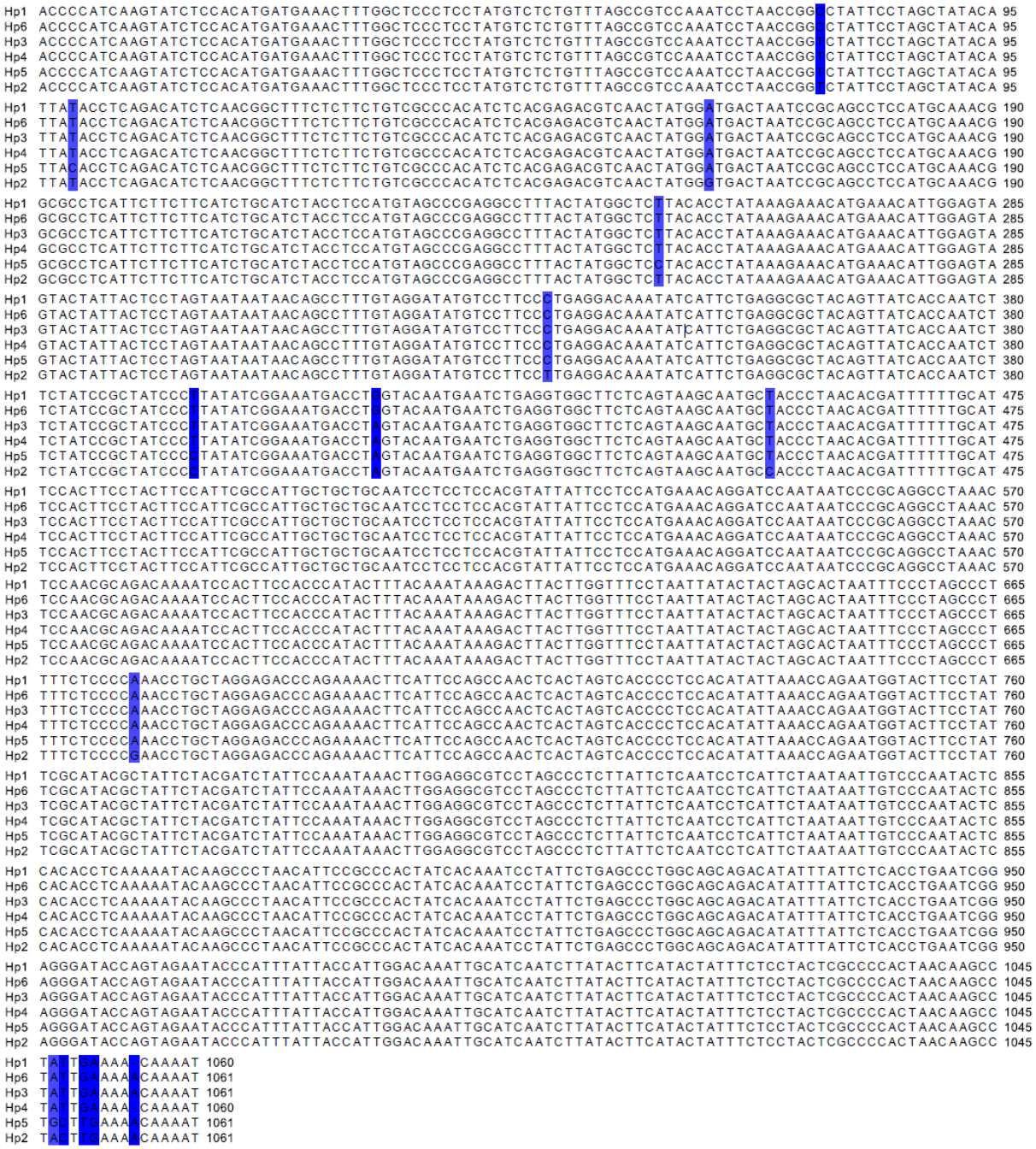
Gène	Séquence de l'amorce (5'-3')	Références
NADH1 L3002 amp F	TACGACCTCGATGTTGGATCAGG	(Tomas Hrbek et al., 2005)
NADH1 H4419 amp R	AAGCTTTYGGGCCCATACC	
NADH1 L3079 seq F	ACGTGATCTGAGTTCAGACCG	
NADH1 H4364 seq R	GGAAGCACTARGAGTTTTGA	
ATPase L8106 amp F	TGGGTGTTAAAATAGATG	
ATPase H9264 amp R	GAGGAGAGCRGCRGATGCCCC	
ATPase L8537 seq F	TGAAACTGACCATGACACTAAG	
ATPase H8516 seq R	CTTAGTGTCATGGTCAGTTTCA	
Cyt b L15930 F	CTTCGATCTTCGrTTTACAAG	(Lavoué & Sullivan, 2004)
Cyt b H14724 R	TGATATGAAAAACCATCGTTG	

amp : amplification, seq : séquençage,

Annexe 3 : Amorces mitochondriales développées pour *A. gigas*



Annexe 4 : Alignement des séquences nucléotidiques des quatre haplotypes HpA, HpB, HpC et HpD des gènes mitochondriaux concaténés (Cytochrome b et segment NADH1) de *H. niloticus* avec les sites polymorphiques en bleu



Annexe 5 : Alignement des séquences nucléotidiques des six haplotypes Hp1, Hp2, Hp3, Hp4, Hp5 et Hp6 d'un fragment du gène mitochondrial Cyt b de *H. niloticus* avec les sites polymorphiques en bleu.

Annexe 6 : Alignement des séquences nucléotidiques des deux haplotypes (HpI et HpII) du segment NADH1 de *H. niloticus* avec les sites polymorphiques en bleu.

(ERRα)

```
   1 M  S  S  R  D  R  R  F  N  I  Y  I  K  A  E  P  S  S  P  E  G  G  R  D  G  R  T  S  P  G  G  A  S  S  D
   1 ATGTCTTCCCGGGATCGACGCTTCAATATTTACATTAAGGCTGAGCCCAGCAGTCCAGAGGGAGGAAGAGATGGGAGAACCAGCCCTGGAGGGGCATCCTCCGAT
  36 S  S  H  S  A  V  G  V  N  G  G  R  S  T  E  R  Y  S  P  P  L  C  T  P  T  L  H  C  P  F  K  E  E  G  D
 106 TCGTCCCACAGTGCTGTGGGGGTAAATGGAGGCAGGAGCACAGAGCGGTACTCCCCTCCCCTCTGCACACCAACCCTGCATTGCCCTTTTAAAGAGGAGGGCGAT
  71 G  E  E  G  S  A  G  S  G  G  G  R  C  K  Y  A  L  S  T  L  P  K  R  L  C  L  V  C  G  D  V  A  S  G  Y
 211 GGAGAGGAGGGATCTGCAGGCAGCGGAGGCGGCAGGTGCAAGTACGCCCTTAGCACACTCCCCAAGCGCCTGTGTCTCGTGTGTGGGGATGTGGCATCAGGCTAC
 106 H  Y  G  V  A  S  C  E  A  C  K  A  F  F  K  R  T  I  Q  G  N  I  E  Y  S  C  P  A  S  N  E  C  E  I  T
 316 CACTACGGCGTGGCCTCCTGTGAGGCCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGGACCATTCAAGGGAACATTGAATACAGCTGCCCAGCATCCAACGAGTGCGAAATCACC
 141 K  R  R  R  K  A  C  Q  A  C  R  F  T  K  C  L  K  V  G  M  L  K  E  G  V  R  L  D  R  V  R  G  G  R  Q
 421 AAGCGGCGCAGGAAGGCCTGCCAAGCTTGTCGCTTCACCAAGTGCCTCAAAGTGGGAATGCTGAAAGAGGGTGTTCGTCTGGATCGAGTGAGAGGAGGAAGACAG
 176 K  Y  K  R  R  P  E  V  E  S  T  T  Y  Q  S  P  T  N  Q  P  S  G  K  E  V  D  K  G  P  S  N  V  I  V  S
 526 AAGTACAAAAGACGGCCAGAGGTGGAGAGCACCACATACCAAAGTCCTACGAATCAGCCTTCAGGAAAGGAAGTTGATAAAGGTCCCTCCAATGTCATTGTCTCC
 211 H  L  L  V  A  E  P  E  K  L  F  A  M  P  D  P  L  Q  S  D  T  T  L  R  T  L  T  T  L  C  D  L  A  D  R
 631 CATCTGCTGGTGGCTGAGCCAGAGAAGCTGTTTGCCATGCCAGACCCCCTGCAGTCAGACACCACCCTGCGCACCCTCACCACCCTTTGTGACTTGGCTGATCGC
 246 E  L  V  V  I  I  G  W  A  K  H  I  P  G  F  L  S  L  S  L  A  D  Q  M  S  V  L  Q  S  V  W  L  E  V  L
 736 GAGCTTGTTGTCATCATTGGCTGGGCTAAACACATTCCCGGCTTCCTGTCCTTGTCTCTGGCGGACCAGATGTCAGTGTTGCAGTCCGTGTGGCTGGAGGTGCTC
 281 V  L  G  V  A  F  R  S  L  S  C  E  D  E  V  V  F  A  E  D  F  V  L  D  E  E  L  S  R  I  A  G  L  G  E
 841 GTACTCGGTGTTGCCTTCCGGTCTCTGAGCTGCGAGGACGAGGTGGTGTTTGCCGAGGACTTTGTTCTGGATGAGGAGCTGTCCCGTATTGCTGGGCTGGGCGAG
 316 L  S  A  A  I  S  Q  L  A  R  R  Y  R  A  L  Q  L  D  Q  E  E  F  V  M  L  K  A  I  A  L  T  N  S  D  S
 946 TTAAGTGCAGCCATTAGCCAACTGGCCCGCCGATACCGTGCCCTTCAACTAGACCAGGAGGAGTTTGTCATGTTGAAGGCTATTGCACTCACAAACTCTGATTCT
 351 V  Y  I  E  D  M  E  A  V  Q  K  L  R  D  L  L  H  Q  A  L  L  E  L  E  S  Q  R  R  P  E  D  P  R  R  A
1051 GTGTACATTGAGGACATGGAGGCTGTGCAGAAGCTACGAGACCTCCTACACCAGGCCCTGCTAGAGCTGGAAAGCCAGCGTAGGCCAGAAGACCCCCGGAGGGCA
 386 G  R  L  L  L  T  L  P  L  L  R  Q  T  A  S  R  A  L  S  T  F  Y  N  I  K  T  R  G  G  V  P  M  H  K  L
1156 GGCCGGCTCCTGCTCACCCTGCCCCTGCTCAGGCAGACTGCCAGCCGTGCCCTTTCCACCTTCTACAACATCAAGACCCGTGGTGGTGTGCCCATGCACAAACTC
 421 F  L  E  M  L  E  A  M  M  D  S  P  *
1261 TTTCTCGAGATGCTGGAGGCCATGATGGACTCGCCGTAA
```

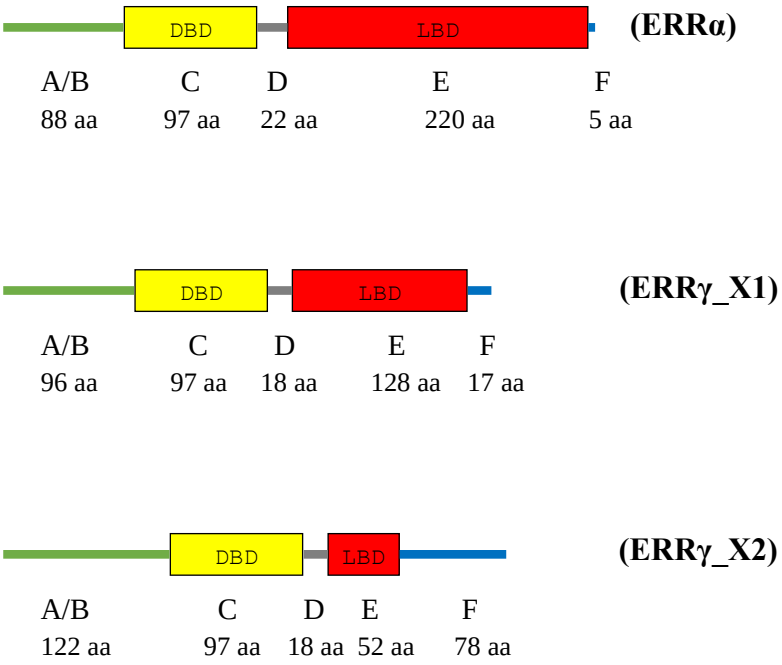
(ERRγ_X1)

```
   1 M  A  A  D  D  R  H  L  P  S  S  C  G  S  Y  I  K  T  E  P  S  S  P  S  S  V  I  D  T  V  S  H  H  S  P
   1 ATGGCTGCAGATGACCGGCACCTGCCCTCCAGCTGTGGGTCCTACATCAAGACGGAGCCATCGAGCCCCTCATCGGTCATCGACACAGTCAGCCACCATAGCCCC
  36 S  G  N  S  D  A  S  G  G  Y  V  S  A  M  N  S  H  S  N  G  L  D  S  P  P  M  F  T  P  S  G  L  G  G  G
 106 AGTGGCAACTCGGACGCCAGCGGTGGCTACGTCAGCGCCATGAACAGCCACTCCAATGGCCTGGACTCGCCACCCATGTTCACGCCCAGTGGGCTTGGAGGCGGG
  71 A  C  R  K  R  Y  D  D  C  S  S  T  I  M  E  D  S  P  I  K  C  E  Y  M  L  N  S  I  P  K  R  L  C  L  V
 211 GCCTGCCGCAAGCGCTATGATGACTGCTCCAGCACCATTATGGAGGACTCGCCCATTAAGTGCGAATATATGTTGAACTCCATCCCCAAGAGGCTGTGCCTAGTC
 106 C  G  D  I  A  S  G  Y  H  Y  G  V  A  S  C  E  A  C  K  A  F  F  K  R  T  I  Q  G  N  I  E  Y  S  C  P
 316 TGTGGAGACATTGCCTCAGGATACCACTACGGAGTGGCCTCCTGTGAGGCCTGCAAAGCCTTTTTTAAAAGGACAATACAAGGCAACATCGAGTACAGCTGTCCC
 141 A  T  N  E  C  E  I  T  K  R  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  F  M  K  C  L  K  V  G  M  L  K  E  G  V  R  L
 421 GCTACAAACGAGTGTGAGATCACCAAGCGAAGGCGCAAGTCCTGCCAGGCCTGCCGCTTCATGAAGTGTCTCAAAGTGGGGATGCTGAAGGAAGGTGTGCGTCTG
 176 D  R  V  R  G  G  R  Q  K  Y  K  R  R  M  D  A  E  N  N  A  Y  L  G  L  T  L  P  P  P  A  K  K  P  L  T
 526 GACCGTGTGCGTGGCGGCCGGCAGAAGTACAAGAGGAGGATGGATGCCGAAAACAACGCCTATCTTGGCCTCACACTACCGCCCCCTGCCAAAAAGCCATTGACA
 211 K  I  V  S  H  L  L  V  A  E  P  E  K  I  Y  A  M  P  D  P  T  M  P  E  S  D  I  K  A  L  T  T  L  C  D
 631 AAGATTGTGTCCCACTTGCTGGTGGCAGAGCCAGAGAAGATCTACGCCATGCCAGACCCCACCATGCCTGAGAGTGACATCAAGGCCCTAACCACTTTGTGCGAC
 246 L  A  D  R  E  L  V  V  I  I  G  W  A  K  H  I  P  G  F  S  S  L  S  L  G  D  Q  M  S  L  L  Q  S  A  W
 736 TTGGCTGACCGAGAGCTGGTTGTCATCATCGGCTGGGCCAAGCATATCCCAGGCTTCTCCAGTCTGTCTTTAGGAGACCAGATGAGTCTACTGCAGAGCGCTTGG
 281 M  E  I  L  I  L  R  V  V  Y  R  S  L  P  F  E  D  K  L  V  Y  A  E  D  Y  I  M  D  E  D  Q  S  K  L  A
 841 ATGGAGATCTTGATCTTGCGGGTGGTGTACCGATCATTGCCCTTCGAGGACAAGCTGGTGTATGCTGAGGACTACATCATGGACGAGGACCAGTCGAAACTCGCC
 316 G  L  L  D  L  N  N  A  I  L  Q  L  V  K  K  Y  K  S  M  K  L  E  K  E  S  L  S  P  S  K  Q  L  R  S  Q
 946 GGTCTGCTGGACCTCAACAATGCCATCCTGCAGCTGGTGAAGAAATACAAGAGCATGAAGTTGGAGAAGGAGAGTTTGTCACCCTCAAAGCAATTGCGCTCGCAA
 351 I  Q  T  P  C  T  *
1051 ATTCAGACTCCATGCACATAG
```

(ERRγ_X2)

```
   1 M  D  S  V  E  L  S  L  P  E  F  F  S  F  H  S  E  Q  E  L  L  C  R  M  S  S  K  E  R  R  I  E  S  S  C
   1 ATGGATTCTGTAGAACTTTCCCTGCCTGAGTTCTTCTCCTTTCACTCTGAACAAGAGCTGCTCTGCAGGATGTCAAGCAAGGAGCGGCGCATTGAGTCCAGTTGC
  36 P  S  Y  I  K  T  E  P  S  S  P  A  S  L  A  D  S  V  N  H  H  S  P  G  G  S  S  D  A  S  G  S  Y  S  S
 106 CCCTCATACATCAAGACAGAACCGTCCAGTCCTGCCTCCCTCGCTGACAGCGTGAACCACCACAGCCCCGGTGGGTCTTCAGACGCCAGTGGCAGCTACAGCTCA
  71 A  T  N  G  H  P  N  G  L  D  S  P  T  L  Y  G  Q  A  G  S  L  G  P  N  V  A  G  A  T  K  R  Y  E  D  C
 211 GCCACAAACGGGCACCCCAACGGCCTAGACTCCCCCACGCTGTATGGTCAGGCAGGCAGCCTAGGCCCCAATGTGGCCGGGGCCACCAAGCGCTACGAGGACTGC
 106 S  S  T  M  A  E  D  S  Q  I  K  C  E  Y  M  L  N  S  M  P  K  R  L  C  L  V  C  G  D  V  A  S  G  Y  H
 316 TCTAGCACCATGGCTGAAGACTCACAGATCAAGTGCGAGTACATGCTCAACTCCATGCCCAAGCGTCTGTGCCTGGTGTGTGGCGATGTGGCATCTGGCTACCAC
 141 Y  G  V  A  S  C  E  A  C  K  A  F  F  K  R  T  I  Q  G  N  I  E  Y  S  C  P  A  T  N  E  C  E  I  T  K
 421 TACGGAGTGGCGTCTTGTGAAGCCTGCAAGGCCTTCTTCAAGCGGACCATCCAAGGAAACATCGAGTACAGCTGCCCGGCCACCAACGAGTGTGAGATCACTAAG
 176 R  R  R  K  S  C  Q  A  C  R  F  M  K  C  L  T  V  G  M  L  R  E  G  V  R  L  D  R  V  R  G  G  R  Q  K
 526 AGGAGACGGAAGTCCTGCCAGGCGTGCCGCTTCATGAAGTGTCTTACTGTGGGAATGCTGCGGGAAGGTGTCCGGCTCGACAGAGTGCGTGGCGGCCGGCAGAAG
 211 Y  K  R  R  I  D  A  E  N  S  P  Y  L  N  P  Q  L  A  L  P  P  K  K  P  Y  N  K  V  V  S  H  L  L  V  A
 631 TACAAGCGCCGGATAGACGCGGAGAACAGCCCCTACCTGAACCCACAGCTGGCCCTGCCACCTAAAAAACCATACAACAAAGTGGTGTCCCACCTCCTGGTGGCA
 246 E  P  E  K  I  Y  A  M  P  D  P  T  V  P  D  S  D  I  K  A  L  T  T  L  C  D  L  A  D  R  E  L  V  V  N
 736 GAACCTGAGAAGATCTATGCCATGCCTGATCCCACTGTTCCCGACAGCGACATCAAGGCGCTGACCACACTCTGCGACCTGGCTGACCGCGAGCTGGTGGTCAAC
 281 I  G  W  A  K  H  I  P  G  R  S  L  P  S  T  L  E  K  A  V  D  P  S  P  W  P  H  L  V  N  Y  G  G  A  P
 841 ATCGGCTGGGCCAAACACATCCCAGGTAGGAGCCTTCCCAGTACCCTTGAGAAAGCAGTGGACCCCTCACCTTGGCCACATCTGGTAAACTATGGAGGAGCTCCA
 316 N  R  H  W  S  N  S  G  I  V  K  L  V  V  A  L  L  C  Y  R  I  L  V  L  F  L  F  N  L  C  I  S  L  H  V
 946 AACAGACACTGGTCTAACAGTGGCATAGTAAAGCTGGTTGTGGCCTTGTTGTGCTACAGGATTCTCGTCTTATTTCTTTTTAATCTCTGCATTTCTTTACATGTC
 351 R  I  F  C  R  V  C  L  Y  I  V  N  L  G  A  V  S  *
1051 AGAATTTTTTGCAGAGTCTGCCTCTATATAGTTAACTTGGGAGCAGTAAGTTAG
```

Annexe 7a : Séquences nucléotidiques et séquences protéiques déduites des récepteurs apparentés aux récepteurs œstrogéniques alpha (ERRα) et gamma (ERRγ) de *H. niloticus* (HnERRα, HnERRγ_X1 et HnERγ_X2). Le codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en gras. La région A/B en position N-terminale est suivie du domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé dans les encadrés et contenant la boite P soulignée doublement et la boite D en souligné simple. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est souligné simplement suivi du domaine F en position C-terminale.



Annexe7b : Structure secondaire des récepteurs apparentés aux récepteurs œstrogéniques (ERRα, ERRγ_X1 et ERγ_X2) de *H. niloticus* avec les cinq domaines caractéristiques et le nombre d'acides aminés (aa) correspondant.

Comparaison des traits de reproduction de deux espèces phylogénétiquement sœurs du groupe des Ostéoglossiformes : *Heterotis niloticus* en Afrique et *Arapaima gigas* en Amérique du Sud

Heterotis niloticus originaire du bassin hydrographique de l'Afrique tropicale et *Arapaima gigas* du bassin amazonien sont deux espèces phylogénétiquement sœurs qui possèdent des performances de croissance exceptionnelles, ce qui leur confère un intérêt économique majeur. Cependant, la reproduction en captivité de ces deux espèces se heurte encore à des difficultés en raison de l'absence de dimorphisme sexuel. La formation des couples de reproducteurs est donc problématique et leur comportement reproducteur est peu connu, et donc peu maîtrisé. Par ailleurs, les données moléculaires disponibles dans le domaine de la reproduction sont inexistantes chez *Heterotis niloticus* ainsi que les données de génétique des populations. Cette étude a donc pour objectif d'évaluer les ressources génétiques des populations d'*Heterotis*, de mettre au point des techniques de sexage, de suivre le comportement reproducteur de *A. gigas* en étang et de caractériser chez ces deux espèces les acteurs moléculaires de la vitellogenèse et sa régulation. A partir d'échantillons collectés au Cameroun, en Guinée et principalement en Côte d'Ivoire, l'analyse des gènes mitochondriaux a permis d'identifier six haplotypes du gène Cyt b et deux haplotypes d'un segment contenant le gène NADH1. Ces résultats montrent l'absence de différenciation haplotypique entre les stocks de pisciculture et les populations sauvages d'un même bassin et une différentiation haplotypique entre bassins versants. Ils corroborent l'origine camerounaise des *Heterotis* sauvages et de pisciculture présents en Côte d'Ivoire sans toutefois apporter la preuve du partage de mêmes haplotypes entre ces deux pays. Concernant les acteurs moléculaires, c'est grâce à une approche transcriptomique basée sur un séquençage en RNAseq *de novo* suivi d'analyses *in silico* qu'ont pu être identifiés, chez l'une et l'autre des deux espèces d'*Arapaimidae*, les hormones hypophysaires (PRL, FSH et LH) et leurs récepteurs ovariens, les récepteurs oestrogéniques (ERs) bêta et gamma, les vitellogénines (Vtg) et leur récepteur ovarien. La proximité phylogénétique des deux espèces a pu être confirmée sur la base des molécules identifiées. Pour le sexage des individus matures de *H. niloticus*, les tests ELISA se sont révélés positifs avec l'anti corps anti Vtg de *A. gigas* déjà disponible et l'anticorps anti Vtg de *H. niloticus* mis au point dans cette étude. Une approche protéomique en spectrométrie de masse ciblant la Vtg a également permis de différencier les deux sexes chez *H. niloticus*. Enfin, l'utilisation de la télémétrie ultrasonique a montré que cette technique est adaptée au suivi du comportement de *A. gigas* et de ce fait de l'espèce sœur *H. niloticus* dans un environnement où la turbidité de l'eau ne favorise pas des observations directes des couples ou des enregistrements vidéo.

Mots-clés : *Heterotis niloticus*, *Arapaima gigas*, Cyt b, NADH1, Ressources génétiques, Reproduction, Vitellogénine, Neurohormones, Récepteurs à l'estradiol, Télémétrie acoustique, Comportement reproducteur

Comparison of the reproductive traits of two phylogenetic sister species of the group Osteoglossomorpha : *Heterotis niloticus* in Africa and *Arapaima gigas* in South America

Heterotis niloticus − from the tropical Africa watershed − and *Arapaima gigas* − from the Amazon Basin − are two phylogenetic sister species that display exceptional growth performances; consequently, they may soon become of a major economic interest. However, the reproduction of these two species in captivity still faces difficulties because they have no sexual dimorphism. Reproductive pairing is therefore problematic, their reproductive behavior is poorly known and therefore poorly controlled. Moreover, molecular data in the field of reproduction are missing for *Heterotis niloticus*, and so are data about population genetics. This study aims to evaluate the genetic resources of populations of *Heterotis*, develop sexing techniques, monitor the reproductive behavior of *A. gigas* in ponds, and characterize the molecular actors of vitellogenesis and its regulation in these two species. Using samples collected in Cameroon, Guinea and mainly Côte d'Ivoire, mitochondrial gene analysis identified six haplotypes of the Cyt b gene and two haplotypes of a segment containing the NADH1 gene. The results showed no haplotypic differentiation between fish stocks and wild populations belonging to a same basin, but haplotype differentiation between watersheds. They corroborate that the wild and farmed *Heterotis* of Côte d'Ivoire first came from Cameroon, but do not bring evidence of a same haplotype shared between these two countries. Concerning the molecular actors, using a transcriptomic approach based on *de novo* RNAseq sequencing followed by *in silico* analyses, the pituitary hormones (PRL, FSH and LH) and their ovarian receptors, beta and gamma estrogen receptors (ERs), vitellogenins (Vtg) and their ovarian receptor were identified in both species of *Arapaimidae*. The phylogenetic proximity of the two species could be confirmed on the basis of these molecules. For the sexing of mature *H. niloticus* individuals, ELISA tests were positive with available *A. gigas* anti Vtg antibodies and with *H. niloticus* anti Vtg antibodies developed for this study. A proteomic approach in mass spectrometry targeting Vtg also differentiated the two sexes in *H. niloticus*. Finally, the use of ultrasonic telemetry showed that this technique is suitable for monitoring the behavior of *A. gigas* and thus of the sister species *H. niloticus* in an environment where the water turbidity does not favor direct observations of couples or video recordings.

Keywords :

Heterotis niloticus, *Arapaima gigas*, Cyt b, NADH1, Genetic resources, Reproduction, Vitellogenin, Neurohormones, Estradiol receptors, Acoustic telemetry, Reproductive behavior