



**HAL**  
open science

**Caractérisation moléculaire des transporteurs ioniques  
impliqués dans les mécanismes d'acclimatation aux  
changements de salinité chez le loup de mer,  
Dicentrarchus labrax**

Eva Blondeau-Bidet

► **To cite this version:**

Eva Blondeau-Bidet. Caractérisation moléculaire des transporteurs ioniques impliqués dans les mécanismes d'acclimatation aux changements de salinité chez le loup de mer, *Dicentrarchus labrax*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-02995360

**HAL Id: hal-02995360**

**<https://ephe.hal.science/hal-02995360>**

Submitted on 9 Nov 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.

Copyright



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

## ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

### MÉMOIRE

présenté par

**Eva BLONDEAU-BIDET**

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études en  
Sciences de la Vie et de la Terre

### **Caractérisation moléculaire des transporteurs ioniques impliqués dans les mécanismes d'acclimatation aux changements de salinité chez le loup de mer, *Dicentrarchus labrax*.**

Soutenu le 23 octobre 2020 devant le jury composé de :

Dr Claudine Montgelard	Maître de conférences EPHE, Montpellier	Présidente
Dr Catherine Lorin-Nebel	Maître de conférences UM, Montpellier	Tutrice scientifique
Dr Mireille Rossel	Maître de conférences EPHE, Montpellier	Tutrice pédagogique
Dr Isabelle Leguen	Chargée de recherche INRAE, Rennes	Rapporteuse
Dr Helena D'Cotta	Chargée de recherche CIRAD, Montpellier	Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Catherine Lorin-Nebel  
UMR MARBEC, MARine Biodiversity, Exploitation and Conservation  
Université Montpellier Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier

Directeur: Laurent Dagorn

Dr Mireille Rossel  
UMR 1198 Mécanismes moléculaires dans les démences neurodégénératives  
GRET: Approche Translationnelle des Maladies Neurodégénératives (TRANS-NEURO)  
Université Montpellier Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier

Directeur : Tanguy Maurice



## Remerciements

---

Mes premiers remerciements vont à **Catherine Lorin-Nebel**, ma tutrice scientifique. Tu m'as toujours soutenue dans mon souhait d'évolution professionnelle et sans toi ce travail n'aurait pas pu aboutir. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, tes encouragements dans les moments difficiles et ta confiance. Je te remercie pour le temps que tu m'as accordé et ce malgré un emploi du temps très chargé, notamment lors de la rédaction de mon mémoire. Je me suis surpassée pour répondre à tes exigences, grâce à toi j'ai beaucoup appris. Un très très grand merci !

Je remercie **Mireille Rossel**, qui a accepté d'être ma tutrice pédagogique, pour m'avoir accompagnée durant tout ce projet. Merci pour votre disponibilité, vos encouragements, votre gentillesse et la confiance que vous m'avez accordée dès le début de la formation.

Je tiens également à remercier les membres du jury : **Claudine Montgélard, Isabelle Leguen et Helena D'Cotta** pour avoir accepté d'évaluer mon travail dans le cadre du diplôme de l'EPHE.

Merci au pôle formation de la **délégation Occitanie-Est du CNRS et Guillaume Gary** sans qui je n'aurais pas pu m'inscrire à cette formation. Merci également à **Thierry Bouvier** pour ton soutien dans cette démarche et les facilités que tu m'as accordées pour suivre cette formation.

Merci aux « relecteurs » de ce mémoire : **Guy Charmantier, Benjamin Geffroy, Emilie Farcy et Sophie Hermet** d'avoir pris le temps de relire mon mémoire dans la dernière ligne droite.

**Guy**, je vous suis très reconnaissante pour votre soutien, pour vos conseils, votre disponibilité, votre écoute attentive et pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon arrivée au laboratoire. Vous avez cerné ma personnalité et notamment ce besoin de relever des défis. J'ai mis des virgules en essayant de bien les placer mais j'ai sans doute fait des erreurs ;-).

**Benjamin**, merci pour ton regard différent sur le monde de la recherche, ton optimisme et ton dynamisme. Merci pour ta confiance et ta reconnaissance. Notre collaboration est récente mais elle s'annonce encourageante (si possible sans partie de bataille navale avec les plaques de qPCR) !

**Emilie**, merci pour tes conseils et tes encouragements. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble. Dommage que le projet CAMEVOL n'ait pas été accepté !

**Sophie**, merci pour ces moments de partages. J'ai trouvé en toi, une collègue bienveillante et à l'écoute ; une collègue sur qui on peut compter ! Merci pour ton soutien.

Qu'aurait été cette aventure sans le soutien de mes parents. Ma mère, **Roselyne**, merci d'être là et de m'avoir donné les moyens de réussir. Grâce à toi, j'ai pu choisir ma propre voie et exercer un métier qui me plaît. C'est avec beaucoup d'émotion, que je remercie mon père, **Serge**, pour notre dernier échange. Tu m'as dit que tu étais fier de moi, j'ignorais qu'il s'agissait de tes derniers mots. Ils comptent énormément pour moi. J'aurais aimé partager cette aventure avec toi.

**Ronan**, avec toi tout est possible, tu es tout pour moi. Merci pour ton amour, ta bienveillance, ton soutien, ton optimisme, ta tolérance, ta patience ... Merci infiniment !



# Table des matières

---

<b>A. Introduction</b>	<b>1</b>
1. Généralités	1
2. Milieux aquatiques	4
3. Tolérance à la salinité chez les téléostéens	6
4. Le loup européen, comme modèle biologique	7
5. Osmorégulation	10
a. Les différents types d'osmorégulation	10
b. A l'échelle de l'organisme : mécanismes d'hypo- et d'hyper-osmorégulation	11
c. A l'échelle cellulaire : les ionocytes branchiaux	15
d. A l'échelle moléculaire : les transporteurs ioniques et le contrôle hormonal	17
6. Rôle de l'épigénétique dans les processus d'acclimatation	21
<b>B. Objectifs</b>	<b>23</b>
<b>C. Protocole expérimental</b>	<b>24</b>
<b>I. Etude des gènes clés impliqués dans l'osmorégulation de loups acclimatés à l'eau douce</b>	<b>26</b>
<b>I.1. Matériels et méthodes</b>	<b>26</b>
I.1.1. Protocole expérimental	26
I.1.2. Analyse phylogénétique	27
I.1.3. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire	27
I.1.4. Électrophorèse sur gel dans les tissus osmorégulateurs	27
I.1.5. PCR quantitative en temps réel	28
I.1.6. Immunohistochimie	28
I.1.7. Analyses statistiques	29
<b>I.2. Résultats</b>	<b>29</b>
I.2.1. Identification, annotation et phylogénie des gènes des échangeurs Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> chez le loup	29
I.2.2. Modèles d'expression de l'ARNm des gènes paralogues dans les tissus osmorégulateurs	30
I.2.3. Expression des transcrits	31
I.2.4. Immunolocalisation des transporteurs	32
<b>I.3. Discussion</b>	<b>34</b>
I.3.1. NHE3, une protéine clé exprimée dans les ionocytes lamellaires des branchies de loups en eau douce	34
I.3.2. L'absorption du Na <sup>+</sup> via NHE3, pourrait être couplée à d'autres protéines via un métabolite	34
I.3.3. Deux gènes paralogues <i>nhe2</i> sont exprimés dans les branchies du loup mais leur rôle dans l'absorption de Na <sup>+</sup> semble mineur	34
I.3.4. Transport couplé Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> dans les ionocytes des filaments branchiaux via NCC2	35
<b>I.4. Conclusion</b>	<b>36</b>
<b>II. Etude des mécanismes d'absorption ionique par une approche in vitro</b>	<b>37</b>
<b>II.1. Introduction</b>	<b>37</b>
II.1.1. Etudes <i>in vivo</i> versus <i>in vitro</i>	37
II.1.2. Facteurs de régulation : prolactine et/ou osmolalité extracellulaire	38
<b>II.2. Objectifs</b>	<b>40</b>
<b>II.3. Matériel et Méthodes</b>	<b>40</b>
II.3.1. Protocole expérimental	40
II.3.2. Prélèvement de sang	41
II.3.3. Mesure de pression osmotique	41

II.3.4.	Préparation des filaments branchiaux et des milieux d'incubation	41
II.3.5.	Choix des transporteurs ioniques	42
II.3.6.	Extraction d'ARN, synthèse de l'ADN complémentaire et qPCR	42
II.3.7.	Analyses statistiques	42
<b>II.4.</b>	<b>Résultats</b>	<b>44</b>
II.4.1.	Osmolalité sanguine et choix de l'osmolalité des milieux de culture	44
II.4.2.	Effet de l'osmolalité extracellulaire sur l'expression des transcrits	45
II.4.3.	Effet de la prolactine sur l'expression des gènes	46
<b>II.5.</b>	<b>Discussion</b>	<b>48</b>
II.5.1.	Evolution de l'osmolalité sanguine suite à un changement de salinité	48
II.5.2.	Pas de réponse à court terme pour <i>nka α1a</i> , <i>ncc 2a</i> et <i>nhe3</i>	49
II.5.3.	Surexpression de <i>clc 3</i> en milieu hypotonique	49
II.5.4.	La diminution de l'osmolalité induit une surexpression de <i>ae1 a</i>	50
II.5.5.	L'effet synergique de l'osmolalité et de la prolactine dans l'activation de <i>rhcg 1</i>	51
II.5.6.	Sensibilité différentielle des récepteurs à la prolactine aux stimuli osmotique et hormonal	52
II.5.7.	Méthodes d'incubation	54
<b>II.6.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>55</b>
<b>III.</b>	<b>La salinité, un marqueur épigénétique ?</b>	<b>57</b>
<b>III.1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>57</b>
III.1.1.	Biologie de la méthylation de l'ADN	57
III.1.2.	Rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes	58
<b>III.2.</b>	<b>Objectif</b>	<b>59</b>
<b>III.3.</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>60</b>
III.3.1.	Protocole expérimental	60
III.3.2.	Extraction de l'ADN génomique	60
III.3.3.	Extraction des ARN	60
III.3.4.	Séquençage du génome après traitement au bisulfite de sodium	60
III.3.5.	Analyses des données du séquençage	62
<b>III.4.</b>	<b>Résultats</b>	<b>65</b>
III.4.1.	Données statistiques du séquençage	65
III.4.2.	Analyse des zones différentiellement méthylées entre les phénotypes ED et EM	67
III.4.3.	Annotation fonctionnelle des RDM	68
<b>III.5.</b>	<b>Discussion</b>	<b>72</b>
III.5.1.	Conservation des profils de méthylation de l'ADN chez les téléostéens	72
III.5.2.	La diminution de la salinité environnementale modifie la méthylation de l'ADN chez le loup	72
III.5.3.	Méthylation des gènes impliqués dans la perméabilité transépithéliale	73
III.5.4.	Méthylation des gènes impliqués dans le transport ionique	74
III.5.5.	Méthylation des gènes impliqués dans le contrôle hormonal	75
<b>III.6.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>76</b>
<b>D.</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>77</b>
<b>E.</b>	<b>Perspectives</b>	<b>80</b>
<b>F.</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>83</b>
<b>G.</b>	<b>Annexes</b>	<b>100</b>
<b>Résumé</b>		<b>112</b>

## Liste des illustrations

---

Fig. 1 : Diversité des téléostéens	1
Fig. 2 : Phylogénie simplifiée des téléostéens	2
Fig. 3 : Lagunes, estuaires et deltas	5
Fig. 4 : Variation du taux de salinité des lagunes méditerranéennes	6
Fig. 5 : <i>Dicentrarchus labrax</i> et son aire de distribution géographique	7
Fig. 6 : Production mondiale de <i>Dicentrarchus labrax</i> en aquaculture	8
Fig. 7 : Illustration du cycle de vie du loup	9
Fig. 8 : Stratégies d'osmorégulation en fonction de l'osmolarité du milieu extérieur	10
Fig. 9 : Osmodétection chez les poissons	11
Fig. 10 : Structure anatomique des branchies de poissons	12
Fig. 11 : Mécanismes d'hypo et hyper-osmorégulation à l'échelle de l'organisme chez les téléostéens	14
Fig. 12 : Ionocytes branchiaux chez le loup en fonction de la salinité.	16
Fig. 13 : Ionocytes et voies de transport des ions dans les branchies et la peau du poisson-zèbre	18
Fig. 14 : Contrôle hormonal du transport ionique et hydrique	19
Fig. 15 : Morphologie, mécanismes de transport et contrôle hormonal des ionocytes branchiaux	20
Fig. 16 : Réponses épigénétiques au changement environnemental	22
Fig. 17 : Origine et utilisation des échantillons utilisés dans ce projet de recherche	25
Fig. 18 : Arbre phylogénique de <i>nhe2 (sl9a2)</i>	30
Fig. 19 : Analyse de la distribution tissulaire des transporteurs ioniques	30
Fig. 20 : Expression relative des ARNm des transporteurs ioniques	31
Fig. 21 : Immunolocalisation de la NKA, de NHE3 et de NKCC/NCC	33
Fig. 22 : Modèle proposé de l'ionocyte en eau de mer, et des différents ionocytes d'eau douce chez le loup	36
Fig. 23 : Prélèvement et incubation des filaments branchiaux	42
Fig. 24 : Evolution de l'osmolalité sanguine chez le loup après un transfert en eau douce	44
Fig. 25 : Effets de l'osmolalité extracellulaire sur l'expression des ARNm	45
Fig. 26 : Effets de la concentration de la prolactine ovine sur l'expression des ARNm	46
Fig. 27 : Localisation apicale versus localisation basolatérale de l'échangeur AE1	50
Fig. 28 : Fonctionnement du métabolisme NHE3/RHGC1	52
Fig. 29 : Position des gènes des récepteurs de la prolactine (PRLR) et de l'hormone de croissance (GHR)	53
Fig. 30 : Synthèse des processus de régulation ionique in vivo et in vitro dans les branchies	56
Fig. 31 : Interaction entre la méthylation de l'ADN, la transcription des gènes et la structure de la chromatine	58
Fig. 32 : Principe général du séquençage haut-débit après traitement au bisulfite	61
Fig. 33 : Pipeline d'analyses bio-informatiques pour l'analyse des données du séquençage WGBS	62
Fig. 34 : Exemple d'arborescence pour la sous-catégorie « ion transmembrane transporter »	64
Fig. 35 : Niveau global de méthylation de l'ADN	65
Fig. 36 : Profils de méthylation de l'ADN en fonction des positions génomiques	66
Fig. 37 : Regroupement des phénotypes selon leur profil de méthylation	66
Fig. 38 : Distribution de la méthylation selon les positions génomiques	67
Fig. 39 : Distribution des termes d'ontologie génétique pour la catégorie « fonctions moléculaires »	68
Fig. 40 : Analyse d'enrichissement des termes d'ontologie génétique des domaines génomiques	69
Fig. 41 : Niveau de méthylation de chaque échantillon au niveau du promoteur du gène de la claudine 23	71
Fig. 42 : Modèle du complexe des jonctions serrées entre cellules épithéliales	74
Fig. 43 : Nombre de publications ayant pour sujet le stress de salinité et l'euryhalinité chez le loup	82
Tableau 1 : Composition ionique de différentes eaux	5
Tableau 2 : Amorces utilisées dans ce chapitre	43
Tableau 3 : Synthèse des résultats du test statistique Scheirer Ray Hare à deux facteurs avec interaction	47
Tableau 4 : Résumé statistique des données du séquençage	65
Tableau 5 : Gènes différentiellement méthylés impliqués dans l'osmorégulation	70

## Liste des abréviations

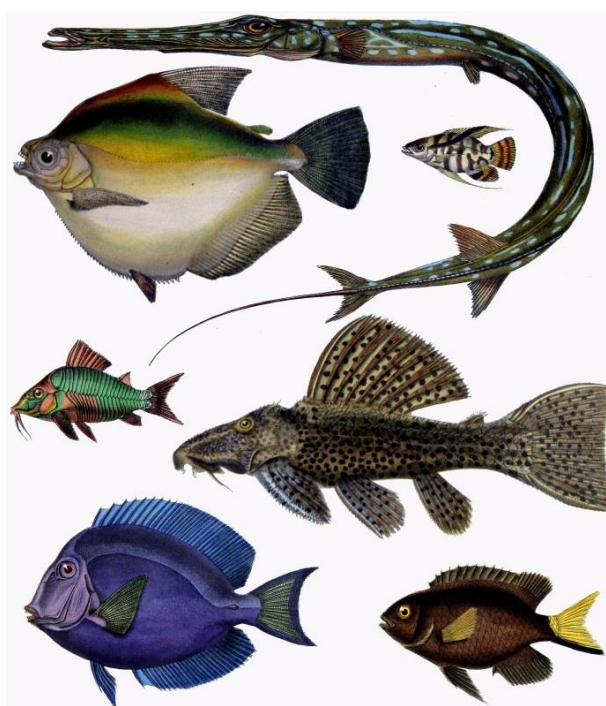
---

<b>AE1</b>	échangeur d'anions $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$
<b>AQP3</b>	aquaporine 3
<b>CA2</b>	anhydrase carbonique 2
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, canal à $\text{Cl}^-$
<b>CIC3</b>	canal à $\text{Cl}^-$ 3
<b>CP</b>	Crossing Point (qPCR)
<b>CpG</b>	dinucléotide cytosine phosphate guanine
<b>CRISPR/Cas9</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9
<b>DNMT</b>	DNA MethylTransferase, méthyltransférase de l'ADN
<b>ED</b>	eau douce
<b>EM</b>	eau de mer
<b>EMD</b>	eau de mer diluée
<b>GH</b>	Growth Hormone, hormone de croissance,
<b>GO</b>	Gene Ontology, ontologie génétique
<b>HR cell</b>	cellule riche en VHA
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growth Factor-1, facteur de croissance analogue à l'insuline-1,
<b>KO</b>	Knockout, perte de fonction
<b>KS cell</b>	cellule sécrétant des ions $\text{K}^+$
<b>MAP-Kinase</b>	Mitogen-Activated Protein kinases
<b>NaR cell</b>	cellule riche en NKA
<b>NBC1</b>	cotransporteur $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 1
<b>NCC</b>	cotransporteur $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$
<b>NCC cell</b>	cellule riche en NCC
<b>NGS</b>	New Generation Sequencing, séquençage de nouvelle génération
<b><math>\text{NH}_3</math></b>	ammoniac
<b><math>\text{NH}_4^+</math></b>	ammonium
<b>NHE3</b>	échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 3
<b>NKA</b>	pompe à sodium, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
<b>NKCC</b>	cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$
<b>NKCC1</b>	cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$
<b>PRL</b>	prolactine
<b>PRLR</b>	récepteur à la prolactine
<b>RHBG</b>	transporteur $\text{NH}_4^+$ Rh type B
<b>RHCG1</b>	transporteur $\text{NH}_4^+$ Rh type C1
<b>RMD</b>	région différenciellement méthylée
<b>SLC26 cell</b>	cellule riche en SLC26 (échangeur d'anion $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ )
<b>T4</b>	anticorps anti-NKCC1-2/NCC1-2
<b>TES</b>	Transcription end site, site de terminaison de la transcription
<b>TSS</b>	Transcription start site, site d'initiation de la transcription
<b>UTR</b>	Untranslated Transcribed Region, région non traduite
<b>VHA</b>	V-type $\text{H}^+$ -ATPase
<b>WGBS</b>	Whole Genome Bisulfite Sequencing, séquençage du génome entier après traitement au bisulfite
<b>WGD</b>	Whole Genome Duplication, duplication de génome entier

## A. Introduction

### 1. Généralités

Les poissons téléostéens constituent le groupe le plus dominant parmi les vertébrés et représentent avec plus de 30 000 espèces, 47 % des vertébrés (Lecointre et al., 2010; Nelson et al., 2016). 99 % des poissons actuels sont des téléostéens et font partie de la classe des actinoptérygiens ou poissons à nageoires rayonnées (Lecointre et al., 2010). Ils ont investi tous les milieux aquatiques : mers, océans, fleuves, torrents, abysses, ..., des zones tropicales aux régions polaires (Le Guyader et Lecointre, 2013). Les téléostéens, par leur étonnante diversité en termes de morphologie (Fig. 1), d'écologie et de physiologie sont des exemples vivants d'un succès adaptatif impressionnant et constituent un modèle intéressant pour comprendre l'évolution et la diversité des vertébrés (Volff, 2005).



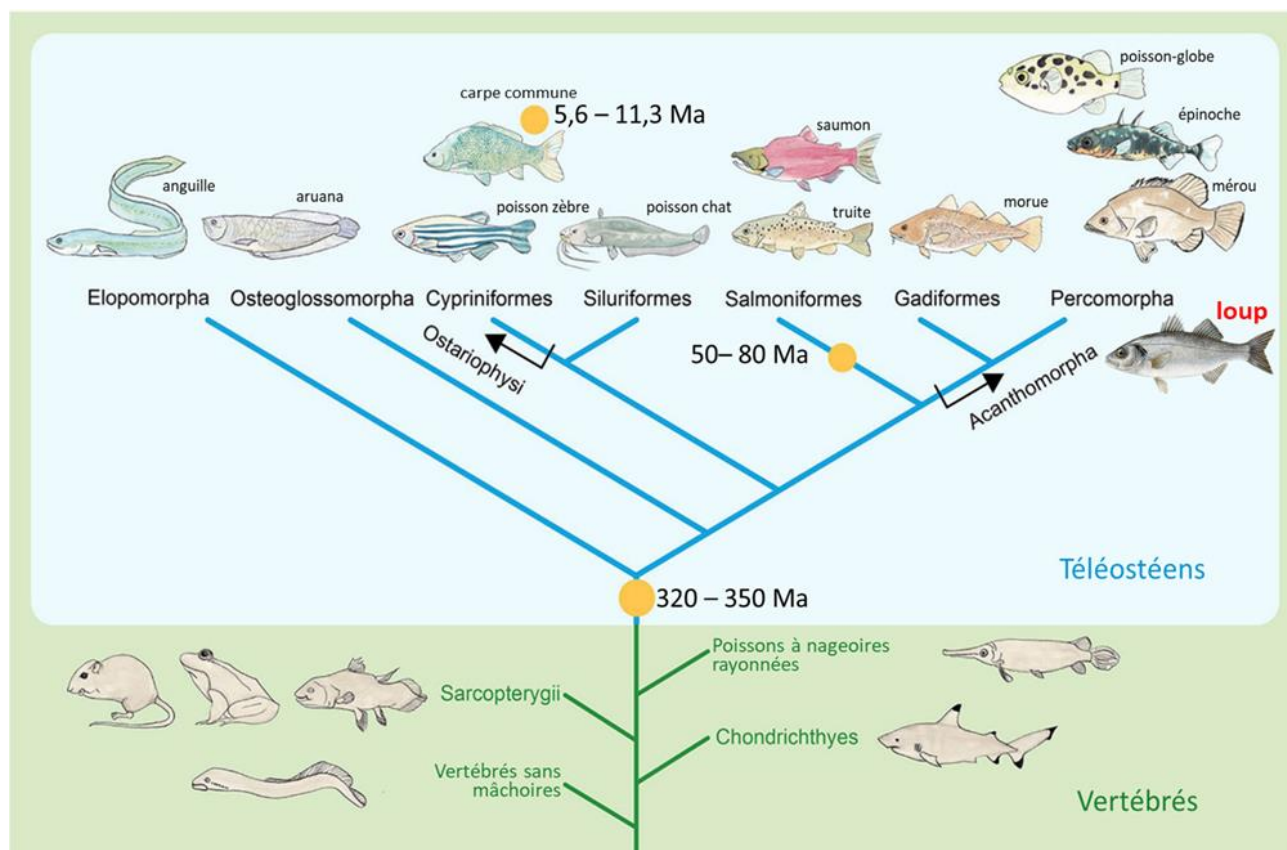
**Fig. 1 : Diversité des téléostéens**

Sélection de peintures de téléostéens de Francis de Laporte de Castelneau, 1856. De gauche à droite et de haut en bas : poisson cornet (*Fistularia tabacaria*), mylossoma argenté (*Mylossoma duriventre*), mesotauna (*Mesonauta acora*), poisson-chat émeraude (*Corydoras splendens*), poisson-chat blindé (*Pseudacanthicus spinosus*), poisson chirurgien bleu (*Acanthurus coeruleus*), demoiselle à pointe jaune (*Stegastes pictus*). Source : <https://en.wikipedia.org/wiki/Teleost#>

Selon plusieurs études, la duplication de génomes entiers (WGD : Whole Genome Duplication) serait un facteur dominant dans l'évolution de la complexité et de la diversité des vertébrés et notamment à l'origine des nombreuses espèces qui composent le clade des téléostéens (Glasauer et Neuhaus, 2014; Meyer et Van De Peer, 2005; Ohno et al., 1968; Parey et al., 2020; Van De Peer et al., 2009; Volff, 2005). Ohno (1970) a émis l'hypothèse que l'augmentation de la taille du génome chez les vertébrés serait due à deux évènements successifs de duplications de génomes entiers (1R-WGD et 2R-WGD), survenus chez l'ancêtre commun des vertébrés (Ohno, 1999, 1970). La duplication de génomes entiers est un phénomène biologique par lequel tout le génome d'une cellule d'un organisme est doublé, ce qui conduit à l'acquisition d'un ensemble supplémentaire de chromosomes (Glasauer et Neuhaus, 2014; Moriyama et Koshiba-Takeuchi, 2018). Suite aux deux évènements 1R-WGD et 2R-WGD, il a été démontré que le devenir le plus probable des gènes dupliqués était la non-fonctionnalisation, causée par l'absence de contrainte sélective pour maintenir la fonction (Brunet et al., 2006; Jaillon et al., 2004).

Toutefois, les gènes dupliqués peuvent également être conservés. Contrairement à la non-fonctionnalisation, les mécanismes qui permettent la conservation des doublons sont la sous-fonctionnalisation correspondant au partage des fonctions du gène ancestral par les gènes dupliqués et la néo-fonctionnalisation définie comme l'acquisition d'une nouvelle fonction par les gènes dupliqués (Moriyama et Koshiba-Takeuchi, 2018). Les gènes dupliqués issus des évènements de WGD sont dits paralogues, tandis que les gènes ayant divergé après un évènement de spéciation sont dits orthologues.

L'essor des technologies de séquençage haut-débit et le développement d'outils bio-informatiques ont permis de corroborer l'hypothèse de Ohno (1970) concernant les deux évènements de duplication du génome chez les vertébrés et de les dater d'environ 520 à 550 millions d'années (Ma) (Holland et al., 2008; Putnam et al., 2008; Van De Peer et al., 2009). Le séquençage du génome complet de plusieurs espèces de téléostéens, associé à des analyses de synténie, ont permis de mettre en évidence l'existence d'un troisième évènement de duplication de génome entier spécifique aux téléostéens (3R-WGD), survenu il y a environ 320 à 350 Ma (Aparicio et al., 2002; Howe et al., 2013; Jaillon et al., 2004; Kasahara et al., 2007; Schartl et al., 2013). En plus des duplications de génomes chez l'ancêtre commun des téléostéens, des duplications plus récentes ont été mises en évidence chez les salmonidés (Ss4R) et les cyprinidés (Fig. 2), il y a 50 à 80 Ma et 5.6 à 11.3 Ma, respectivement (Alexandrou et al., 2013; Wang et al., 2012).



**Fig. 2 : Phylogénie simplifiée des téléostéens**

La lignée des téléostéens se sépare à partir des poissons à nageoires rayonnées (actinopterygiens) et a commencé à diverger après un évènement de duplication de génome entier (3R-WGD) qui s'est déroulé entre 320 et 350 Ma. Des duplications de génomes entiers supplémentaires se sont produits à la base des salmonidés, il y a 50 à 80 Ma et chez un ancêtre proche de la carpe commune, il y a 5,6 à 11,3 Ma. Les points orange décrivent les évènements de duplications dans l'évolution des téléostéens. Les évènements de duplications en dehors des téléostéens ne sont pas affichés. Ma : millions d'années. Modifié d'après (Glasauer et Neuhaus, 2014).

Chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), des chercheurs ont estimé que 20 % des gènes dupliqués étaient conservés (Postlethwait, 2000; Postlethwait et al., 2004; Woods et al., 2005), ce pourcentage serait le taux maximal après le 3R-WGD, spécifique aux téléostéens (Glasauer et Neuhauss, 2014). Chez la truite-arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le séquençage a permis de montrer que la moitié des gènes codant pour les protéines ont été conservés sous forme de duplicata après le quatrième cycle de duplication spécifique des salmonidés (Berthelot et al., 2014). Le nombre supplémentaire de gènes résultant de ces événements successifs de duplication aurait facilité le rayonnement évolutif et la diversification phénotypique des téléostéens (Hoegg et al., 2004). Il a été suggéré que le troisième événement de duplication aurait augmenté la flexibilité génomique des poissons leur permettant de s'adapter rapidement aux changements environnementaux sélectifs (Wittbrodt et al., 1998). Il a été également proposé que l'anadromie (désigne les espèces qui migrent de l'eau de mer vers l'eau douce pour se reproduire, comme le saumon par exemple), était une conséquence de la duplication de génome à la base des salmonidés (Alexandrou et al., 2013) mais une autre hypothèse suggère que ce sont des facteurs éco-physiologiques liés à un refroidissement climatique qui seraient à l'origine de cette innovation génétique (Macqueen et Johnston, 2014).

Parmi les téléostéens entièrement séquencés, le génome du loup européen (*Dicentrarchus labrax*) possède le plus grand nombre de copies de gènes impliqués dans l'osmorégulation (94 gènes), notamment les claudines, les aquaporines, la prolactine et ses récepteurs (Tine et al., 2014). Les génomes du loup et du poisson-zèbre contiennent 18 gènes appartenant à la famille des aquaporines (protéines qui forment des « pores » perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques), ce qui représente le plus grand répertoire d'aquaporines fonctionnelles chez les vertébrés (Tine et al., 2014; Tingaud-Sequeira et al., 2010). L'existence de ces gènes dupliqués dans la lignée ancestrale du loup suite à la duplication du génome entier des téléostéens (3R-WGD) favoriserait la tolérance aux changements rapides de salinité (Tine et al., 2014; Vandeputte et al., 2019).

**L'écophysiologie animale** s'intéresse aux interactions entre les organismes et leur environnement à différentes échelles, d'un point de vue mécanistique. Cette discipline se focalise sur les mécanismes physiologiques pour tenter de comprendre comment les organismes font face aux contraintes de l'environnement dans lequel ils évoluent. Grâce à une approche intégrative, qui va de l'écologie à la physiologie, à la biologie cellulaire et moléculaire et à l'évolution, l'écophysiologie permet de relier les réponses fonctionnelles des organismes à leur environnement.

Les capacités à faire face aux variations de l'environnement constituent un élément déterminant sur la survie, la distribution et les traits d'histoire de vie des organismes aquatiques. En effet, la survie et l'établissement d'une espèce dans un habitat donné sont conditionnés par la capacité d'acclimatation et d'adaptation de chacun de ses stades de développement, aux paramètres biotiques (disponibilité alimentaire, prédation, parasitisme, ...) et abiotiques (température, pH, salinité, ...). Face aux modifications de leur milieu extérieur, les organismes aquatiques qui s'acclimatent avec succès le font soit en modifiant leur comportement (évitement des milieux contraignants), soit en mettant en place des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires permettant de tolérer les changements de leur environnement. Dans les milieux de transitions comme les estuaires et les lagunes, les facteurs abiotiques comme la salinité, la disponibilité en oxygène et la température sont particulièrement variables et dans certains cas représentent un facteur de stress pour les organismes.

Les mécanismes d'**acclimatation** mis en place lors d'un changement du milieu extérieur sont réversibles et s'étendent sur une durée de quelques heures à plusieurs jours ou semaines (Eckert et al., 1999). La réponse d'acclimatation est liée à la **plasticité phénotypique**, qui détermine la capacité d'un individu à



vivre dans certains habitats et définit ainsi les limites écologiques de la distribution de l'espèce (McCormick et Bradshaw, 2006). A une échelle de temps plus importante, si les changements environnementaux persistent au-delà d'une génération et induisent des variants phénotypiques et génétiques, plus adaptés sur plusieurs générations, on parlera d'**adaptation** (Cuenot, 1925; Thomas et al., 2010). Ce processus évolutif est généralement irréversible. Dans ce cas, les changements environnementaux peuvent agir comme un facteur évolutif en modifiant la séquence d'ADN génomique de certaines populations qui, si elle est exprimée au niveau du phénotype sera soumise à la sélection naturelle.

Plusieurs travaux récents ont montré que la diversité génétique ne permet pas d'expliquer à elle seule, les variations phénotypiques inter et intraspécifiques. D'autres processus peuvent être à l'origine de ces variations. Il s'agit de **mécanismes épigénétiques**, qui induisent, suite à l'influence de l'environnement, des changements héréditaires et/ou réversibles dans la régulation de l'expression des gènes sans modifier la séquence de l'ADN (Bird, 2007; Richards, 2006). Ces mécanismes épigénétiques peuvent conférer au génome une plasticité, permettant à un seul génotype d'exprimer plusieurs phénotypes en fonction des conditions environnementales (Angers et al., 2010; Massicotte et Angers, 2012). A l'échelle de l'individu, les réponses à des modifications de l'environnement dépendent donc à la fois des facteurs génétiques et épigénétiques permettant l'acclimatation et l'adaptation.

Il est admis que les individus d'une même espèce peuvent présenter des réponses physiologiques et comportementales divergentes à des stimuli ou à des facteurs de stress (Øverli et al., 2007; Rey et al., 2016). Il existe de nombreux exemples de **variabilité intraspécifique** en lien avec l'acclimatation à l'eau douce chez les téléostéens et notamment chez le loup. Des expérimentations en milieu contrôlé ont montré que suite à des transferts directs ou progressifs dans l'eau douce, certains juvéniles de loups s'acclimatent alors que d'autres meurent (Cataudella et al., 1991; Venturini et al., 1992). Un taux de mortalité d'environ 30 % parmi les loups exposés à l'eau douce a été rapporté dans plusieurs études (Giffard-Mena et al., 2008; L'Honoré et al., 2020, 2019; Nebel et al., 2005b). Cette mortalité différentielle suggère que les juvéniles de loups ne possèdent pas tous les mêmes capacités osmorégulatrices pour faire face à l'eau douce (Allegrucci et al., 1994; Dendrinis et Thorpe, 1985; Giffard-Mena et al., 2008; Jensen et al., 1998; Nebel et al., 2005b).

Cet exemple de variabilité intraspécifique démontre l'intérêt de ne pas considérer les individus d'une même espèce comme étant physiologiquement similaires, au risque de négliger la présence de **variabilité phénotypique** au sein d'une même espèce. La variabilité entre individu peut refléter un large éventail de mécanismes physiologiques, comportementaux et écologiques (Bolnick et al., 2003).

## 2. Milieux aquatiques

Le milieu aquatique regroupe les milieux marins (pleine mer et côtes), les deltas, estuaires et lagunes, les eaux fluviales, les milieux lacustres et souterrains. Ces milieux varient en fonction des facteurs abiotiques, telles que la salinité, la température, le pH, la nature des courants, la turbidité ou la profondeur. La **salinité** correspond à la quantité de sels dissous dans l'eau, exprimée en  $\text{mOsm.kg}^{-1}$  ou ‰. On parle alors d'**osmolalité**, c'est-à-dire la quantité de moles de toutes les molécules osmotiquement actives contenues dans un kilogramme de solvant. L'eau de mer a une composition ionique relativement stable. En revanche celle de l'eau douce ou saumâtre varie selon la nature du terrain (Tableau 1).



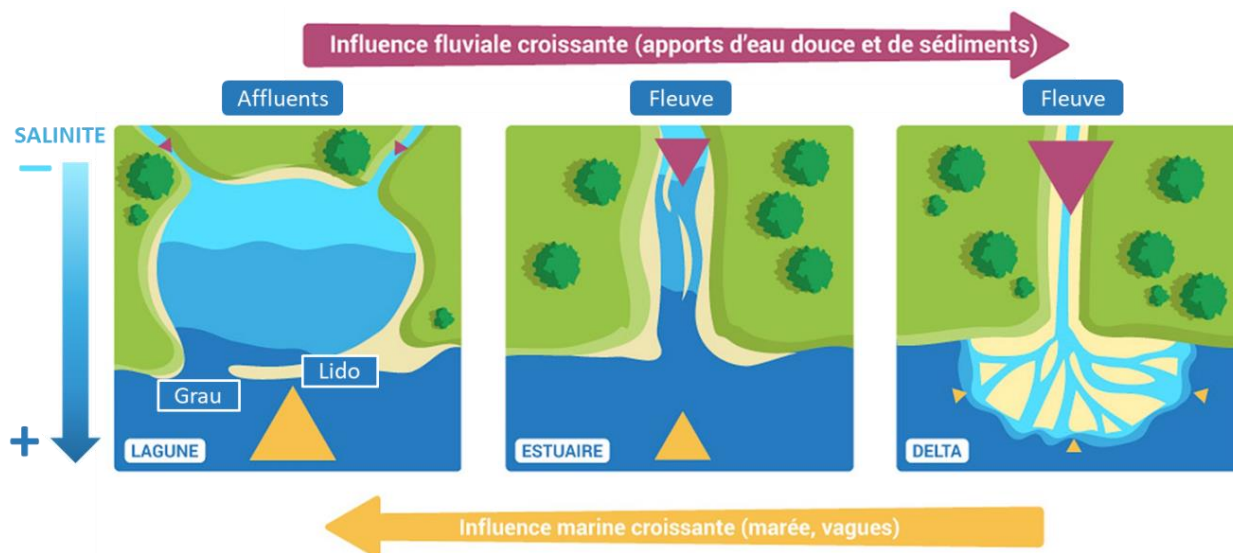
### Tableau 1 : Composition ionique de différentes eaux

Les ions majoritaires dans la composition de l'eau sont le sodium et le chlorure. Source : Licence Biologie UE physiologie cellulaire et animale Etienne Roux.

	Sodium Na <sup>+</sup>	Chlorure Cl <sup>-</sup>	Potassium K <sup>+</sup>	Calcium Ca <sup>2+</sup>	Magnésium Mg <sup>2+</sup>	Sulfate SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mOsm.kg <sup>-1</sup> (‰)
<b>Eau de mer</b>	478	558	10	10	54	28	≈ 1050 (35 ‰)
<b>Eau douce</b>	0.39	0.23	0.04	0.52	0.21	0.21	< 5 (0,2 ‰)
<b>Eau douce dure</b>	6.13	13.44	0.11	5.01	0.66	1.40	< 30 (1‰)

Les ions **sodium (Na<sup>+</sup>)** et **chlorure (Cl<sup>-</sup>)** sont les osmolytes les plus abondants dans l'eau et le sang et sont donc majoritairement impliqués dans les mécanismes d'acclimatation à la salinité. Les téléostéens, suivant les espèces, peuvent vivre dans des milieux allant de l'eau douce (0,2 à 1 ‰) à l'eau de mer (≈ 35 ‰) et même dans des milieux sursalés tels que certaines lagunes ou mers intérieures (> 38 ‰).

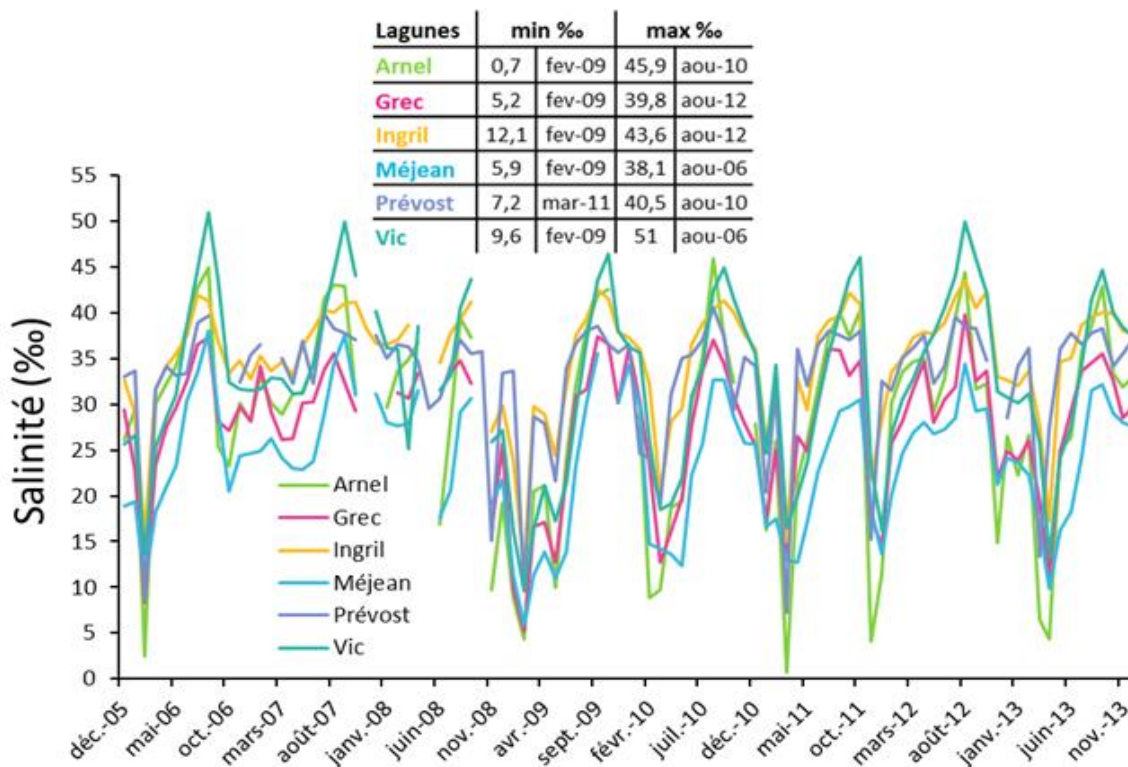
Les estuaires, lagunes et deltas sont des milieux de transition entre la terre et la mer remplissant de nombreuses fonctions écosystémiques (Fig. 3). Ces milieux se caractérisent par des fluctuations environnementales et nécessitent des capacités d'acclimations et d'adaptations physiologiques importantes afin d'assurer la survie et le maintien des populations qui y vivent (Kara et Quignard, 2018).



**Fig. 3 : Lagunes, estuaires et deltas**

Les estuaires et les deltas se trouvent à l'embouchure des fleuves, tandis que les lagunes sont généralement séparées de la mer par un cordon littoral (lido) et plus ou moins connectées avec la mer grâce à des ouvertures (graus). © Agence française pour la biodiversité / Réalisation Matthieu Nivresse (d'après OIEau, 2018). Source <https://www.eaufrance.fr/les-estuaires-lagunes-et-deltas>, modifié.

Les lagunes sont des écosystèmes dont les propriétés physico-chimiques sont très fluctuantes, surtout celles peu profondes, et elles présentent un gradient de facteurs abiotiques plus ou moins élevés. La salinité varie selon un gradient de la terre vers la mer et fluctue selon les saisons, la salinité étant plus forte en été en raison de l'évaporation liée aux fortes températures et plus faible en hiver notamment en raison de l'augmentation des précipitations et de la baisse des températures (Fig. 4). Les lagunes grâce à la présence d'herbiers servent de nurserie (habitat et nourriture) pour de nombreuses espèces. Ce sont de véritables réservoirs de biodiversité et elles sont donc d'un grand intérêt pour l'étude de l'acclimatation des espèces aquatiques en réponse aux changements de leur environnement et plus particulièrement aux variations de salinité.



**Fig. 4 : Variation du taux de salinité des lagunes méditerranéennes**

Relevés mensuels du taux de salinité de sept lagunes méditerranéennes de 2005 à 2013. Le climat, l'influence des marées faibles en Méditerranée et les saisons induisent d'importantes variations de salinité. Les taux les plus faibles de salinité ont été relevés en hiver aux mois de février et mars et les taux les plus élevés en été au mois d'août. Source : Ifremer, 2013 Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon.

### 3. Tolérance à la salinité chez les téléostéens

Selon leur tolérance à la salinité, les poissons téléostéens sont considérés comme sténohalins ou euryhalins (Gilles et al., 2006). L'**euryhalinité** peut se définir comme la capacité, pour des organismes aquatiques, à tolérer une grande variation de salinité sans compromettre les processus vitaux, par opposition à la **sténohalinité** (Boutet et al., 2006). Cette capacité de survivre à des modifications de salinités allant souvent de l'eau douce (douce ou dure) à l'eau de mer, voire à l'eau hypersalée est associée à une large variété d'habitats. Ce trait est répandu parmi les téléostéens et a évolué à plusieurs reprises (Kültz, 2015; Schultz et McCormick, 2012). C'est peut-être l'une des raisons pour lesquelles les téléostéens sont distribués dans presque tous les habitats aquatiques. L'euryhalinité représente un avantage évolutif favorisant l'expansion et le rayonnement adaptatif des téléostéens dans un contexte environnemental où la salinité peut être changeante (Kültz, 2015).

Les espèces euryhalines, telles que le tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) (Hwang et al., 1989), le choquemort (*Fundulus heteroclitus*) (Scott et al., 2004) et le loup (Barnabé, 1989), ont la capacité de supporter une gamme étendue de salinités et donc d'occuper les milieux lagunaires, estuariens et côtiers caractérisés par une grande variabilité de la salinité. Il a été estimé que 95 % des espèces de téléostéens sont sténohalines et vivent exclusivement en eau douce ou en eau de mer. Les 5 % restantes sont euryhalines et ont développé des mécanismes physiologiques leur permettant de compenser le stress osmotique induit par les fluctuations environnementales de la salinité. Ces mécanismes intègrent les capacités de détecter et de quantifier ces fluctuations, et d'activer les

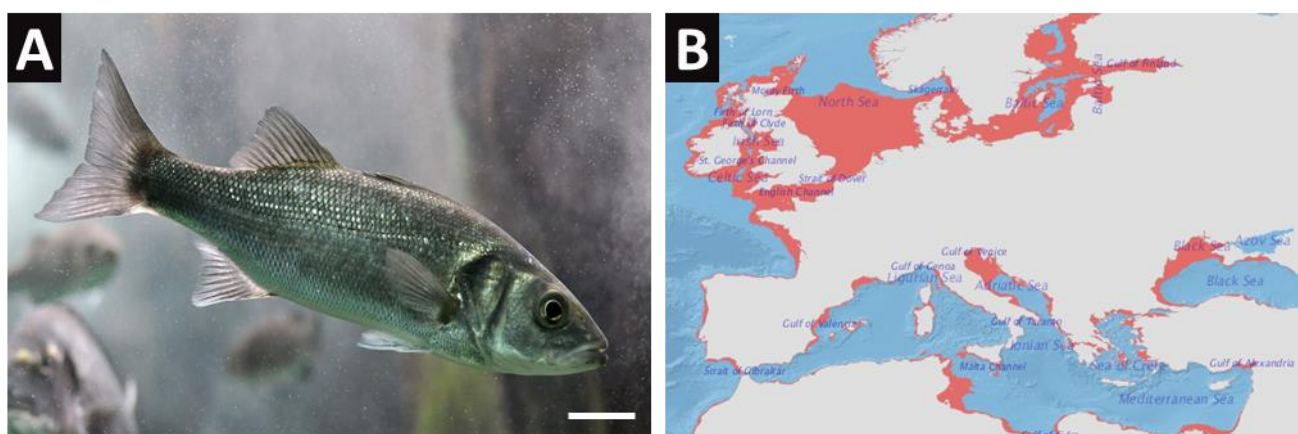
réponses compensatoires adaptées (Fiol et Kültz, 2007; McCormick et al., 2013) notamment au niveau des branchies, intestin et rein (McCormick et Bradshaw, 2006).

Les téléostéens sténohalins (par exemple, le cyprin doré (*Carassius auratus*) où plus communément le poisson rouge) présentent une tolérance faible aux changements de salinité et sont limités à des habitats de salinité stable, soit l'eau douce soit l'eau de mer, car ils ne possèdent pas les mécanismes nécessaires pour en supporter les variations. Une autre catégorie est représentée par les espèces amphihalines qui sont des espèces migratrices qui tolèrent bien les changements de salinité mais uniquement à certains stades de développement précis. Leur cycle biologique alterne des migrations entre l'eau de mer et l'eau douce, en fonction de leur stade de développement. Les espèces catadromes, comme l'anguille (*Anguilla anguilla*), vivent en eau douce et migrent en mer pour se reproduire. Les espèces anadromes, comme le saumon (*Salmo salar*), vivent en eau de mer et remontent les cours d'eau douce pour se reproduire.

Dans ce travail de recherche, l'**acclimatation à la salinité** sera étudiée car ce facteur est considéré comme l'une des caractéristiques physiques les plus importantes du milieu aquatique qui régit la répartition des espèces, favorise la spéciation et est à la base de nombreux modèles d'évolution chez les poissons (Gibson et al., 2002; Kozak et al., 2014; Strydom, 2015; Wedderburn et al., 2016).

#### 4. Le loup européen, comme modèle biologique

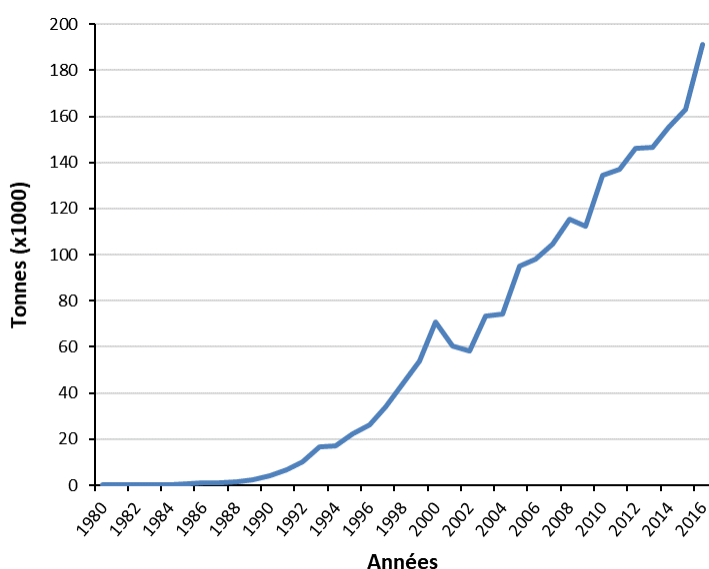
Le **loup** *Dicentrarchus labrax* (Fig. 5A) est un téléostéen marin de la famille des Moronidés considéré comme fortement **euryhalin** et eurytherme. Il tolère des salinités allant de 5 à 60 ‰ (Eroldoğan et Kumlu, 2002; Jensen et al., 1998) et supporte des températures allant de 2 à 32 °C (Barnabé, 1989; Conides et Glamuzina, 2001), ce qui lui permet de coloniser une grande diversité d'habitats. Son aire de distribution géographique inclut l'océan Atlantique Nord-Est, du Maroc à l'Ecosse et à la Norvège, la mer Noire et la mer Méditerranée (Fig. 5B) (Pickett et Pawson, 1994). On retrouve le loup dans une grande variété d'habitats tels que la haute mer (jusqu'à une profondeur de 100 mètres), les rives rocheuses, les lagunes côtières, les estuaires et les parties inférieures de certaines rivières (Kelley et Farm, 1988).



**Fig. 5 : *Dicentrarchus labrax* et son aire de distribution géographique**

*Dicentrarchus labrax* (A), également appelé loup en Méditerranée et bar dans l'océan Atlantique, vit dans les eaux côtières jusqu'à une profondeur d'environ 100 m, mais est plus courant dans les eaux peu profondes, sur divers types de fonds ; entrant souvent dans les estuaires et parfois dans les rivières ascendantes. Sources : (A) [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dicentrarchus\\_labrax01.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dicentrarchus_labrax01.jpg) Echelle 2 cm, (B) <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en> FAO 2019

Le nom vernaculaire de *Dicentrarchus labrax* varie en fonction de la localisation. *D. labrax* est appelé « loup » en mer Méditerranée et « bar » dans l’océan Atlantique. Cette étude porte sur des individus issus de géniteurs sauvages provenant de l’ouest de la mer Méditerranée : le terme loup fera référence à l’espèce *D. labrax*, « European sea bass » en anglais. Le loup est un poisson marin économiquement important en Europe. Il est réputé pour la pêche de capture et de loisir, mais est surtout une espèce d’aquaculture avec une production de 191 003 tonnes en 2016 (Fig. 6). C’est la première espèce marine ne faisant pas partie des salmonidés qui a été cultivée commercialement (Vandeputte et al., 2019). La structure génétique des populations de loup suggère qu’il existe des lignées génétiquement distinctes en Atlantique et en Méditerranée séparées par le détroit de Gibraltar (Bahri-Sfar et al., 2000; García De León et al., 1997; Naciri, 1999). Les populations du bassin méditerranéen sont différenciées en un groupe oriental et un groupe occidental, séparés le long du détroit Siculo-Tunisien (Souche et al., 2015).

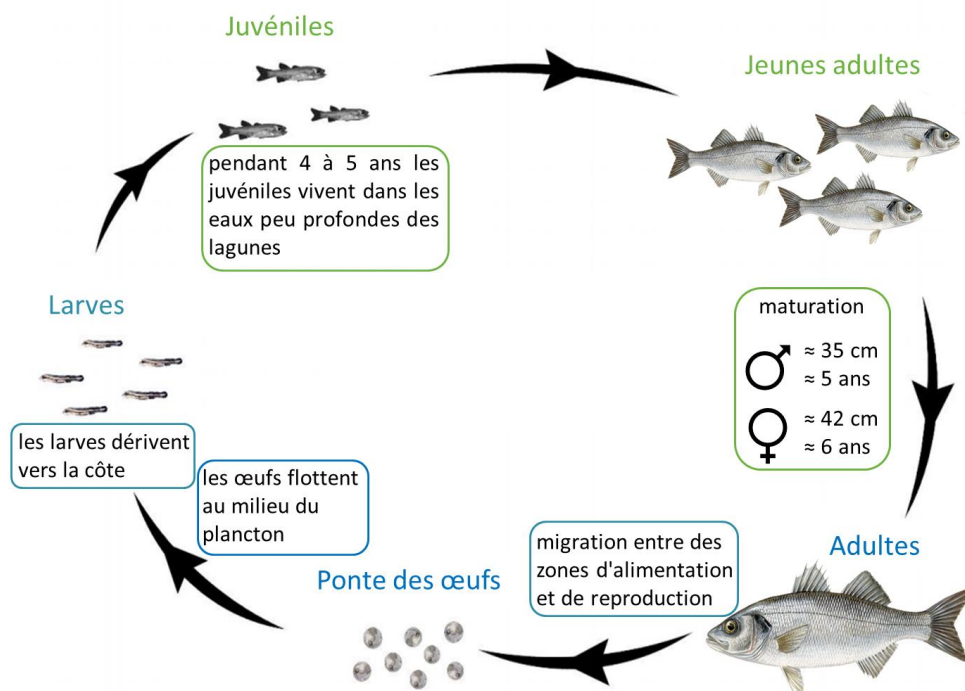


**Fig. 6 : Production mondiale de *Dicentrarchus labrax* en aquaculture**

Les premiers essais d’élevage larvaire du loup ont débuté en France et en Italie dans les années 1970 et la technique d’élevage utilisée actuellement dans la plupart des pays de la Méditerranée a été mise au point durant les années 1980, ce qui explique l’augmentation exponentielle de la production depuis. La Grèce, la Turquie, l’Italie, l’Espagne, la Croatie et l’Egypte sont aujourd’hui les grands pays producteurs. Source <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en> FAO 2019.

Le cycle biologique du loup commence en mer, la ponte des œufs à lieu à quelques milles des zones côtières entre décembre et mars en Méditerranée (Fig. 7). Après l’éclosion, les larves dérivent passivement avec les courants le long des côtes, vers des milieux côtiers caractérisés par des variations plus ou moins importantes de la salinité (Sabriye et al., 1988). A partir de l’ouverture de la bouche, leur tolérance aux variations de la salinité augmente progressivement (Varsamos et al., 2001). Bien que la salinité soit très variable dans ces zones, la nourriture abondante favorise la croissance rapide et permet de réduire la période de vulnérabilité face aux prédateurs (Alderdice, 1988). Environ 60 jours après l’éclosion, du printemps à l’automne, les larves se métamorphosent en juvéniles et peuvent migrer activement vers les estuaires et les lagunes, parfois même jusqu’aux fleuves (Kelley et Farm, 1988). En automne/hiver, lorsque la température de l’eau des lagunes et estuaires diminue, les loups retournent en mer pour des périodes plus ou moins longues (Pickett et Pawson, 1994).





**Fig. 7 : Illustration du cycle de vie du loup**

Les adultes se retrouvent en pleine mer pour la reproduction en hiver (décembre à mars). Après éclosion les larves dérivent avec les courants le long des côtes. Du printemps à l'automne, les larves se métamorphosent en juvéniles qui migrent vers les estuaires et les lagunes, parfois même jusqu'aux fleuves. En hiver, les adultes retournent en mer pour la reproduction et complètent ainsi leur cycle biologique. Modifié d'après Carroll 2014.

Des différences ont été observées concernant le comportement migratoire de certains juvéniles en mer Méditerranée. Tandis que certains migrent vers les lagunes et parfois remontent les fleuves jusqu'à être exposés à l'eau douce (le Rhône et le Lez par exemple), d'autres en revanche n'investissent pas ces zones de salinité inférieure et variable, et restent en mer pendant la période estivale (Lemaire et al. 2000, Bourgeat, comm.pers). Des travaux antérieurs ont démontré une différenciation génétique significative entre les loups des lagunes et ceux vivant en pleine mer (Allegrucci et al., 1997, 1995; Lemaire et al., 2000). Ces résultats ont suggéré une possible base génétique liée à l'utilisation différentielle de l'habitat. En effet, les loups des lagunes se sont révélés génétiquement différenciés des individus évoluant le long des côtes méditerranéennes mais ces résultats restent à confirmer par des technologies plus performantes (séquençage de nouvelle génération, NGS : New Generation Sequencing). Plusieurs études sur d'autres espèces de poissons marins, côtiers et euryhalins, tels que le mullet cabot (*Mugil cephalus*) (Blel et al., 2010), la daurade royale (*Sparus aurata*) (Chaoui et al., 2012), et le gobie des sables (*Pomatoschistus minutus*) (González-Wangüemert et Vergara-Chen, 2014), ont rapporté des observations similaires.

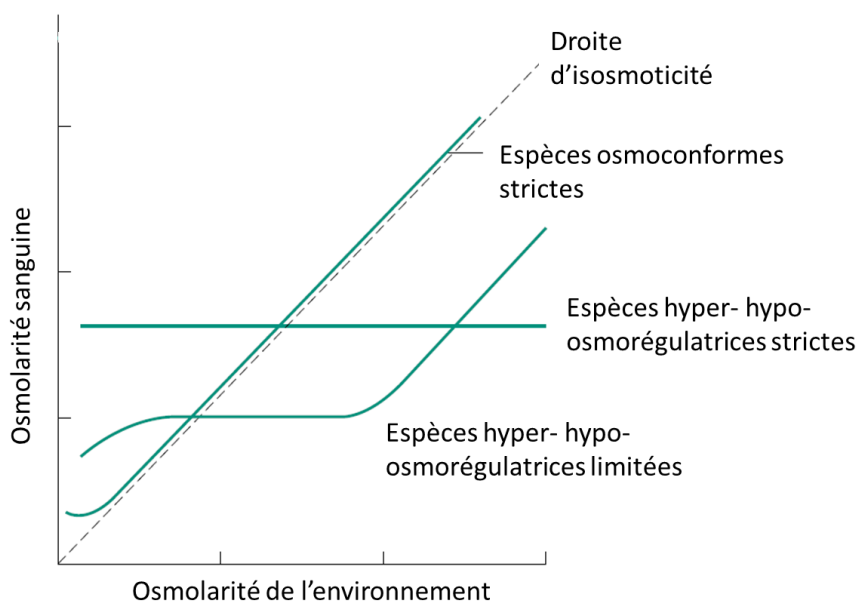
L'espèce *Dicentrarchus labrax* est étudiée depuis de nombreuses années autant pour son écologie que pour sa physiologie car il s'agit d'une espèce d'intérêt commercial et aquacole. La disponibilité d'un génome de référence a permis le développement de nouvelles ressources génomiques (Vandeputte et al., 2019). La distribution et le cycle de vie du loup englobent des habitats contrastés sur le plan environnemental. Suite à l'identification de diverses stratégies de cycle de vie, le loup constitue un bon modèle pour étudier les mécanismes d'acclimatation lors des changements de salinité. De plus, ses capacités euryhaline et eurytherme, sa large distribution et son importance commerciale font de lui un très bon candidat pour comprendre comment les individus et les populations interagissent avec leur environnement.

## 5. Osmorégulation

L'acclimatation à la salinité est un processus complexe résultant d'un ensemble de mécanismes anatomiques et physiologiques impliquant des **régulations ioniques et hydriques** au niveau de sites spécialisés appelées **organes osmorégulateurs ou effecteurs** (Marshall et Grosell, 2006). L'équilibre interne est maintenu à des niveaux « basaux » dans le cas de l'**homéostasie** ou à des niveaux variables afin de maintenir sa stabilité dans le cas de l'**allostasie**. McEwen et Wingfield (2003) ont défini l'allostasie comme « l'instauration de la stabilité au travers du changement » permettant de supporter l'homéostasie, c'est-à-dire l'équilibre interne de l'individu (McEwen et Wingfield, 2003).

### a. Les différents types d'osmorégulation

Lorsqu'un individu est confronté à des changements de salinité dans son environnement, plusieurs réponses sont possibles, une réponse comportementale avec l'évitement, ou des réponses physiologiques avec la conformation ou la régulation. Chez les espèces aquatiques, on distingue les espèces iso-osmotiques ou osmoconformes (généralement des invertébrés), **hypo-osmorégulatrices** et **hyper-osmorégulatrices** (certains invertébrés dont des crustacés, et chez les vertébrés la plupart des téléostéens). Les espèces osmoconformes ont une osmolalité interne proche de l'osmolalité du milieu environnant. Pour ces espèces, les mécanismes d'osmorégulation sont généralement assez limités. Les espèces qui régulent ont une osmolalité interne différente de celle du milieu environnant (Fig. 8), soit supérieure (cas de l'hyper-osmorégulation en eau dessalée) ou inférieure (cas de l'hypo-osmorégulation en eau salée).



**Fig. 8 : Stratégies d'osmorégulation en fonction de l'osmolarité du milieu extérieur**

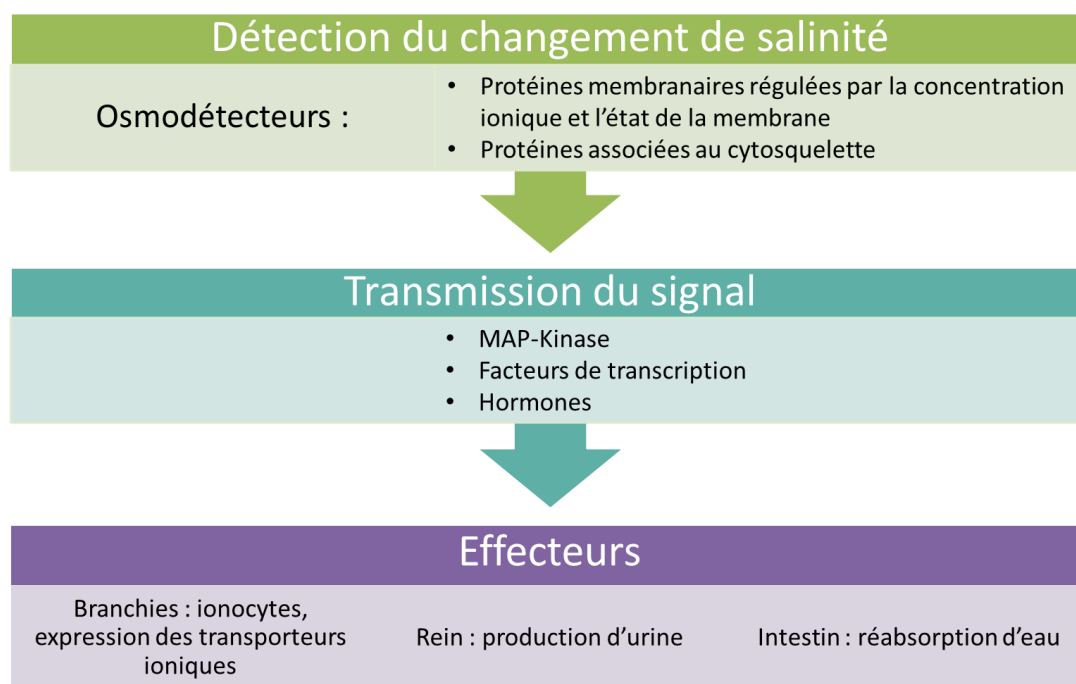
Modifié d'après Willmer et al. (2009).

Les espèces osmorégulatrices regroupent essentiellement tous les poissons téléostéens (actinopterygiens). Les téléostéens adultes maintiennent leur osmolalité sanguine entre 280-360 mOsm.kg<sup>-1</sup> en fonction de leur origine (Nordlie, 2009; Varsamos et al., 2005). Dans des salinités de 15 ‰ proche de la valeur d'iso-osmoticité (Fig. 8), les mouvements passifs d'ions sont faibles et l'énergie nécessaire à l'osmorégulation est relativement réduite (Varsamos et al., 2005). Dans le cas d'une salinité du milieu extérieur supérieure à l'osmolalité sanguine (c'est le cas en eau de mer), les

téléostéens sont capables d'hypo-osmoréguler en maintenant leur osmolalité interne inférieure à celle du milieu environnant (Fig. 11A). Dans le cas d'une salinité du milieu environnant inférieure à l'osmolalité sanguine, les téléostéens hyper-osmorégulent en maintenant leur osmolalité interne supérieure à celle du milieu environnant (Fig. 11B).

### b. A l'échelle de l'organisme : mécanismes d'hypo- et d'hyper-osmorégulation

Dans le cas des poissons euryhalins confrontés à un changement brusque de la salinité, la capacité de percevoir les modifications de leur environnement est indispensable pour initier les processus appropriés de régulation en fonction du milieu extérieur (Bossus et al., 2011; Fiol et Kültz, 2007). Cette capacité est définie comme l'**osmodétection** (Fig. 9). Il s'agit de la première étape de détection du changement de salinité aboutissant à la mise en place des mécanismes d'osmorégulation au niveau des **effecteurs osmotiques** (branchies, intestin et rein). L'osmodétection regroupe les mécanismes sensoriels qui permettent la perception des variations de salinité de l'environnement ou du sang grâce à la présence d'osmodétecteurs qui peuvent être présents dans différents organes (Kültz, 2012a). Ces osmodétecteurs déclenchent un réseau complexe de transduction du signal vers les effecteurs osmotiques permettant le maintien de l'homéostasie interne et de l'intégrité des cellules par la régulation du volume cellulaire.



**Fig. 9 : Osmodétection chez les poissons**

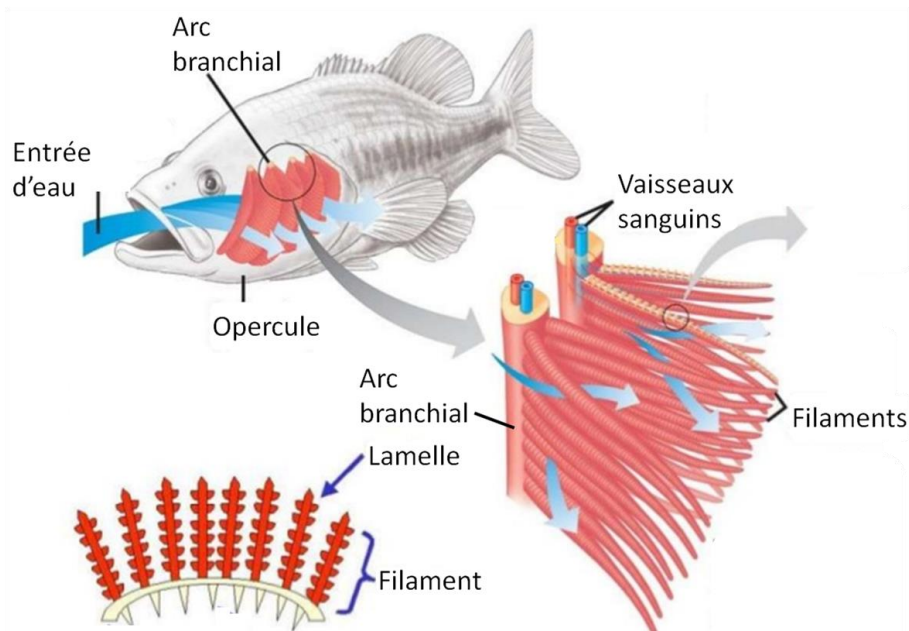
Plusieurs osmodétecteurs reconnaissent les changements de salinité et activent un réseau de signalisation, qui à son tour amplifie et régule les mécanismes effecteurs responsables de l'acclimatation suite aux variations de salinité environnementale. Modifié d'après Fiol et Kültz (2007).

Dans ce mémoire l'attention sera portée sur les **effecteurs** et exclusivement au niveau des **branchies**. En analysant des effets à très court terme, nous allons aussi étudier des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans l'osmodétection.

### i. Les effecteurs

Les processus impliqués dans l'**osmorégulation** ne concernent qu'un nombre limité de tissus et d'organes. Le maintien de la composition ionique et de la pression osmotique des fluides extracellulaires est assuré grâce à une régulation hydrominérale réalisée au niveau de plusieurs **sites osmorégulateurs** : le tégument chez les jeunes stades, le rein, le tractus digestif et notamment l'intestin, particulièrement impliqué en eau de mer, et la **branchie**, principal organe osmorégulateur, qui joue un rôle essentiel en eau douce comme en eau de mer (Evans, 2008; Marshall et Grosell, 2006). Le rôle de ces différents sites dans les processus d'osmorégulation dépend du stade de développement (Varsamos et al., 2005) et des facteurs physico-chimiques du milieu extérieur dans lequel les poissons évoluent. Le tégument des larves (dépourvues de branchies) constitue le site principal des mouvements d'eau par osmose et d'ions par diffusion, qui sont plus ou moins importants selon la perméabilité de celui-ci. Une fois la mise en place des branchies et la différenciation de l'intestin et du rein achevées, le tégument change de rôle et fait office de barrière protectrice grâce à un épaissement et à la mise en place d'écaillés associées à du mucus (Baldisserotto, 2003; Shephard, 1994).

Les **branchies** sont considérées comme le **site majeur de la régulation ionique** chez les téléostéens euryhalins. Selon les espèces, elles sont capables, grâce à leur plasticité, de modifier leur structure et la fonction de leur épithélium pour soit **absorber**, soit **sécréter des ions** en fonction de la salinité du milieu extérieur. En fonction de la salinité du milieu, les branchies peuvent modifier leur perméabilité aux ions et à l'eau permettant d'optimiser les échanges transépithéliaux. Les branchies assurent le maintien de l'équilibre des ions, particulièrement du  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  du sang, grâce à des transports d'ions actifs. Elles ont également un rôle dans les échanges respiratoires grâce à une grande surface d'échange au niveau de l'épithélium hautement vascularisé (Fig. 10). L'élimination des déchets azotés, l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  et la régulation de la balance acido-basique sont également assurées par les branchies au niveau des **ionocytes** ou cellules transporteuses d'ions (Dymowska et al., 2012; Hwang et al., 2011; Hwang et Lin, 2013).



**Fig. 10 : Structure anatomique des branchies de poissons**

Les poissons possèdent sous chaque opercule quatre branchies. Chaque branchie, soutenue par un arc branchial est constituée de deux rangées de filaments branchiaux. Les filaments portent transversalement de très fines lamelles branchiales fortement irriguées. La présence de ces filaments et lamelles augmente considérablement la surface d'échange avec le milieu extérieur. Modifié d'après <https://www.animalpedia.it/come-respirano-gli-animali-2947.html>



## ii. Hypo-osmorégulation

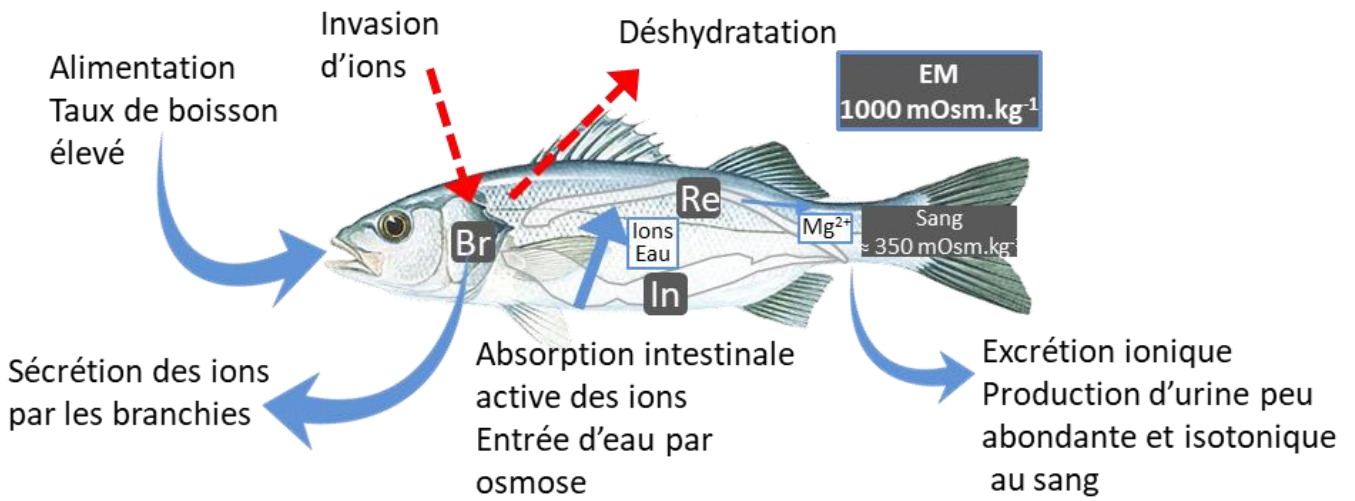
En **eau de mer**, les téléostéens **hypo-osmorégulent** et maintiennent leur osmolalité sanguine inférieure ( $\approx 350 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) à l'eau de mer ( $\approx 1000 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ). Ils doivent faire face à des mouvements passifs d'eau par osmose et d'ions par diffusion aboutissant à une **déshydratation et à une invasion ionique** (Fig. 11A). Les téléostéens marins compensent la perte hydrique par un taux de boisson élevé d'environ 10 à 30 mL.100g<sup>-1</sup> par jour (Gilles et al., 2006). L'ingestion d'eau de mer est suivie d'une absorption ionique, passive au niveau de l'œsophage puis active au niveau de l'intestin. Cette absorption active entraîne une entrée d'eau par osmose, grâce à la présence de canaux protéiques appelées aquaporines, fortement exprimés au niveau intestinal. Les ions absorbés par l'intestin doivent être activement excrétés au niveau branchial pour maintenir l'osmolalité des fluides extracellulaires. L'implication du rein dans l'osmorégulation en eau de mer consiste à absorber de l'eau en perméabilisant les tubules collecteurs induisant la production en faible quantité d'une urine isotonique au sang. Contrairement aux mammifères qui produisent une urine hypertonique au sang, les téléostéens ne sont pas capables de concentrer les ions dans les urines (Gilles et al., 2006). L'excès d'ions doit donc être excrété au niveau des **ionocytes branchiaux** des téléostéens.

## iii. Hyper-osmorégulation

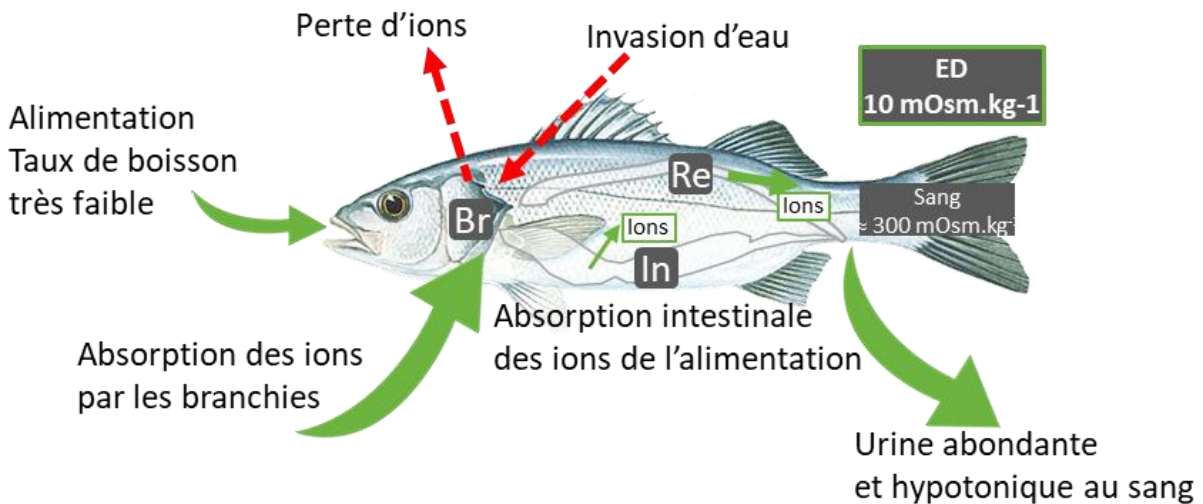
En **eau douce** ou dans des milieux de salinité inférieure à la salinité iso-osmotique ( $< 300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ), les téléostéens **hyper-osmorégulent** en maintenant leur osmolalité sanguine ( $\approx 300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ), supérieure à celle du milieu extérieur. Les poissons doivent faire face à une **perte massive d'ions par diffusion et une invasion d'eau par osmose** (Fig. 11B). La perte ionique est compensée au niveau des branchies, par une absorption active d'ions, effectuée par les **ionocytes** et grâce à un épithélium branchial relativement imperméable permettant d'éviter la perte d'ions par voie paracellulaire. Afin de compenser l'invasion hydrique, les tubes collecteurs du rein s'imperméabilisent à l'eau. Les ions sont activement réabsorbés vers le sang grâce à des transporteurs et canaux membranaires, tandis que l'excès d'eau est excrété grâce au rein via la production d'une urine abondante et hypotonique au sang ( $\approx 230 \text{ mOsm.kg}^{-1}$  chez le loup) (Nebel et al., 2005b). De plus, pour limiter l'invasion d'eau, le taux de boisson des poissons en eau douce est pratiquement nul : environ 1 à 5 mL.100 g<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (Gilles et al., 2006). En eau douce, le tube digestif a un rôle limité dû au faible taux de boisson, bien que certains ions soient absorbés par l'ingestion de nutriments provenant de l'alimentation (Gilles et al., 2006).

**A**




## Hypo-osmorégulation

**B**

## Hyper-osmorégulation



### Légende :

-  Mouvements passifs subis
-  Mécanismes de compensation en EM
-  Mécanismes de compensation en ED

**Fig. 11 : Mécanismes d'hypo et hyper-osmorégulation à l'échelle de l'organisme chez les téléostéens**

**A** : Mécanisme d'hypo-osmorégulation ; en eau de mer les poissons doivent faire face à une déshydratation et à une invasion ionique. Ils maintiennent leur osmolalité sanguine inférieure au milieu environnant. **B** : Mécanisme d'hyper-osmorégulation ; en eau douce les poissons doivent lutter contre une perte massive d'ions et une invasion d'eau. Ils maintiennent leur osmolalité sanguine supérieure à celle du milieu extérieur. Abréviations : Br : branchies, In : intestin, Re : rein, EM : eau de mer et ED : eau douce.

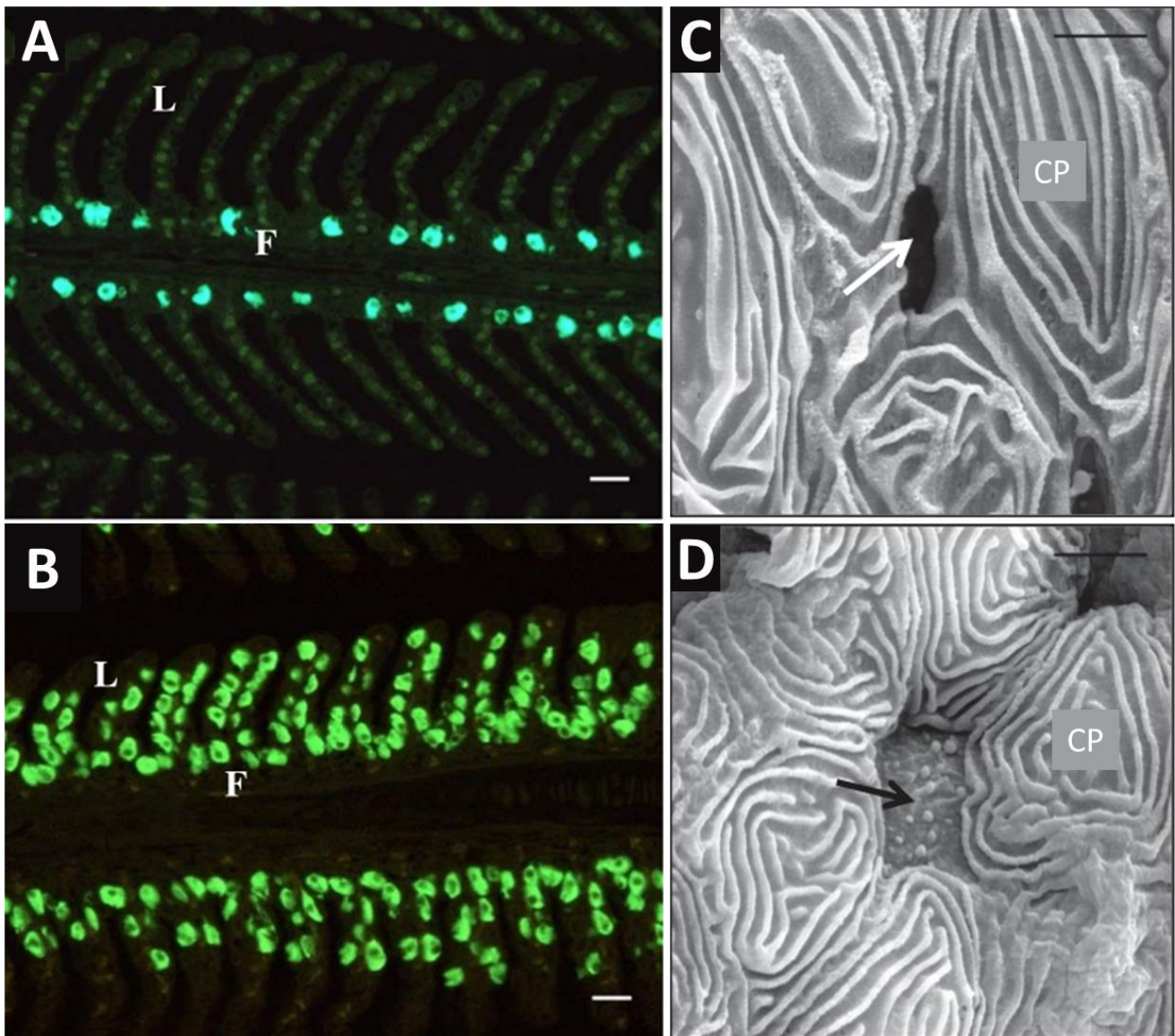
### c. A l'échelle cellulaire : les ionocytes branchiaux

Les branchies étant le site majeur de l'osmorégulation, les mécanismes abordés ci-dessous au niveau cellulaire et moléculaire concernent uniquement les processus ayant lieu dans les branchies des téléostéens.

A l'échelle cellulaire, les branchies possèdent des cellules spécialisées dans le transport ionique actif, appelées **ionocytes** ou cellules riches en mitochondries (CRM) (Keys et Willmer, 1932; Marshall et Bryson, 1998; Rankin et Davenport, 1981). L'épithélium des branchies est composé majoritairement de cellules pavimenteuses ou respiratoires, mais comprend aussi une multitude de types cellulaires, notamment des cellules à mucus, des cellules accessoires, des cellules indifférenciées correspondant à des cellules souches et des ionocytes. Ces derniers sont caractérisés par des replis basolatéraux formant un réseau dense de tubules membranaires, qui augmentent la surface de la membrane en contact avec le sang (Evans et al., 2005; Varsamos et al., 2002). Cette ultrastructure particulière permet l'expression de nombreux **canaux et transporteurs transmembranaires** facilitant les échanges ioniques. De plus, ces cellules possèdent de nombreuses mitochondries (d'où le nom de cellules riches en mitochondries), offrant une source d'énergie à proximité des sites de transport actifs. L'épithélium branchial des téléostéens euryhalins est très différent entre l'eau de mer et l'eau douce et entre les espèces, particulièrement au niveau de son organisation cellulaire. Il a été démontré une modification de la taille, de la densité, de la morphologie et de la fonction des ionocytes en réponse aux changements de salinité de l'environnement (Kaneko et al., 2008). Chez de nombreuses espèces de téléostéens, notamment chez le saumon du Pacifique (*Oncorhynchus keta*) et le tilapia du Mozambique, la taille des ionocytes augmente suite à un transfert de l'eau douce vers l'eau de mer (Uchida et al., 2000, 1996). Cependant, chez d'autres espèces, telles que le choquemort, le poisson lait (*Chanos chanos*) et le loup, la taille et le nombre des ionocytes augmentent en eau douce par rapport à l'eau de mer (Kato et al., 2001; Lin et al., 2006).

#### i. En eau de mer

En eau de mer, les ionocytes sont généralement localisés sur les **filaments** à la base des lamelles branchiales et leur taille est d'environ 10  $\mu\text{m}$  (Varsamos et al., 2002). Ils forment des complexes multicellulaires avec les **cellules accessoires** (Fig. 15). La **membrane apicale** des ionocytes d'eau de mer est **concave** et enfoncée sous la surface des cellules pavimenteuses environnantes. Cette conformation forme une **crypte** créant un microenvironnement du côté apical facilitant les échanges ioniques avec le milieu extérieur (Fig. 12 A et C) (Evans et al., 2005). Des **jonctions lâches** se forment entre les ionocytes et les cellules accessoires, permettant l'excrétion paracellulaire du  $\text{Na}^+$  suivant un gradient électrochimique créé par la pompe à sodium  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) (Evans et al., 2005; Wilson et Laurent, 2002).



**Fig. 12 : Ionocytes branchiaux chez le loup en fonction de la salinité.**

A-B : Immunolocalisation de la NKA dans les filaments branchiaux de loup. A : en eau de mer, les ionocytes sont localisés sur le filament (F) à la base des lamelles (L). B : en eau douce, on note l'augmentation du nombre d'ionocytes sur le filament et leur présence sur les lamelles. Echelle 20  $\mu\text{m}$ . C-D : Région apicale des ionocytes. Microscopie électronique à balayage. C : en eau de mer, les ionocytes communiquent avec le milieu externe à travers une crypte (flèche blanche). D : en eau douce, la zone apicale est plus étendue et de forme convexe avec de nombreuses microvillosités (flèche noire) CP : cellules pavimenteuses. Echelle 2  $\mu\text{m}$ . Source Masroor et al. (2017).

## ii. En eau douce

En eau douce, les ionocytes sont présents à la base du filament et le long des **lamelles** (Fig. 12B). De plus, les ionocytes ne sont plus associés en cryptes avec des cellules accessoires (Fig. 15). Ils sont isolés et intercalés entre les cellules pavimenteuses, formant des **jonctions serrées** permettant de former une barrière relativement imperméable aux ions. La **surface apicale** est plus ou moins **convexe** en fonction du type d'ionocyte et parsemée de **microvillosités** ou excroissances membranaires permettant d'augmenter la surface d'échange (Fig. 12D). Le système tubulaire basolatéral est toujours présent et le nombre de mitochondries peut augmenter chez certaines espèces car la demande en énergie est plus élevée en eau douce (Evans et al., 2005).



## d. A l'échelle moléculaire : les transporteurs ioniques et le contrôle hormonal

### i. Les transporteurs ioniques

Le passage fonctionnel de l'hypo à l'hyper-osmorégulation implique des modifications structurales au niveau de l'épithélium branchial mais également des modifications dans l'expression des transporteurs et canaux ioniques (Hwang et al., 2018; Nebel et al., 2005b). Les ionocytes doivent inverser leurs mouvements ioniques pour passer d'une fonction de **sécrétion** à une fonction d'**absorption**. Les ionocytes branchiaux ont également un rôle important dans le **maintien du pH** du milieu intérieur et contribuent chez les poissons pour 90 % à la **régulation acido-basique**, le reste étant assuré par le rein et l'intestin (Evans et al., 2005; Marshall et Grosell, 2006). A cela s'ajoute également un rôle dans l'**excrétion des déchets azotés** qui est aussi assurée en majeure partie par les ionocytes branchiaux. L'osmorégulation est ainsi couplée à la régulation acido-basique et à l'excrétion azotée grâce un ensemble de transporteurs ioniques et de protéines impliqués dans certaines de ces trois fonctions.

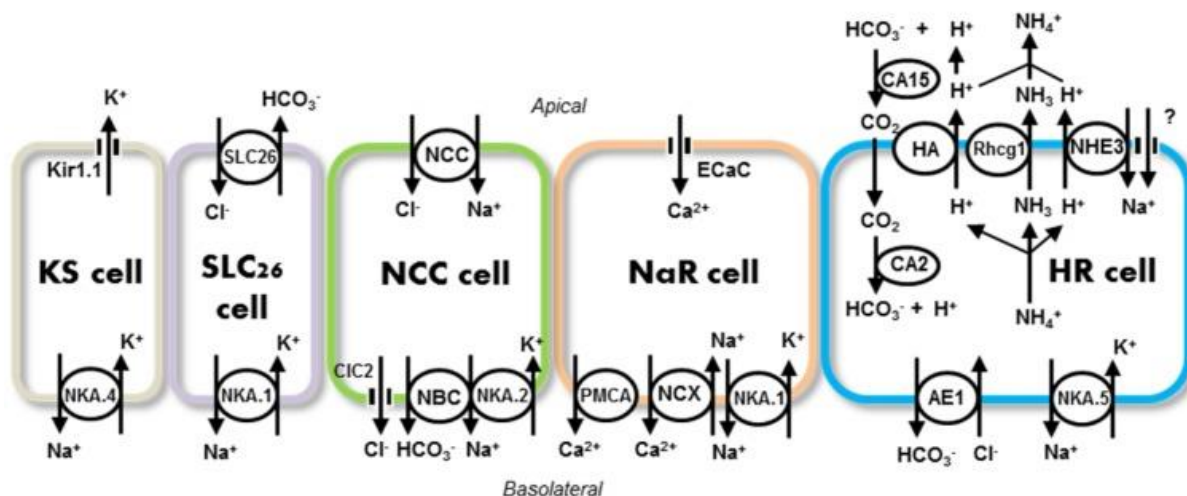
#### 1. En eau de mer

Le mécanisme par lequel les ionocytes de type eau de mer sécrètent du NaCl est étudié depuis plusieurs décennies et le modèle proposé fait l'objet d'un consensus de la part de la communauté scientifique (Fig. 15). Le modèle actuel de sécrétion de NaCl par les ionocytes branchiaux comprend trois transporteurs essentiels : la **NKA** et le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (**NKCC1**) localisés dans la membrane basolatérale et le canal à  $\text{Cl}^-$  **CFTR** (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) localisé dans la membrane apicale. La NKA génère un gradient électrochimique à travers la membrane plasmique par transport de trois ions  $\text{Na}^+$  vers le sang contre l'absorption de deux ions  $\text{K}^+$  vers la cellule. Ce gradient permet l'entrée d'un ion  $\text{Na}^+$  via le NKCC1 basolatéral avec un ion  $\text{K}^+$  et deux ions  $\text{Cl}^-$  dans la cellule. Le  $\text{Cl}^-$  intracellulaire accumulé est ensuite secrété apicalement par le CFTR au niveau de la crypte apicale formée (Evans, 2008; Evans et al., 2005; Hirose et al., 2003; Hwang et Lee, 2007). L'accumulation de charges négatives dans cette crypte attire les charges positives accumulées dans la zone basolatérale des cellules et notamment le  $\text{Na}^+$  qui est ainsi transporté via la voie paracellulaire au niveau des jonctions lâches entre les ionocytes et les cellules accessoires pour être excrété (Hwang et al., 2011).

#### 2. En eau douce

Les mécanismes d'absorption des ions chez les téléostéens en eau douce sont plus complexes et différent selon les espèces (Dymowska et al., 2012; Hwang et al., 2011; Hwang et Lin, 2013). Plusieurs sous-types de ionocytes ont été identifiés parmi les différentes espèces de téléostéens, notamment chez le poisson-zèbre, la truite arc-en-ciel, le medaka (*Oryzias latipes*) et le tilapia du Mozambique (Dymowska et al., 2012; Hsu et al., 2014; Hwang, 2009). Les larves de poisson-zèbre ont été les plus étudiées concernant la caractérisation des différents types d'ionocytes en eau douce. Les modèles, ci-dessous ont été identifiés grâce à des techniques de double et de triple immunomarquage, d'hybridation *in situ* et de perte de fonction par micro injection de morpholino ou d'ARNm dans des embryons, combinés à des mesures de flux ioniques (Dymowska et al., 2012) (Fig. 13). Cinq sous-types d'ionocytes ont été identifiés au niveau du tégument et des branchies. Ils comprennent des cellules riches en  $\text{H}^+$ -ATPase (VHA), appelées « **HR cell** », des ionocytes riches en NKA « **NaR cell** », des ionocytes exprimant le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (NCC) « **NCC cell** », des cellules exprimant l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  SLC26 « **SLC26 cell** » et des ionocytes sécrétant des ions potassium ( $\text{K}^+$ ) via le canal Kir.1 « **KS cell** » (Guh et al., 2015). Ces différents types cellulaires sont impliqués dans des fonctions similaires mais aussi

différentes grâce à des ensembles distincts de transporteurs : absorption de  $\text{Na}^+$ /sécrétion de protons ( $\text{H}^+$ )/excrétion d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) pour les cellules « HR », absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  pour les cellules « NaR », absorption de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  pour les cellules « NCC », absorption de  $\text{Cl}^-$ /excrétion de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) pour les ionocytes « SLC26 » et enfin la sécrétion de  $\text{K}^+$  pour les cellules « KS » (Fig. 13).



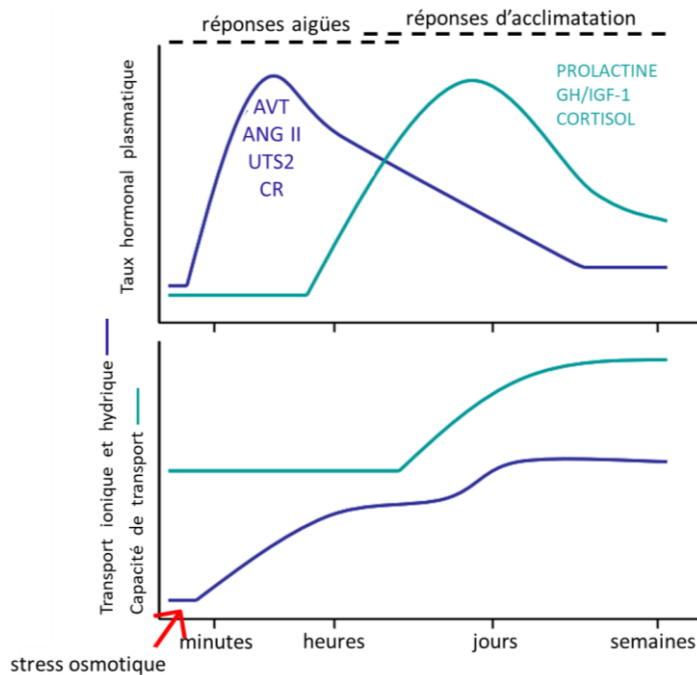
**Fig. 13 : Ionocytes et voies de transport des ions dans les branchies et la peau du poisson-zèbre**

Abréviations : AE1 : Echangeur d'anions  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  1b, CA2 : anhydrase carbonique 2 like a, CA15 : anhydrase carbonique 15, CIC2 : canal 2c à  $\text{Cl}^-$ , ECaC : canal épithélial du  $\text{Ca}^{2+}$ , HA :  $\text{H}^+$ -ATPase également appelée VHA, ROMK : un orthologue du canal  $\text{K}^+$  rénal externe médullaire des mammifères (Kir1.1), NBC : cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  électrogénique 1b, NCC : cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  2b, NCX : échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  1b, NHE3 : échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  3b, NKA.5 :  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sous-unité  $\alpha 1$  (atp1a1a.1.5), PMCA :  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique, Rhcg1 : Glycoprotéine Rhésus transportant du  $\text{NH}_3$ . Les points d'interrogation indiquent des voies de transports non identifiées. Source Guh et al. 2015.

Chacun de ces types cellulaires assure une fonction particulière qui est activée par des voies différentes. Toutes ces cellules expriment la **NKA**, située basolatéralement dans les ionocytes, qui génère un gradient électrochimique facilitant le transport transépithélial d'ions via les transporteurs et canaux ioniques présents dans les membranes basales et apicales. La régulation du pH plasmatique est principalement effectuée par le transport de protons  $\text{H}^+$  et/ou d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et fait donc notamment intervenir les types cellulaires HR, SLC26 et NCC. Concernant le type cellulaire HR, impliqué dans la sécrétion acide, le  $\text{CO}_2$  intracellulaire en présence d'eau est hydrolysé par l'anhydrase carbonique 2 **CA2** en  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{H}^+$ . Les ions  $\text{H}^+$  sont sécrétés en échange d'ions  $\text{Na}^+$  via l'échangeur apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  **NHE** ou via la pompe **VHA** apicale (Fig. 13). Les ions  $\text{HCO}_3^-$  sont absorbés basolatéralement via un échangeur d'anions  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  **AE1**. L'azote sous forme d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) est excrété par ce même type cellulaire (P. A. Wright et Wood, 2009) grâce à un complexe d'échange apical «  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  » constitué de plusieurs transporteurs membranaires comprenant le transporteur Rh **RHCG1**, **VHA** (aussi appelée HA) et **NHE2/3**, formant un groupe de protéines qui agissent ensemble appelé également métabolon (Tresguerres et al., 2006). Le  $\text{NH}_3$  ainsi sécrété via le **RHCG1** se combine à un ion  $\text{H}^+$  sécrété soit via la **VHA** ou l'échangeur **NHE2/3** apical permettant de former du  $\text{NH}_4^+$  et augmente ainsi le pH à proximité des membranes apicales des cellules HR ce qui favorise du point de vue thermodynamique le fonctionnement des **NHE2/3** et favorise ainsi l'absorption de  $\text{Na}^+$ . Les ionocytes exprimant le **NCC** ont également un rôle redondant dans les mécanismes d'absorption du  $\text{Na}^+$ , mais dans le cas d'une exposition à un milieu difficile, tel qu'un pH acide, milieu dans lequel le NHE2/3 ne peut pas fonctionner. L'acidose aiguë, perturbe l'homéostasie des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , ce qui active le **NCC** permettant ainsi de compenser le déséquilibre des deux ions (Kwong et Perry, 2016). Du fait d'un partage de fonctions communes entre les types cellulaires, on parle de redondance fonctionnelle. L'absorption des ions  $\text{Na}^+$  peut par exemple être réalisée par les cellules « HR » en combinaison avec une sécrétion acide et/ou par les cellules « NCC » en combinaison avec une absorption de  $\text{Cl}^-$ .

## ii. Le contrôle hormonal

Il est largement admis que les fonctions osmorégulatrices sont contrôlées par le **système neuroendocrinien** qui assure le lien entre les changements environnementaux et la réponse physiologique. La plupart des modifications des mécanismes de transport des ions sont induites par des facteurs neuroendocriniens ou endocriniens. Ces changements peuvent être divisés en deux catégories : les **réponses régulatrices aiguës** activant des mécanismes de transport existants et les **réponses d'acclimatation** nécessitant la synthèse de nouvelles protéines et de cellules (Fig. 14).



**Fig. 14 : Contrôle hormonal du transport ionique et hydrique**

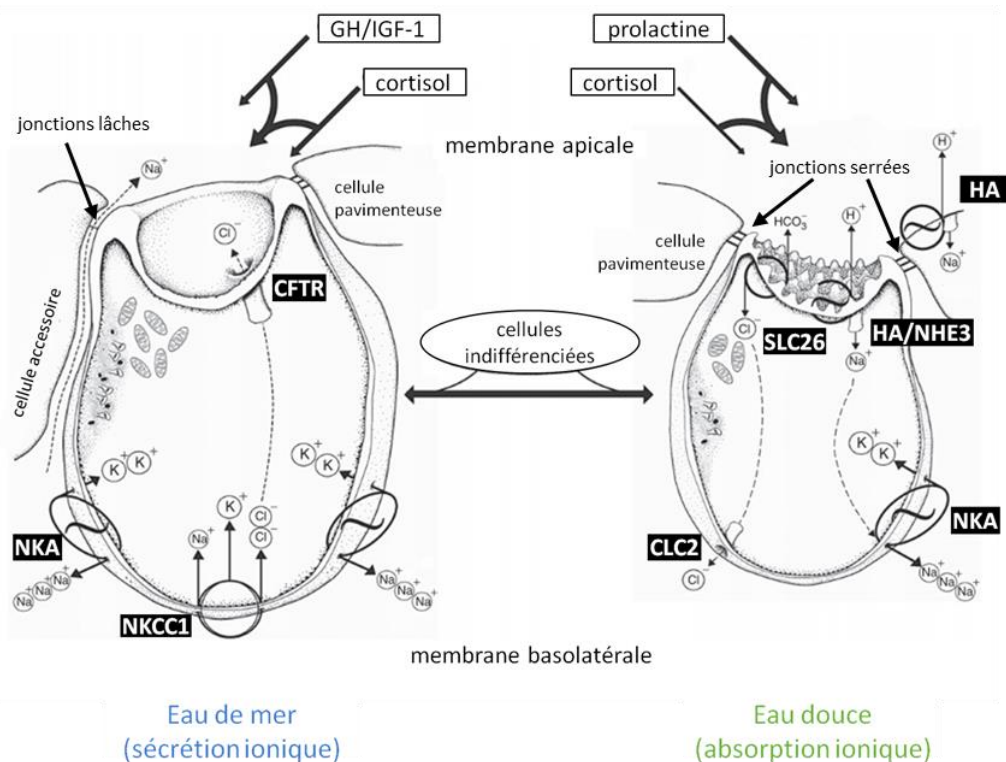
Un stress osmotique entraîne la libération d'hormones à action rapide (en bleu) qui activent les protéines et les cellules existantes pour augmenter le transport des ions et/ou de l'eau durant la phase aiguë (de quelques secondes à plusieurs heures). Le stimulus osmotique et les hormones à action rapide vont à leur tour induire l'augmentation des hormones agissant à long terme (en vert) pour soutenir l'augmentation de la synthèse des protéines, la prolifération cellulaire, la différenciation et la réorganisation des tissus qui permettront d'augmenter la capacité de transport durant la phase d'acclimatation (plusieurs heures à plusieurs jours). Abréviations : AVT : arginine vasotocine, ANG II : angiotensine II, UTS2 : urotensine II, CR : corticostéroïdes, GH : hormone de croissance, IGF-I : facteur de croissance analogue à l'insuline. Modifié d'après McCormick et Bradshaw (2006).

Les réponses aiguës sont rapides (de quelques secondes à quelques heures), et interviennent suite à la détection des variations de salinité (osmodétection), et sont le résultat de l'activation des protéines et des cellules existantes. L'arginine vasotocine, l'angiotensine II, l'urotensine II et les actions non génomiques des corticostéroïdes sont impliquées dans les réponses aiguës du transport des ions et de l'eau. Ces réponses induisent la modification de la circulation sanguine vers les organes osmorégulateurs, l'insertion de canaux ou transporteurs dans les membranes via des processus d'exocytose et **l'activation par phosphorylation des canaux ioniques et hydriques, des cotransporteurs et des pompes, existants** (McCormick et Bradshaw, 2006). Les réponses d'acclimatation se produisent durant des heures et des jours et sont le résultat de la **synthèse de nouveaux transporteurs** (heures), de cellules (jours) ou même d'une réorganisation tissulaire (plusieurs jours à plusieurs semaines). L'effet du stress osmotique combiné à la libération des hormones à action rapide induisent l'augmentation de la production des hormones agissant à long terme : la prolactine, le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF1), l'hormone de croissance (GH) et le cortisol. Ces hormones agissent via des récepteurs hormonaux spécifiques, dont la présence et la régulation dans

les effecteurs osmotiques sont la preuve de l'implication de ces hormones dans le maintien de l'équilibre hydrominéral (McCormick, 2011).

La **prolactine** est considérée comme la principale hormone impliquée dans les processus d'**acclimatation en eau douce**. Lors d'une exposition à un milieu de faible salinité, les niveaux de prolactine hypophysaire et plasmatique augmentent, permettant la **régulation de l'équilibre hydrominéral** en diminuant l'absorption d'eau et en augmentant la rétention des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les branchies, l'intestin et le rein (Boutet et al., 2007; Breves et al., 2014a). En se liant sur des récepteurs à prolactine (PRLR) exprimés dans les ionocytes, la prolactine inhibe la formation d'ionocytes de type eau de mer et favorise le développement de certains types d'ionocytes de type eau douce (McCormick, 2011).

L'**axe GH/IGF1** est impliqué dans l'**acclimatation à l'eau de mer**, les trois hormones GH, IGF1 et le cortisol interagissent de manière positive pour favoriser la sécrétion de sels (Sakamoto et McCormick, 2006). Le **cortisol** favorise l'**acclimatation à l'eau de mer** grâce à la différenciation des ionocytes qui sécrètent des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Il serait impliqué dans l'augmentation de l'activité de la NKA (McCormick, 1995), du nombre et de la taille des ionocytes (Sakamoto et al., 2001; Takei et al., 2014), ainsi que dans la régulation du taux de boisson (Varsamos et al., 2005). Bien que la fonction du cortisol dans la régulation des ions ait été principalement attribuée à la régulation des mécanismes de sécrétion des sels, il existe des preuves que le cortisol a également un rôle dans le maintien des protéines de transport qui sont importantes pour l'absorption des ions, dont la NKA (McCormick, 2011).



**Fig. 15 : Morphologie, mécanismes de transport et contrôle hormonal des ionocytes branchiaux**

Schémas d'ionocytes branchiaux : en eau de mer et en eau douce. Les ionocytes forment un complexe cellulaire avec les cellules accessoires et les cellules pavimenteuses. Les ionocytes sont en contact avec les milieux externes et internes par leur membrane apicale et basolatérale. Notez la présence des jonctions lâches en eau de mer et de jonctions serrées en eau douce. L'hormone de croissance et le cortisol peuvent individuellement induire la différenciation cellulaire des ionocytes de type eau de mer. La prolactine favorise le développement des ionocytes d'eau douce. Le cortisol favorise également l'acclimatation à l'eau douce en interagissant avec la prolactine. Modifié d'après McCormick 2011.

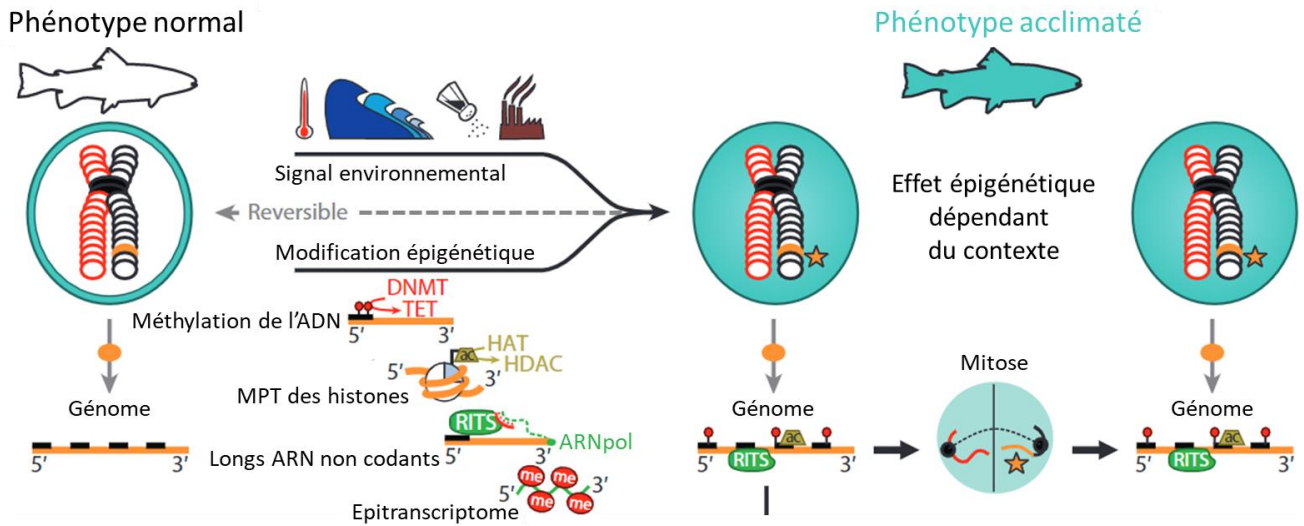


## 6. Rôle de l'épigénétique dans les processus d'acclimatation

Le terme « épigénétique » a été utilisé pour la première fois par Conrad Waddington en 1942 pour décrire comment au cours du développement, **les génotypes peuvent générer des phénotypes alternatifs** (Waddington, 1942). Actuellement, la définition la plus largement acceptée de l'épigénétique est celle proposée par Deans et Maggert (2015), comme étant « **l'étude des phénomènes et des mécanismes qui provoquent des modifications héréditaires de l'expression génique, liées aux chromosomes, qui ne dépendent pas des modifications de la séquence de l'ADN** ». Dans ce cadre, le mot héréditaire est défini comme impliquant à la fois une transmission méiotique et/ou mitotique, ce qui implique que les mécanismes épigénétiques ne se limitent pas à des processus transmis d'une génération à l'autre mais doivent au moins être hérités au travers de divisions cellulaires (Fig. 16) et généralement réversibles. C'est cette définition qui a été retenue dans le cadre de ce projet car nous n'avons pas considéré la transmission de ces mécanismes à une descendance.

De plus en plus d'études indiquent qu'une modification de marqueurs épigénétiques, en particulier la **méthylation de l'ADN**, peut jouer un rôle important dans l'acclimatation et l'adaptation à des environnements différents (Gao et al., 2010; Lira-Medeiros et al., 2010; Morán et al., 2013; Tan, 2010). Les changements environnementaux peuvent représenter un stress pour les organismes aquatiques qui répondent par une diversification des phénotypes (Derome et al., 2006; Mori et al., 2005; Sumner et al., 2006). Des processus à la fois épigénétiques et génétiques pourraient être à l'origine de phénotypes alternatifs (Angers et al., 2010; Gienapp et al., 2008). L'acclimatation peut se définir comme la réponse cellulaire, sur une échelle de temps courte à intermédiaire, à la modification des conditions biotiques et abiotiques (Hochachka et Somero, 2002). Ces réponses incluent souvent la **modulation de l'expression des gènes ou des protéines et les modifications post-traductionnelles**, qui peuvent se produire par le biais de mécanismes épigénétiques.

Parmi les mécanismes épigénétiques, on distingue les **modifications post-traductionnelles des histones** (méthylation, acétylation, phosphorylation, ...), la régulation par les **ARN longs non codants** et la **méthylation de l'ADN**. Les modifications post-traductionnelles des histones induisent des changements de la structure de la chromatine et donc de l'expression des gènes. Le niveau de compaction de la chromatine détermine les gènes qui sont accessibles ou non à l'ARN polymérase pour la transcription. Les ARN longs non codants régulent les processus biologiques de l'ADN comme la transcription (Bernstein, 2005; Mattick, 2001). Ils contrôlent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par des mécanismes épigénétiques (Bao et al., 2013), durant le développement. Des études ont montré l'implication des ARN longs non codants dans la réponse à un stress environnemental (Amaral et al., 2013).



**Fig. 16 : Réponses épigénétiques au changement environnemental**

Les changements environnementaux induisent des modifications épigénétiques, à l'origine de la variation phénotypique. Ces modifications se transmettent par mitose, sont héritées à travers les divisions cellulaires et permettent l'acclimatation des individus par la production de variants phénotypiques. Abréviations : ac : acétylation, DNMT : ADN méthyltransférase, HAT : histone acétyltransférase, HDAC : histone désacétylase, me : méthylation, MPT : modification post-traductionnelle, RITS : « silencing » transcriptionnel induit par l'ARN, ARNpol : ARN polymérase, TET : « ten eleven » enzyme de translocation. Modifié d'après Eirin-Lopez et Putnam (2019).

Actuellement, le mécanisme épigénétique le plus étudié est la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines, qui a été identifiée pour la première fois en 1904 (Wheeler, 1904). La méthylation de l'ADN peut influencer la formation et la maintenance de la chromatine, le développement, et d'autres processus fondamentaux. L'ajout ou le retrait de groupements méthyles (CH<sub>3</sub>) peut **réguler l'activité transcriptionnelle des gènes** en modifiant la structure et la fonction de la chromatine et peut survenir de manière dynamique en réponse aux changements de l'environnement (Boyko et al., 2010; Cooney et al., 2002; Kucharski et al., 2008).

## B. Objectifs

---

Le groupe d'écophysiologistes de l'UMR MARBEC étudie depuis plus de vingt ans les mécanismes de l'osmorégulation chez les téléostéens. Plusieurs thèses de doctorat (Varsamos, 2001 ; Nebel, 2005 ; Giffard-Mena, 2007 ; Bodinier, 2009 ; Ouattara, 2009 ; Sucré, 2010 ; Bossus, 2012 ; Masroor, 2019 ; L'Honoré 2019), ont conduit à la publication d'articles dans des revues scientifiques sur ce sujet. La plupart de ces travaux ont été menés sur le loup, du fait de sa tolérance à la salinité, allant de l'eau douce à l'eau hypersalée.




Basé sur une approche mécanistique, mon projet de recherche s'intègre dans l'étude écophysiologique de l'acclimatation du loup à un choc hypo-osmotique, situation qu'il rencontre en milieu naturel au cours de ses migrations entre mer et lagunes ou estuaires et lors de fortes précipitations dans ces derniers milieux. Le thème central de ce projet concerne l'étude de l'acclimatation à l'eau douce chez une espèce euryhaline, afin d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'hyperosmorégulation, notamment sur les points suivants : quels sont les gènes impliqués dans l'absorption ionique chez le loup ? Quels sont les facteurs qui régulent l'expression de ces gènes ? La salinité constitue-t-elle un marqueur épigénétique à l'échelle d'une génération ? Un changement de salinité affecte-t-il les profils de méthylation de l'ADN chez le loup ?

Cette étude intégrative a été réalisée à diverses échelles :

- Organisme : en abordant la réponse osmoréglatrice ;
- Tissulaire : par l'analyse du site majeur de l'osmorégulation, la branchie ;
- Cellulaire : par une caractérisation des cellules transporteuses d'ions ;
- Moléculaire : par une étude de l'expression des transporteurs ioniques et l'étude de la méthylation de l'ADN ;

Dans ce projet, une attention particulière a été portée aux gènes codant pour des transporteurs ioniques et à leurs implications dans l'acclimatation à la condition extrême, que peut représenter l'eau douce pour des organismes marins. L'étude des extrêmes permet de mieux comprendre les mécanismes physiologiques permettant aux organismes de s'acclimater à leur habitat.

Ainsi en considérant ces différentes échelles, les objectifs de notre projet de recherche ont été les suivants :

-  Caractériser les mécanismes d'absorption ionique dans les branchies du loup ;
-  Evaluer par une approche *in vitro* les effets :
  - d'une baisse d'osmolalité extracellulaire sur l'expression des gènes impliqués dans l'absorption d'ions,
  - de la prolactine à deux concentrations sur l'expression de ces mêmes gènes,
  - de l'interaction entre l'osmolalité extracellulaire et la prolactine,
-  Etudier les changements et les profils de méthylation de l'ADN de loups exposés à une diminution de salinité.

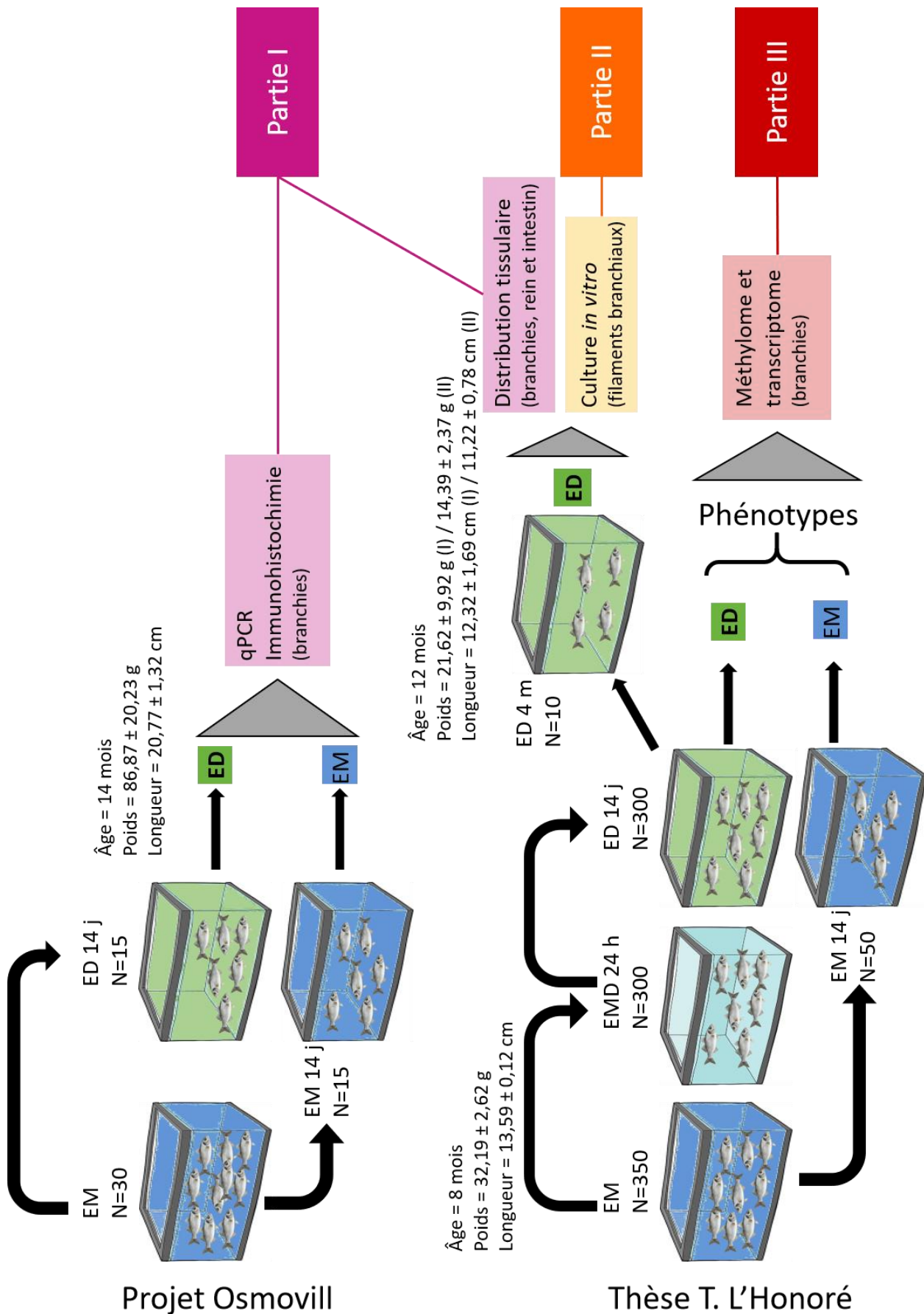
Dans ce mémoire, afin de distinguer les gènes des protéines, les noms des gènes (transcrits et ARNm) sont écrits en minuscule et italique tandis que les protéines apparaissent en majuscule.

## C. Protocole expérimental

---

Les échantillons utilisés dans notre étude sont issus de deux projets de recherche du laboratoire ( Fig. 17), réutilisés pour mon projet de recherche dans le cadre du diplôme de l'EPHE. Tous les poissons proviennent de la station Ifremer de Palavas-les-Flots (Hérault, France). Les échantillons de la partie I proviennent en partie d'un prélèvement réalisé dans le cadre d'une collaboration Franco-Taïwanaise (Projet Osmovill), avec pour objet d'étude l'effet de la salinité et de la température sur l'osmorégulation du loup. Ces échantillons ont servi pour les analyses de qPCR et d'immunohistochimie. Pour les analyses de la distribution par RT-PCR des gènes des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans les différents organes osmorégulateurs, nous avons pu obtenir des loups adultes maintenus dans l'eau douce pendant quatre mois dans le cadre de la thèse de Thibaut L'Honoré. Ces loups ont aussi permis de réaliser les expérimentations *in vitro* sur les filaments branchiaux de la partie II. Enfin, pour la partie III, les échantillons proviennent également d'un prélèvement réalisé dans le cadre de la thèse de Thibaut L'Honoré, ayant pour objectif l'étude de la variabilité intraspécifique de la tolérance à la dessalure chez le loup. La mise en place du protocole expérimental et le suivi des expérimentations schématisés par la Fig. 17 ont été réalisés par Thibaut L'Honoré. Les détails de ce protocole sont détaillés dans les articles de L'Honoré et al. (2019, 2020).

Les expériences ont été menées conformément aux directives de l'Union européenne (directive 86/609) et de la loi française (décret 87/848) réglementant l'expérimentation animale. Le protocole expérimental a été approuvé par la législation française relative au bien-être des animaux d'expérimentation (permis APAFIS n° 9045-201701068219555).



**Fig. 17 : Origine et utilisation des échantillons utilisés dans ce projet de recherche**

Abréviations : EM : eau de mer, ED : eau douce, EMD : eau de mer diluée, j : jours, h : heures, m : mois, qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, WGBS : Whole Genome Bisulfite Sequencing.

# I. Etude des gènes clés impliqués dans l'osmorégulation de loups acclimatés à l'eau douce

---

Les résultats issus de cette première partie ont été valorisés sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Gene* (Blondeau-Bidet et al., 2019) et d'un poster présenté lors du congrès annuel de la SEB (Society of Experimental Biology) à Florence en 2018. Dans ce premier chapitre l'accent sera mis sur les principaux résultats, l'article complet se situe en Annexes page 100.

L'objectif de cette étude est de caractériser les **mécanismes d'absorption du Na<sup>+</sup> au niveau branchial** en prenant un **modèle marin**, le loup. Peu de données sont disponibles sur les transporteurs impliqués dans l'absorption ionique chez cette espèce, et comme nous l'avons vu les modèles d'ionocytes disponibles en eau douce sont essentiellement basés sur le poisson-zèbre, une espèce sténohaline d'eau douce (Hwang et Chou, 2013). La publication du génome du loup (Tine et al., 2014) nous a permis d'identifier et de caractériser des gènes que nous avons repérés dans la bibliographie et qui pourraient être impliqués dans l'absorption ionique chez cette espèce, notamment lors de déplacements du milieu marin vers des habitats dessalés ou d'eau douce.

L'étude des **transporteurs ioniques** a nécessité une première étape de recherche bibliographique, concernant les modèles établis d'absorption ionique afin de lister les gènes impliqués dans les mécanismes d'acclimatation à la salinité. Une vingtaine de gènes présents dans le génome du loup ont été retenus, avec pour certains, jusqu'à cinq paralogues. Pour commencer, l'attention a été portée sur les gènes impliqués dans les mécanismes d'absorption du Na<sup>+</sup>. Ces mécanismes sont étroitement liés à l'**excrétion de protons (H<sup>+</sup>)** et souvent indépendants de l'**absorption de Cl<sup>-</sup>**. L'**excrétion d'azote** est également couplée à l'absorption de Na<sup>+</sup> via un **métabolon** faisant intervenir plusieurs protéines. Ces transports impliquent plusieurs types cellulaires exprimant des transporteurs ioniques, bien caractérisés chez le poisson-zèbre (Fig. 13) (Hwang et al., 2011; Kumai et Perry, 2012). J'ai effectué un premier travail d'analyse de séquences et de phylogénie moléculaire à partir des séquences nucléotidiques identifiées dans le génome du loup. Cette analyse a permis de préciser la position de certains gènes paralogues par rapport à ceux issus d'autres espèces de téléostéens et d'émettre l'hypothèse que ces gènes pouvaient partager des fonctions biologiques communes.

## I.1. Matériels et méthodes

### I.1.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé est schématisé, Fig. 17 page 25.

Deux lots de poissons ont été utilisés dans ces expériences. Pour la PCR quantitative en temps réel (qPCR) et l'immunocytochimie (lot 1), la longueur et le poids moyen des loups étaient de 20,77 cm ± 1,32 et de 86,87 g ± 20,23. Pour l'identification des gènes paralogues dans les principaux tissus osmorégulateurs (lot 2) (branchies, intestin postérieur et rein), la longueur et le poids moyen des loups étaient de 12,32 cm ± 1,70 et de 21,62 g ± 9,92. Les loups ont été maintenus 7 jours dans des cuves de 3500 L contenant de l'eau de mer naturelle de la mer Méditerranée à 38 ‰ à une température de 18 °C avec un pH de 7,78. Les poissons ont ensuite été transférés dans des réservoirs plus petits de 200 L contenant de l'eau du robinet déchlorée ou de l'eau de mer et ont été maintenus dans cette salinité jusqu'à l'échantillonnage. Les poissons ont été maintenus respectivement en eau de mer et en eau douce pendant 2 semaines (moyen terme, lot 1) ou 4 mois (long terme, lot 2) avant l'échantillonnage.



La composition ionique (en mEq.L<sup>-1</sup>) de l'eau douce était : Na<sup>+</sup> (0,12), K<sup>+</sup> (0,04), Ca<sup>2+</sup> (5,70), Mg<sup>2+</sup> (0,29), Cl<sup>-</sup> (0,98), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,06) et SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,61) avec un pH de 8,58. L'eau a été aérée et filtrée mécaniquement et biologiquement (Système Eheim, Lens, Pas-de-Calais, France). La température, la salinité, les niveaux d'oxygène et d'azote ont été vérifiés régulièrement. Un volume correspondant à 10 % de l'eau de chaque réservoir a été changé régulièrement. Les poissons ont été nourris avec des granulés de poissons (aliments Aphymar, Mèze, Hérault, France) jusqu'à 2 jours avant l'échantillonnage. À la fin de l'expérience, les poissons ont été anesthésiés dans une solution de phénoxy-2-éthanol (0,24 ml. L<sup>-1</sup>) (lot 1) ou de benzocaïne (1 ml. L<sup>-1</sup>) (lot 2) avant toute manipulation.

### I.1.2. Analyse phylogénétique

Le module de phylogénie dans le cadre de la formation à l'EPHE, que j'ai validé au mois de décembre 2017 a été directement mis en application dans la première partie de mon projet de recherche. Les compétences acquises m'ont permis de réaliser des reconstructions phylogénétiques des gènes étudiés. Les séquences utilisées dans ces analyses ont été obtenues grâce à l'outil Blast des bases de données NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et Ensembl (<http://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) et suite à des recherches dans les génomes de téléostéens représentatifs : l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), le choquemort et fugu (*Takifugu rubripes*). Des alignements multiples ont été réalisés avec le logiciel MUSCLE V3.8.31 (Edgar, 2004) et les régions ambiguës ont été supprimées avec Gblocks V0.91b (Talavera et Castresana, 2007). Le meilleur modèle d'évolution a été sélectionné en utilisant Modelgenerator V.85 (Keane et al., 2006) en suivant le critère d'information Akaike corrigé. Les arbres phylogénétiques ont été réalisés en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance implémentée dans le programme PhyML (v3.1 / 3.0 aLRT) (Guindon et Gascuel, 2003) avec le modèle de substitution sélectionné. La robustesse de l'hypothèse de phylogénie a été évaluée par le test du rapport des vraisemblances approximatives (aLRT) et par le test du bootstrap avec 1000 répliqués de jeux de données. Les taxons représentant le groupe externe (ou outgroup en anglais) ont été choisis parmi les espèces dont les séquences n'appartiennent pas au groupe interne (ou ingroup en anglais) mais tout en étant aussi proche que possible de celui-ci et dont les séquences des gènes étaient disponibles dans les différentes bases de données.

### I.1.3. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire

L'ARN total a été extrait à partir des échantillons de branchies, intestin et rein en utilisant le réactif Trizol<sup>®</sup> selon les instructions du fabricant. La quantité d'ARN a été évaluée en mesurant le rapport A260/A280 avec un spectrophotomètre Nanodrop<sup>®</sup> (Nanodrop Technology Inc., Wilmington, DE, EUA). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée en utilisant un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, EUA) équipé d'une puce Nano, les RIN (RNA integrity number) étaient supérieurs à 7. Un traitement à la DNase (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies) a été réalisé sur 1 µg d'ARN total puis l'ADN complémentaire (ADNc) a été généré en utilisant des amorces aléatoires (random primers) et la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen<sup>™</sup>) en suivant les directives du fabricant.

### I.1.4. Électrophorèse sur gel dans les tissus osmorégulateurs

La distribution tissulaire des gènes *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1b-like* (*slc9a1β-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) et *nhe3* (*slc9a3*) a été examinée dans les branchies (premier arc de la branchie droite), l'intestin postérieur et le rein. L'ADNc de quatre animaux par salinité (eau de mer et eau douce) a été regroupé en quantités égales. Pour l'amplification par PCR, 1µl d'ADNc dilué (à 1/10 pour *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1b-like* (*slc9a1β-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) et à

1/20 pour *nhe3* (*slc9a3*) a été utilisé comme matrice dans un volume de réaction final de 25  $\mu\text{l}$  contenant 0.2  $\mu\text{M}$  de dNTP, 1.25 unités d'ADN polymérase (GoTaq<sup>®</sup> G2 Flexi, Promega, Madison, EUA), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  et 0.2  $\mu\text{M}$  d'amorce. Les conditions utilisées dans la PCR étaient les suivantes : dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 35 cycles (95°C pendant 30 s, 61°C pendant 45 s et 72°C pendant 1 minute) suivis d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Les produits de PCR résultants ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de GelRed<sup>®</sup> (Biotium, EUA) et examinés sous lumière UV (Gel Doc 1000 system, Bio-Rad, RU).

### I.1.5. PCR quantitative en temps réel

Un robot d'assemblage de réactifs Echo<sup>®</sup>525 (Labcyte Inc., San Jose, CA, EUA) a été utilisé pour distribuer 0.75  $\mu\text{l}$  de mélange DNA Master SYBR-Green I<sup>™</sup> (Roche, Mannheim, Allemagne), 0.037  $\mu\text{l}$  de chaque amorce (à 0.5  $\mu\text{M}$ ), 0.21  $\mu\text{l}$  d'eau ultrapure et 0.5  $\mu\text{l}$  d'ADNc dilué dans une plaque de réaction de 384 puits. Chaque échantillon a été déposé en triplicata. Les conditions de qPCR étaient les suivantes : dénaturation à 95 °C pendant 10 min, suivie de 45 cycles d'amplification (95 °C, 15 s), hybridation (60 °C, 5 s) et élongation (72 °C, 10 s) et une dernière étape à 40 °C pendant 30 secondes. Un programme de courbe de fusion a été réalisé pour contrôler la spécificité d'amplification. De l'eau ultrapure a été utilisée comme contrôle négatif. Les produits d'amplification ont été séquencés par la société Eurofins (Ebersberg, Allemagne) pour vérification. Le niveau d'expression des transcrits a été normalisé en utilisant l'expression du gène *ef1 $\alpha$*  (elongation factor 1 alpha) et *fau* (ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion). Le gène *ef1 $\alpha$*  a déjà été utilisé avec succès chez cette espèce (Blondeau-Bidet et al., 2016) et *fau* a été recommandé pour la normalisation de la qPCR du loup par Mitter et al. (2009). Les niveaux d'expression relative ont été calculés en utilisant la méthode comparative du delta Ct (nombre de cycles seuil) (Pfaffl, 2001). La valeur des Ct des gènes de références n'a pas varié en fonction des conditions de salinité. Les analyses ont été réalisées sur la plateforme de qPCR de l'Université de Montpellier.

### I.1.6. Immunohistochimie

Le premier arc branchial gauche de trois animaux (lot 1) par condition a été fixé pendant 48 heures dans le fixateur de Bouin. Après rinçage dans de l'éthanol à 70 %, les échantillons ont été déshydratés puis inclus dans du Paraplast<sup>®</sup> (Sigma). Des sections transversales (4  $\mu\text{m}$ ) ont été réalisées sur un microtome Leica, recueillies sur des lames porte-objet enduites de poly-L-lysine, séchées à 37 °C et conservées à température ambiante. Les coupes ont été déparaffinées (LMR et butanol), hydratées dans une série descendante de bains d'éthanol (de 100 % à 50 %) et rincées (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM tampon phosphate, pH 7.4). Les lames ont ensuite été immergées dans un tampon de citrate de sodium (Tri-sodium citrate dihydrate dans 0.05 % de Tween 20, pH 6) et placées dans un four à micro-ondes (à 80 % de puissance 2 fois 1 min) pour révéler les sites antigéniques. Les lames ont ensuite été incubées pendant 10 min dans du PBS complété avec du Tween 20 à 0.02 % et du NaCl à 150 mM. Après saturation à température ambiante pendant 20 minutes dans de l'albumine de sérum bovin à 5 % (BSA) dans du PBS, les lames ont été rincées deux fois avec du PBS. Un premier marquage a été réalisé pendant une nuit à 4 °C (NHE3) suivi de trois lavages dans du PBS, puis 2 h à température ambiante (NKA ou T4) dans une chambre humide. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de BSA à 0,5 % dans du PBS : anticorps monoclonal de souris ( $\alpha$ 5, Hybridoma Bank, Université de l'Iowa) dirigé contre la sous-unité  $\alpha$  de la NKA à 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , anticorps monoclonal de souris T4 (Hybridoma Bank, Université de l'Iowa) dirigé contre le NKCC1-2/NCC1-2 (SLC12A1-A2-A3) à 7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  et anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  3b (NHE3b) de truite à 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (fourni par le Pr Junya Hiroi). Des lames témoins sans anticorps primaire ont également été préparées. Après trois



lavages dans du PBS pour éliminer les anticorps non liés, les coupes ont été incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires à température ambiante (Alexa Fluor®488 anti-souris à 10 µg.ml<sup>-1</sup> et Rhodamine anti-lapin à 4 µg.ml<sup>-1</sup>). Après trois lavages, les noyaux ont été colorés avec du 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pendant 2 min, puis les coupes lavées trois fois dans du PBS. Les lames ont été montées avec un milieu de montage anti-blanchiment. Les observations ont été faites avec un microscope confocal Leica TCS SP2 de la plate-forme MRI, à l'Université de Montpellier.

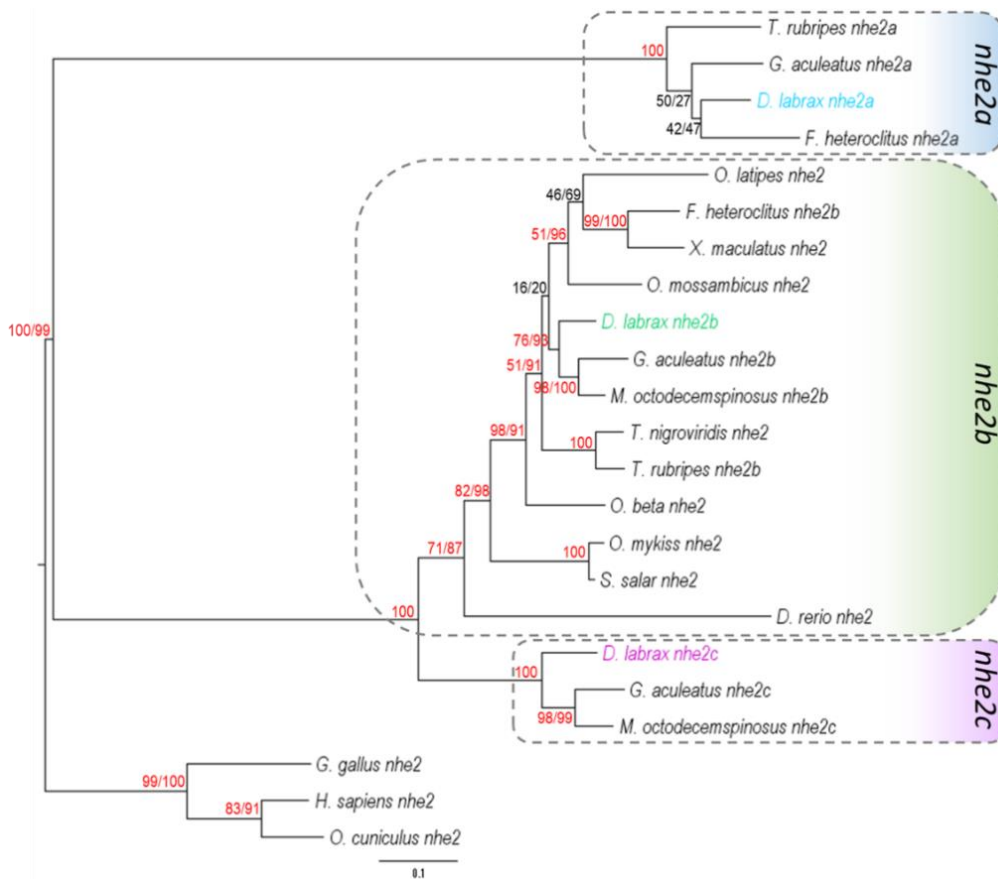
### I.1.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant RStudio version 1.1.383. En raison de la petite taille de l'échantillon, un test U de Mann-Whitney non paramétrique a été utilisé pour les comparaisons des échantillons. Les données sont présentées en tant que moyennes ± l'erreur type et le niveau de signification statistique a été fixé à p < 0,05.

## I.2. Résultats

### I.2.1. Identification, annotation et phylogénie des gènes des échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> chez le loup

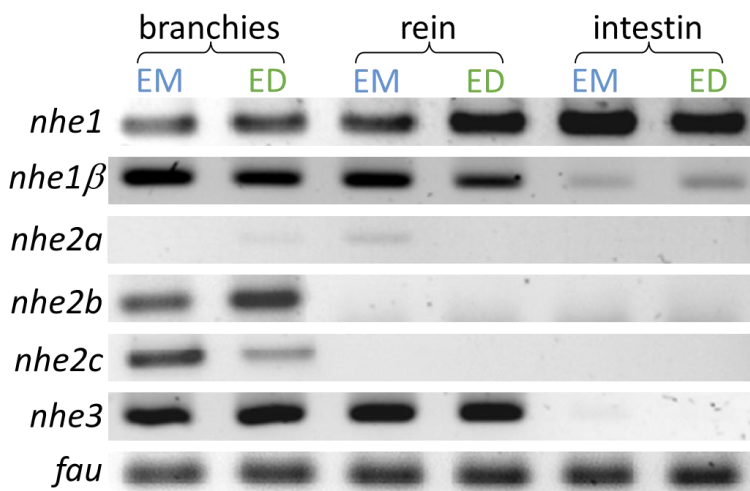
Dans le génome du loup, nous avons constaté que plusieurs gènes paralogues pour les échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (*slc9a*) sont présents, parmi lesquels : *nhe1* (*slc9a1*) et *nhe1-β like* (*slc9a1b*), trois gènes annotés *nhe2* (*slc9a2*) que nous avons appelés *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*) et *nhe2c* (*slc9a2.3*) et un seul *nhe3* (*slc9a3*). L'analyse phylogénétique des gènes annotés *nhe2* a généré un arbre montrant trois clades comprenant les trois sous-types de *nhe2* chez le loup ainsi que ceux d'acanthomorphes et de salmonidés. La recherche dans les génomes des autres espèces de téléostéens a révélé la présence d'un seul gène *nhe2* pour le poisson-crapaud *Opsanus beta* et le medaka, de deux gènes *nhe2a* et *b* chez le choquemort (Edwards et al., 2010) et de trois gènes *nhe2a*, *b* et *c* chez l'épinoche. Les trois sous-types de *nhe2* chez le loup sont apparentés avec les sous-types de *nhe2* des autres espèces (Fig. 18).



**Fig. 18 : Arbre phylogénique de *nhe2* (*slc9a2*)**

Phylogramme des relations de maximum de vraisemblance entre les séquences nucléotidiques *nhe2a*, *nhe2b* et *nhe2c* des acanthomorphes représentatifs et des salmonidés. Les longueurs de branches représentent le degré de divergence, la barre d'échelle indique la distance représentant 0,1 substitution par position. Les chiffres indiqués correspondent aux valeurs des tests de robustesse de l'arbre. Quand deux valeurs sont présentes, la première correspond au pourcentage du test de Bootstrap et la seconde au test aLRT. Une seule valeur signifie que les deux tests ont le même score. Les valeurs correspondant aux nœuds robustes (> à 85%) sont indiquées en rouge.

### I.2.2. Modèles d'expression de l'ARNm des gènes paralogues dans les tissus osmorégulateurs

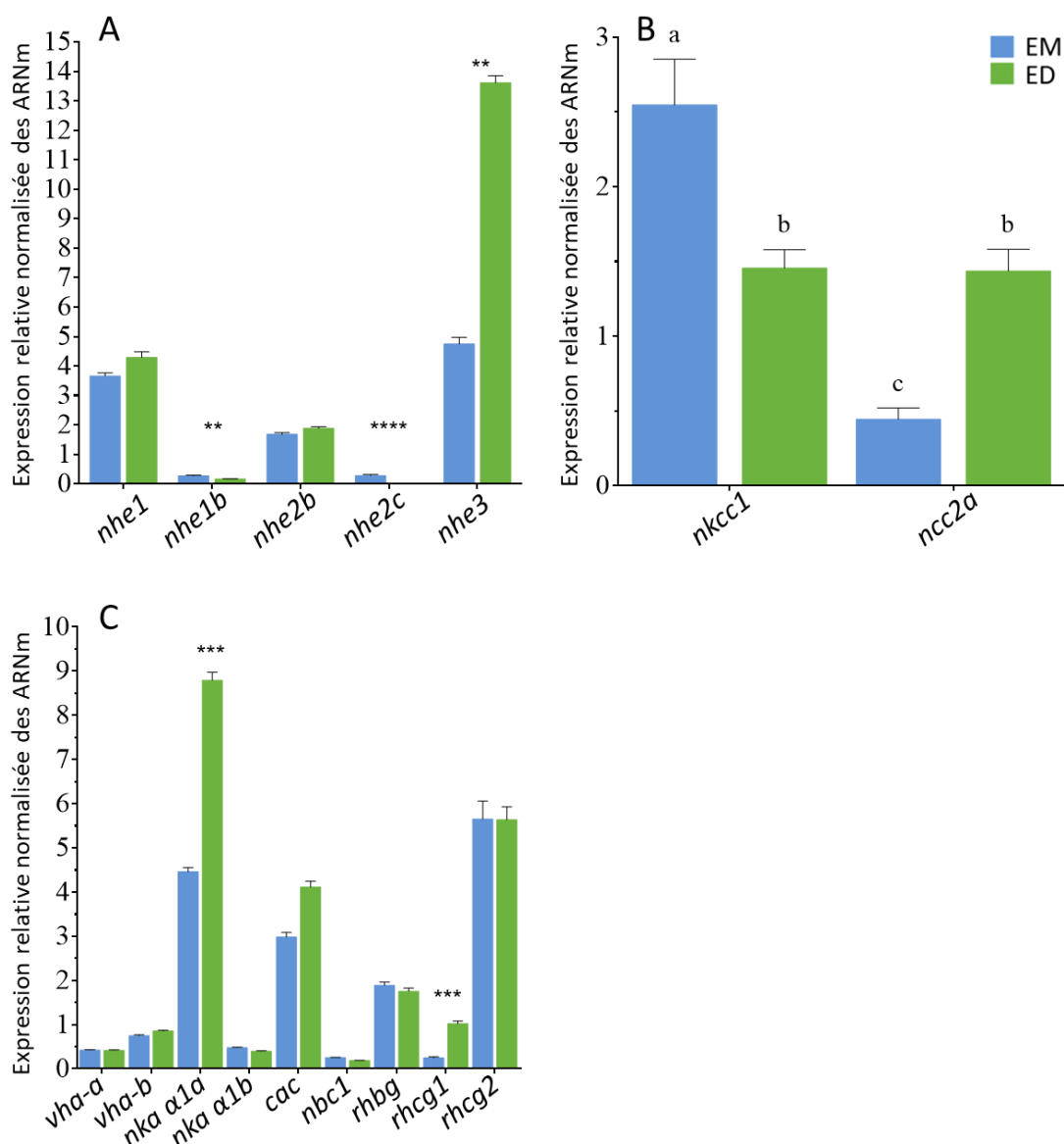


**Fig. 19 : Analyse de la distribution tissulaire des transporteurs ioniques**

Transcription inverse suivi d'une PCR et d'une électrophorèse sur gel d'agarose des gènes *nhe1* (*slc9a1*), *nhe16-like* (*slc9a16-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*), et *nhe3* (*slc9a3*), chez des loups adultes maintenus en eau de mer (en bleu) et acclimatées à l'eau douce (en vert) depuis 4 mois. Abréviations : EM : eau de mer ; ED : eau douce.

Nous avons comparé la distribution tissulaire en eau de mer et en eau douce des paralogues *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1b-like* (*slc9a1b-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*), et *nhe3* (*slc9a3*) dans les branchies, le rein et l'intestin postérieur, avec l'expression du gène *fau* comme contrôle interne (Fig. 19). *Nhe1* (*slc9a1*) est exprimé dans tous les tissus osmorégulateurs analysés, notamment dans l'intestin postérieur et le rein, en eau douce. *Nhe2b* (*slc9a2.2*) et *nhe2c* (*slc9a2.3*) s'expriment spécifiquement dans les branchies dans les deux salinités. *Nhe2a* semble être plus exprimé dans les branchies en eau douce et dans le rein en eau de mer. *Nhe3* (*slc9a3*) est fortement exprimé dans les branchies et le rein aux deux salinités.

### I.2.3. Expression des transcrits



**Fig. 20 : Expression relative des ARNm des transporteurs ioniques**

**A** : *nhe1* (*slc9a1*), de *nhe1b-like* (*slc9a1b-like*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) et *nhe3* (*slc9a3*). **B** : *nkcc1* (*slc12a2*) et *ncc* (*slc12a3*). **C** : *vha-a* (*atp6v1a*), *vha-b* (*atp6v1b2*), *nka α1a* (*atp1a1a*), *nka α1b* (*atp1a1b*), *ca2*, *nbc1* (*slc4a4*) *rhhg*, *rhhg1* et *rhhg2* dans les branchies de loups exposés à l'eau de mer et à l'eau douce. L'expression a été normalisée en fonction de l'expression du facteur d'élongation *ef1a* et du gène de fusion de la protéine S30 analogue à l'ubiquitine et ribosomique *fau*. N = 8. Les données sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  l'erreur type. Pour chaque gène, les astérisques indiquent une différence significative (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001). Abréviations : EM : eau de mer ; ED : eau douce.

Les niveaux d'expression des transcrits ont été quantifiés en eau de mer et en eau douce (Fig. 20).

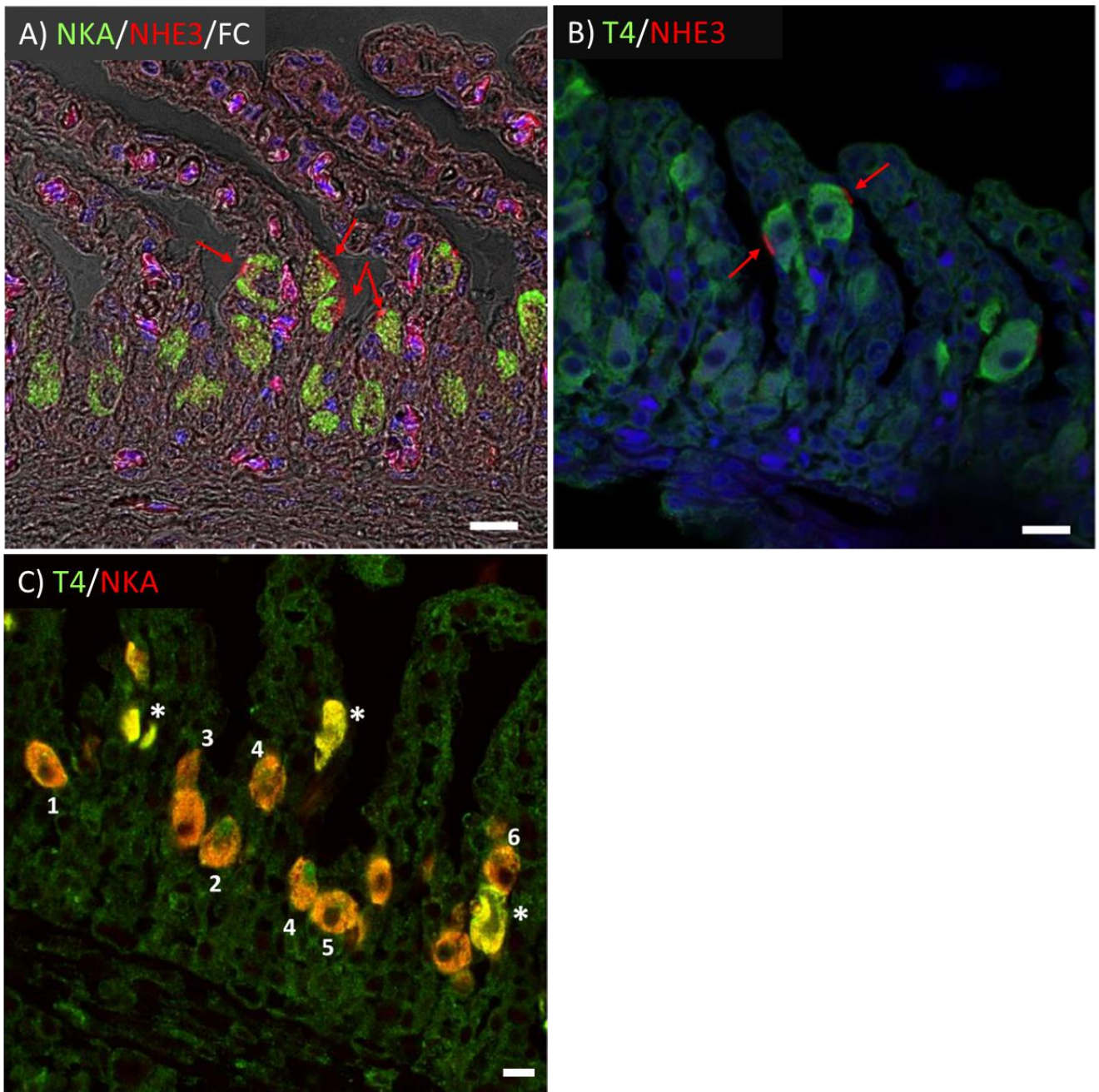
Des différences d'expression significatives entre les salinités ont été observées pour les transcrits *nhe1b-like* (*slc9a1b-like*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) et *nhe3* (*slc9a3*) (Fig. 20A). L'expression de *nhe1b-like* (*slc9a1b-like*) et *nhe2c* (*slc9a2.3*) est significativement plus élevée en eau de mer qu'en eau douce, respectivement de 1,7 fois ( $p < 0.01$ ) et de 28 fois ( $p < 0.001$ ). Inversement, les niveaux d'ARNm de *nhe3* (*slc9a3*) sont 2,8 fois ( $p < 0,01$ ) significativement plus élevés en eau douce qu'en eau de mer. L'expression de *nhe3* (*slc9a3*) est respectivement, 18 et 84 fois plus élevée en eau de mer et en douce ( $p = 0,0458$  et  $p < 0,0001$ ), comparée à l'expression de *nhe1β-like* (*slc9a1b-like*). Comparée aux niveaux d'ARNm de *nhe2c* (*slc9a2.3*), l'expression de *nhe3* est significativement supérieure, de 17 fois en eau de mer ( $p = 0,024$ ) et de 1351 fois en eau douce ( $p < 0,0001$ ).

L'expression relative de *nkcc1* (*slc12a2*) et *ncc2a* (*slc12a3*) a été examinée dans les deux salinités (Fig. 20B). Le niveau d'ARNm de *nkcc1* (*slc12a2*) est significativement plus élevé en eau de mer qu'en eau douce, de 1,7 fois ( $p = 0,001$ ). L'expression de *ncc2a* (*slc12a3*) montre la tendance inverse, avec une expression 3 fois plus importante en eau douce comparée à l'eau de mer ( $p = 0,0003$ ).

L'expression relative de *vha-a* (*atp6v1a*), *vha-b* (*atp6v1b2*), *nka α1a* (*atp1a1a*), *nka α1b* (*atp1a1b*), de l'anhydrase carbonique cytoplasmique 2 (*ca2*), du cotransporteur  $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$  *nbc1* (*slc4a4*), des transporteurs d'ammoniac (*rhbq*, *rhcg1* et *rhcg2*) ont été examinés en eau de mer et en eau douce (Fig. 20C). L'expression du gène du canal à sodium *asic4* a également été quantifiée, mais les résultats étaient en dehors de la plage des valeurs quantifiables ( $\text{Ct} > 34$ ) et n'ont pas pu être interprétés. Le transfert en eau douce induit une expression de *nka α1a* (*atp1a1a*) 2 fois plus élevée qu'en eau de mer ( $p = 0,0006$ ) et 4 fois plus élevée, pour le transporteur d'ammoniac apical *rhcg1* ( $p = 0,0001$ ). L'expression des deux sous-unités *vha a* et *b* (*atp6v1*) est faible et ne varie pas selon la salinité. Fait intéressant, *rhcg2* est fortement exprimé dans les deux salinités et *ca2* semble avoir une expression légèrement mais pas significativement plus élevée en eau douce qu'en eau de mer ( $p = 0,06$ ).

#### 1.2.4. Immunolocalisation des transporteurs

Les techniques d'immunohistochimie par double marquage indirect, ont permis d'identifier les ionocytes coexprimant la NKA et le NHE3 en eau douce (Fig. 21A). NHE3 est localisé dans les membranes apicales des ionocytes (Fig. 21B), situés sur la lamelle. Nous n'avons pas observé de marquage apical de NHE3 en eau de mer mais uniquement dans les ionocytes en eau douce. Les ionocytes exprimant le NHE3 sont également immuno-positifs pour T4 (NKCC1-2/NCC1-2), localisé dans les membranes basolatérales (Fig. 21B). L'anticorps T4 n'est pas spécifique d'une protéine mais reconnaît à la fois le NKCC1, le NCC1 et le NCC2. Or, de précédentes études ont montré que le NKCC1 correspond à la protéine exprimée basolatéralement. Une colocalisation intracellulaire de T4 basolatéral et de NKA est donc observée dans ces cellules au niveau des lamelles (Fig. 21C, indiqué par un \*). Un autre type cellulaire, présente également un marquage de la NKA mais avec un marquage apical du T4 (Fig. 21C, numérotées), vraisemblablement du NCC2, car cette protéine est fortement exprimée en eau douce et que sa localisation apicale a été montrée chez d'autres espèces. Enfin, la présence de cellules exprimant uniquement la NKA, nous a permis de caractériser un troisième type cellulaire n'exprimant ni NHE3, ni NCC (non montré).



**Fig. 21 : Immunolocalisation de la NKA, de NHE3 et de NKCC/NCC**

Double marquage des transporteurs de l'épithélium branchial de loups acclimatés à l'eau douce pendant 2 semaines. **A** : La NKA est marquée en vert et le NHE3 en rouge (flèches) Notez que les ionocytes exprimant NHE3 sont situés sur les lamelles **B** : Les échangeurs NKCC1/NCC (T4) sont marqués en vert et le NHE3 (flèches) en rouge. **A-B** : Les noyaux ont été contre-colorés avec du DAPI (en bleu). **C** : Les échangeurs NKCC1/NCC (T4) sont marqués en vert et la NKA en rouge. Au moins deux sous-types d'ionocytes avec un marquage apical du T4 (numéroté) et basolatéral (\*) sont représentés. BF : champ clair. Echelle : 10  $\mu$ m.



## I.3. Discussion

### I.3.1. NHE3, une protéine clé exprimée dans les ionocytes lamellaires des branchies de loups en eau douce

Un seul paralogue du gène *nhe3* est présent dans le génome du loup ; sa séquence nucléotidique est très proche des séquences *nhe3* du chabousseau à long nez (*Myoxocephalus octodecemspinosus*), de l'épinoche et de la perche (*Anabas testudineus*), 90 %, 88 % et 86 %, respectivement. Comme ces espèces possèdent un seul gène *nhe3*, elles partagent potentiellement une fonction similaire pour la protéine NHE3. Nos résultats montrent que le gène *nhe3* dans les branchies est significativement plus exprimé après un transfert en eau douce et que son expression est beaucoup plus élevée que tous les autres gènes des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  analysés, montrant clairement son rôle majeur dans les branchies du loup, notamment en eau douce. L'immunolocalisation de la protéine NHE3 a montré une localisation apicale dans un sous-ensemble d'ionocytes qui expriment également la protéine NKA, comme observé dans les cellules de type « HR » du poisson-zèbre (Fig. 13) (Guh et al., 2015) et du NKCC1 basolatéralement. Contrairement aux branchies en eau douce, nous n'avons pas détecté de NHE3 dans les ionocytes des branchies en eau de mer mais il est possible que NHE3 soit présent dans les vésicules cytoplasmiques (Takei et Hwang, 2016) ou trop faiblement exprimé, ce qui rendrait l'observation par immunolocalisation plus difficile.

### I.3.2. L'absorption du $\text{Na}^+$ via NHE3, pourrait être couplée à d'autres protéines via un métabolite

Il a été montré que l'absorption de  $\text{Na}^+$  via le NHE3 en eau douce est, pour des raisons de contraintes thermodynamiques, peu probable, sauf si celle-ci est couplée - à une excrétion de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (Parks et al., 2008), et - potentiellement aussi à la VHA, comme c'est le cas chez le medaka, la truite arc-en-ciel et le poisson-zèbre (Shih et al., 2008; T.-H. T. T.-H. Shih et al., 2012; Patricia A. Wright et Wood, 2009). Dans les cellules riches en VHA (HR) du poisson-zèbre, l'eau pauvre en  $\text{Na}^+$  est un déclencheur de la différenciation d'un complexe protéique apical, ou métabolite, impliquant NHE3b, RHCG1 et la pompe VHA apicale (Shih et al., 2008). Chez le loup, si la surexpression de *nhe3* et *rhcg1* en eau douce va dans ce sens, notre étude montre que la *vha* (sous-unités *a* et *b*) n'est pas fortement exprimée et que l'expression n'est pas induite après un transfert en eau douce dans les branchies du loup. Sinha et al. (2015) ont montré que l'activité de la VHA augmente à faible salinité (2,5 ‰) par rapport à l'eau de mer. Il est donc possible que des modifications post-transcriptionnelles activent la VHA dans les branchies en eau douce et qu'associées à une expression plus importante de *rhcg1* et *nhe3*, cela contribue à l'absorption de  $\text{Na}^+$  couplée à une excrétion de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . L'implication ou non de la VHA dans le complexe fonctionnel décrit ci-dessus reste à élucider chez le loup.

### I.3.3. Deux gènes paralogues *nhe2* sont exprimés dans les branchies du loup mais leur rôle dans l'absorption de $\text{Na}^+$ semble mineur

Parmi les autres paralogues *nhe* qui ont été analysés dans cette étude (*nhe1*, *nhe1b-like*, *nhe2a*, *nhe2b* et *nhe2c*), aucune induction de l'expression n'a été détectée en eau douce. Comme nous l'avons vu, *nhe1* est omniprésent dans tous les tissus osmorégulateurs analysés. Contrairement à NHE2 et NHE3, il a été montré que NHE1 est localisé dans les membranes basolatérales des cellules épithéliales et participe à l'élimination de l'acide du cytoplasme et à la régulation du volume cellulaire (Demaurex et Grinstein, 1994). Chez la truite arc-en-ciel, aucune différence d'expression de *nhe1* entre eau douce et



eau de mer n'a été démontrée dans différents tissus incluant les branchies, l'intestin antérieur et le rein (Genz et al., 2011). Nous avons identifié trois gènes paralogues *nhe2* avec seulement deux d'entre eux exprimés dans les branchies, *nhe2b* et *nhe2c*. Aucune expression n'a été détectée dans l'intestin postérieur et le rein. C'est également le cas chez le poisson-crapaud, où *nhe2* n'a pas été détecté dans l'intestin postérieur ni dans le rectum (Esbaugh et Grosell, 2014). Il convient de noter qu'un seul gène *nhe2* a été étudié chez cette espèce, ce gène semblant jouer un rôle important dans le processus de désalinisation de l'œsophage. *Nhe2b* et plus étonnamment *nhe2c* sont faiblement exprimés dans les branchies du loup. L'implication de *nhe2* dans l'absorption de Na<sup>+</sup> apical semble donc peu probable, contrairement aux modèles existant chez d'autres espèces, telle que le choquemort (Edwards et al., 2010). Le rôle du *nhe2b* du loup dans la régulation acido-basique reste à déterminer. Malgré sa très faible expression, *nhe2c* est environ 28 fois plus exprimé en eau de mer qu'en eau douce, suggérant son rôle dans la sécrétion d'acide comme indiqué précédemment pour plusieurs paralogues *nhe2/3* en eau de mer (Chen et al., 2017; Claiborne et al., 1999; Liu et al., 2016). Contrairement au *nhe2* de la truite, le *nhe2b* et *nhe2c* du loup ne sont pas exprimés dans l'intestin postérieur et le rein, et *nhe2a* est très faiblement exprimé dans les branchies et le rein. Ce n'est pas le cas chez le choquemort, où la protéine NHE2a a été identifiée dans des cellules cuboïdales, le type cellulaire exprimant la VHA basolatérale et étant impliqué dans l'absorption de Na<sup>+</sup> (Edwards et al., 2010; Laurent et al., 2006).

#### I.3.4. Transport couplé Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dans les ionocytes des filaments branchiaux via NCC2

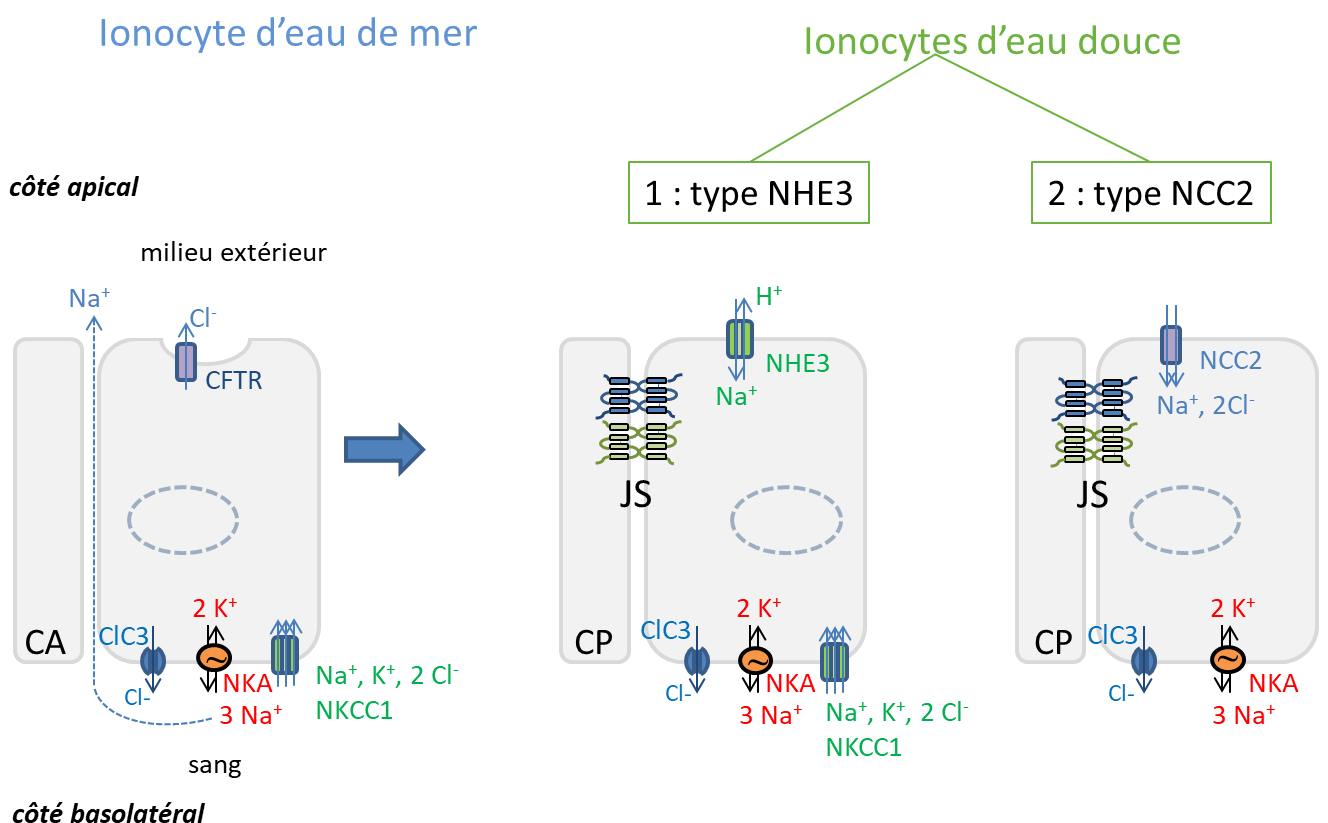
Dans le génome du loup, les gènes *slc12a3* (*ncc1*), *slc12a3-like* (*ncc2a*) et le *slc12a10* (*ncc2b*) ont été identifiés. *Slc12a3-like* est fortement exprimé dans les branchies du loup et est phylogénétiquement proche des autres séquences *ncc2* des téléostéens. Nous l'avons donc appelé *ncc2a* et nous avons quantifié son expression dans notre étude. La petite taille de la séquence de *slc12a10.2* (*ncc2b*) (486 pb) et sa position phylogénétique proche de celle de *slc12a3* (*ncc2a*) suggèrent que ces deux gènes pourraient être des variants d'épissage ou des paralogues. *Ncc2a* est significativement plus exprimé en eau douce qu'en eau de mer. Nos résultats d'immunohistochimie montrent aussi la présence d'un marquage apical du T4 (NKCC1-2/NCC1-2) des ionocytes filamenteux de loups acclimatés à l'eau douce pendant 2 semaines. Comme indiqué plus haut, l'anticorps T4 reconnaît un large épitope (fragment de peptide de 38kDa), partiellement commun à plusieurs isoformes SLC12A, y compris NKCC1, NKCC2, NCC1 et NCC2. Le marquage apical, est probablement lié à la présence de NCC2 (Lorin-Nebel et al., 2006). Un anticorps spécifique de NCC2 serait nécessaire pour affirmer cette hypothèse, mais l'absence d'expression de NCC1 et NKCC2 dans les branchies suggère que l'immunomarquage apical correspond bien au NCC2.

## I.4. Conclusion

Nous avons montré dans cette étude, que l'anhydrase carbonique (*ca2*), les glycoprotéines Rhésus transportant du  $\text{NH}_3$  (*rhcg1*), le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (*ncc2a*) et la sous-unité  $\alpha 1a$  de la NKA (*nka \alpha 1a*) sont des acteurs clés dans les branchies en eau douce pour l'absorption des ions, couplée à l'excrétion d'azote et à la régulation acido-basique.

Nous avons mis en évidence la présence de différents sous-ensembles d'ionocytes dans les branchies du loup, dont un sous-ensemble exprimant l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3 dans les membranes apicales des ionocytes localisés le long des lamelles branchiales en eau douce, potentiellement impliqués dans l'absorption de  $\text{Na}^+$  (Fig. 22). Ces cellules riches en NKA expriment du NKCC1 basal, suggérant une différenciation d'un type cellulaire d'eau de mer (riche en NKCC1 basolatéral) vers un type cellulaire d'eau douce, en réponse à un changement de salinité comme récemment montré chez le bar du Japon (*Lateolabrax japonicus*) (Inokuchi 2017). Un autre sous-ensemble d'ionocytes, est présent le long du filament avec un fort marquage du NCC2 apical couplé à une surexpression des ARNm de *ncc2a* en eau douce.

Ces types cellulaires restent à caractériser par l'analyse au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau protéique (localisation), de nouveaux transporteurs d'ions notamment ceux impliqués dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , afin de générer un modèle complet de l'absorption d'ions chez le loup.



**Fig. 22 : Modèle proposé de l'ionocyte en eau de mer, et des différents ionocytes d'eau douce chez le loup**

Le premier type cellulaire en eau douce, correspond aux ionocytes exprimant le NHE3 au niveau apical, la NKA et le NKCC1 au niveau basolatéral. Le second type concerne les ionocytes exprimant le NCC2 au niveau apical et la NKA basolatérale mais pas le NHE3. Abréviations : CA : cellule accessoire, CP : cellule pavimenteuse, JS : jonction serrée, CFTR : canal à chlorure, CIC 3 : canal à chlorure 3.

## II. Etude des mécanismes d'absorption ionique par une approche *in vitro*

---

La préparation des échantillons en vue de l'analyse en qPCR (extraction d'ARN et transcription inverse) a fait l'objet d'un stage de 8 semaines, pour lequel j'ai encadré Julie Jouis, étudiante en première année de BTS Analyses agricoles biologiques et biotechnologiques (ANABIOTEC).

### II.1. Introduction

L'acclimatation à la salinité nécessite la détection des changements osmotiques et l'activation ultérieure des réponses physiologiques permettant le rétablissement de l'homéostasie hydrominérale. Ces réponses physiologiques impliquent plusieurs organes ainsi que des voies de signalisation complexes permettant de faire le lien entre les différents organes concernés.

#### II.1.1. Etudes *in vivo* versus *in vitro*

L'approche *in vivo* sur des organismes entiers permet d'étudier l'individu dans son environnement. Cependant, la complexité des organismes vivants rend difficile l'exploration des fonctions biologiques séparément les unes des autres.

Les études *in vitro* permettent de mettre en évidence les facteurs régulateurs et d'analyser leurs mécanismes, à l'échelle de l'organe, du tissu ou de la cellule. L'organe ou le tissu isolé est soustrait de l'ensemble des régulations qui ont lieu normalement *in vivo*, de sorte que les autres facteurs internes n'interfèrent pas lors des expérimentations (Dufour et al., 1994). L'utilisation d'organes, de tissus ou de cellules isolées incubées dans un milieu de culture, offre plusieurs avantages. La maîtrise des conditions physico-chimiques du milieu d'incubation (pH, température, osmolalité, concentration des réactifs) permet d'analyser l'effet d'un seul composant et/ou les effets synergétiques ou antagonistes de deux ou plusieurs composants. La possibilité de travailler sur un nombre réduit de matériel biologique par puits de culture, permet de limiter le nombre d'individus utilisés par rapport aux expérimentations *in vivo* (Dufour et al., 1994; Mazon et al., 2004). L'approche *in vitro* risque cependant de représenter une situation trop éloignée des conditions physiologiques naturelles. C'est pour cette raison que les études *in vitro* et *in vivo* sont complémentaires et que les résultats issus de ces deux approches doivent être confrontés, afin d'intégrer les résultats obtenus *in vitro* dans un schéma plus global de régulation.

Plusieurs études *in vitro* ont montré que les ionocytes branchiaux isolés et dispersés ne peuvent pas survivre dans des conditions de culture cellulaire simple car des facteurs endogènes inconnus sont indispensables à la survie des ionocytes chez les téléostéens (Avella et Ehrenfeld, 1997; Fletcher et al., 2000; Leguen et al., 2007; McCormick et Bern, 1989; Wood et Pärt, 1997). Etant donné que les ionocytes forment un épithélium avec des cellules pavimenteuses, un système de culture appelé « double-seeded insert (DSI) » a été mis au point chez la truite arc-en-ciel, afin de conserver les interactions entre les cellules (Fletcher et al., 2000). Cette méthode consiste à ensemercer des cultures primaires provenant de branchies sur des inserts pendant 2 jours, afin de reproduire un épithélium branchial constitué de plusieurs types cellulaires, comprenant essentiellement des cellules pavimenteuses et des ionocytes qui s'insèrent entre les cellules pavimenteuses. Cependant, lors de la préparation des cultures primaires, les ionocytes subissent une étape de dissociation avec un traitement à la trypsine (Schnell et al., 2016). Ce traitement peut perturber la polarité des ionocytes et endommager les protéines transmembranaires, récepteurs et transporteurs de la membrane cellulaire des ionocytes. McCormick

et Bern (1989) ont mis au point un système alternatif d'incubation des filaments branchiaux qui ne nécessite pas d'étape de dissociation, afin d'examiner l'effet du cortisol sur l'épithélium branchial. Depuis, plusieurs études examinant l'effet d'hormones et/ou de la salinité ont utilisé cette méthode qui préserve l'arrangement cellulaire et permet aux composants du milieu d'incubation d'accéder aux ionocytes (Breves et al., 2017, 2013; Inokuchi et al., 2015; Watanabe et al., 2016). Cependant, cette méthode semble efficace à court terme (72 h) mais après plusieurs jours d'incubation, la viabilité des filaments est compromise.

### II.1.2. Facteurs de régulation : prolactine et/ou osmolalité extracellulaire

Lors de perturbations des conditions osmotiques internes et/ou des modifications de la salinité environnementale, certaines hormones secrétées par le système neuroendocrinien coordonnent les processus d'osmorégulation. La modulation de la transcription des gènes codant pour les effecteurs du transport ionique fait partie de ces processus (Fiol et Kültz, 2007). On distingue : les hormones dites « à action rapide » qui dirigent les réponses aiguës telles que l'activation ou l'inhibition du transport ionique par ouverture ou fermeture de canaux préexistants, la modulation du comportement de boisson et les réponses cardiovasculaires ; et les hormones dites « à action lente », qui agissent sur les sites osmorégulateurs en modifiant les schémas d'expression des gènes et la prolifération et/ou la différenciation de cellules permettant de mieux répondre aux besoins de l'animal à plus long terme (Breves et al., 2017; McCormick, 2011; Takei et al., 2014). Parmi les hormones « à action lente », la prolactine est considérée comme l'hormone d'acclimatation à l'eau douce. Elle est sécrétée par des cellules localisées au niveau de l'hypophyse antérieure, plus précisément dans la *rostral pars distalis*. Pickford et Phillips (1959) ont constaté que l'ablation de l'hypophyse entraîne une mortalité du choquemort acclimaté en eau douce mais pas en eau de mer, et que la survie en eau douce peut être rétablie par un traitement avec de la prolactine. Pour la plupart des téléostéens euryhalins, une exposition à l'eau douce entraîne une augmentation de la transcription, de la synthèse, et de la sécrétion de la prolactine ainsi qu'une élévation de son taux plasmatique (Lee et al., 2006; Manzon, 2002). Chez le tilapia du Mozambique, la diminution de l'osmolalité extracellulaire stimule, *in vitro*, la sécrétion de la prolactine hypophysaire (Seale et al., 2012a). Cette sécrétion est activée par des osmodétecteurs tels que l'aquaporine 3 (AQP3) et le canal calcique « Transient Receptor Potential Vanilloid 4 » (TRPV4), présents dans les cellules hypophysaires, qui suite à une baisse de l'osmolalité activent la sécrétion de la prolactine (Seale et al., 2012b).

Il est important de noter que la prolactine n'est pas seulement exprimée dans l'hypophyse. Chez plusieurs espèces de téléostéens, le gène codant pour la prolactine a été détecté dans les organes osmorégulateurs, suggérant un fonctionnement autocrine ou paracrine dans l'osmorégulation (Bu et al., 2015). Chez le loup, elle est exprimée de manière similaire dans les poissons adaptés à l'eau douce et à l'eau de mer, bien que l'expression dans les branchies soit significativement plus élevée que dans l'intestin (Boutet et al., 2007). Cependant, chez le poisson-zèbre et le poisson rouge, les transcrits du gène de la prolactine sont faiblement exprimés dans les tissus extra-hypophysaires par rapport à l'hypophyse (Bu et al., 2015; Imaoka et al., 2000). Ces résultats suggèrent que le rôle autocrine ou paracrine de la prolactine dans les branchies serait minime par rapport au contrôle endocrinien.

Bole-Feysot et al. (1998) ont mis en évidence, chez les vertébrés, la prédominance des récepteurs de la prolactine dans les épithéliums ayant une fonction osmorégulatrice. La présence des récepteurs de la prolactine dans les organes osmorégulateurs est largement reconnue chez les téléostéens, indiquant que ce sont des sites d'action de la prolactine (Lee et al., 2006). Chez le tilapia du Mozambique, la présence des récepteurs à la prolactine a été caractérisée dans les branchies, l'intestin, le rein, le foie

et les gonades (Dauder et al., 1990; Edery et al., 1984; Fryer, 1979; Prunet et Auperin, 1994). Chez la daurade royale et le tilapia du Mozambique, les récepteurs à la prolactine ont été localisés dans les membranes des ionocytes branchiaux (Santos et al., 2001; Weng et al., 1997). De nombreuses études ont caractérisé chez plusieurs espèces de téléostéens la présence de deux gènes distincts de récepteurs à la prolactine, *prlr 1* et *prlr 2* (Fiol et al., 2009; Zhang et al., 2010). Chez certains téléostéens, dont le loup, un troisième récepteur, *prlr 3*, est présent dans le génome (Tine et al., 2014). Cependant aucune étude à ce jour n'a caractérisé précisément ce troisième gène. A l'instar de l'expression de la prolactine en eau douce, les niveaux d'ARNm et de protéines des récepteurs à la prolactine sont également plus élevés en eau douce qu'en eau de mer dans les organes osmorégulateurs et localement dans les ionocytes branchiaux et les entérocytes intestinaux (Takei et McCormick, 2012). La localisation et la caractérisation des récepteurs à la prolactine au niveau des membranes des ionocytes ont confirmé l'action directe de la prolactine au niveau des branchies. Zhou et al. (2003), ont démontré que l'ajout de prolactine stimulait l'absorption d'ions via les épithéliums branchiaux cultivés chez la truite arc-en-ciel, suggérant que les ionocytes de type eau douce pourraient être des cibles potentielles de la prolactine.

La prolactine régule l'expression des gènes dans les ionocytes en se liant aux récepteurs transmembranaires qui activent la voie de signalisation JAK/STAT (Bole-Feysot et al., 1998). Plusieurs études ont indiqué que les protéines impliquées dans le transport actif des ions dans les branchies sont régulées par la prolactine, notamment l'isoforme de type eau de mer de la NKA, NKA  $\alpha 1b$ , et l'isoforme de type eau douce NKA  $\alpha 1a$ , chez le saumon de l'Atlantique (Takei et McCormick, 2012). Chez le tilapia du Mozambique, les niveaux d'ARNm des branchies du cotransporteur *ncc* et de la *nka \alpha 1a* sont réduits après hypophysectomie et restaurés par traitement à la prolactine (Breves et al., 2010; Tipsmark et al., 2011). De plus, la prolactine stimule *in vivo* et *in vitro* l'expression de l'aquaporine 3 *aqp3* branchiale qui est un canal favorisant le passage d'eau transcellulaire (Breves et al., 2016). Chez le medaka, l'expression du gène *ncc 2b* dépend de l'activation en aval de *stat5* par la prolactine via ses récepteurs, et de sa translocation nucléaire ultérieure au sein des ionocytes branchiaux (Bollinger et al., 2018).




Suite à un choc osmotique, lors de la phase aiguë d'acclimatation, des variations de l'osmolalité plasmatique peuvent, en complément de la voie hormonale, directement induire des changements de fonction de l'épithélium branchial (Inokuchi et al., 2015; Marshall et al., 2000; Tse et al., 2007). Le changement d'osmolalité agirait donc directement sur ces cellules, probablement via des récepteurs membranaires sensibles à des modifications osmotiques ou à des modifications fines de la structure membranaire ou du cytosquelette. Pour vérifier cette hypothèse, différents auteurs ont mesuré sur des cultures de tissus *in vitro* comment, chez le tilapia du Mozambique, des variations de conditions osmotiques induisent des modifications de la morphologie des ionocytes et de la transcription de certains gènes impliqués dans le transport d'ions (Breves et al., 2017; Hiroi, 2005; Inokuchi et al., 2015). Il semblerait donc que les ionocytes et certaines protéines transmembranaires qu'ils expriment peuvent fonctionner comme des osmorécepteurs ne nécessitant pas forcément toujours une activation hormonale (Hiroi, 2005; Kültz, 2012b; Marshall et al., 2008; Zadunaisky et al., 1995). Le canal à chlorure *clc 3* par exemple est un bon candidat pour être impliqué dans l'osmodétection du fait de sa sensibilité aux changements de volume cellulaire pouvant être induits par un changement de salinité (Duan et al., 1999).

## II.2. Objectifs

Nous émettons l'hypothèse que chez le loup, les variations de conditions osmotiques peuvent être directement détectées par les ionocytes par une exposition directe au niveau apical ou au niveau basolatéral par des changements de l'osmolalité du sang. L'incubation de filaments branchiaux, dans des milieux de culture en présence ou absence de prolactine et à différentes salinités pourrait permettre d'identifier les facteurs susceptibles de déclencher un changement d'expression des gènes au niveau branchial. Est-ce que des changements d'osmolalité ou de concentration ionique du sang peuvent réguler l'expression des transcrits impliqués dans l'absorption ionique ou est-ce que la voie hormonale est indispensable ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons examiné les effets découplés de l'osmolalité extracellulaire et de la prolactine, après 1 h et 8 h d'incubation, sur les fonctions iono-régulatrices des branchies de loups acclimatés à l'eau douce depuis 4 mois.

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer par une approche *in vitro* :

-  l'effet d'une baisse d'osmolalité extracellulaire sur l'expression des gènes impliqués dans l'absorption d'ions ;
-  l'effet de la prolactine à deux concentrations sur l'expression de ces mêmes gènes ;
-  l'effet de l'interaction entre l'osmolalité extracellulaire et la prolactine sur l'expression de ces mêmes gènes.

## II.3. Matériel et Méthodes

### II.3.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé est schématisé Fig. 17 page 25.

Des juvéniles de loup âgés de 8 mois ( $13,59 \text{ cm} \pm 0,12$ ,  $32,19 \text{ g} \pm 2,62$ ) élevés à la station Ifremer de Palavas-les-Flots (Hérault, France) ont été utilisés pour cette étude. Ils sont issus d'un croisement de reproducteurs sauvages (40 mâles et 23 femelles) provenant de la partie occidentale de la mer Méditerranée. 350 loups ont été maintenus dans de l'eau de mer (osmolalité :  $1208 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) à  $20^\circ\text{C}$  en recirculation et sous photopériode naturelle. Puis, 300 loups ont été transférés en eau douce de manière progressive. De l'eau du robinet déchlorée (osmolalité :  $8 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) a été ajoutée à l'eau de mer afin d'obtenir une eau saumâtre (eau de mer diluée, EMD) à une osmolalité de  $475 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ . Après 24 h d'acclimatation dans l'eau de mer diluée, les loups ont été légèrement anesthésiés (benzocaïne 25 ppm) pour limiter le stress de la manipulation puis transférés en eau douce pour une durée de 14 jours (L'Honoré et al., 2020, 2019). Le reste (50 loups) a été maintenu en eau de mer pour servir de témoin. Afin de procéder aux différents prélèvements sanguins pour la mesure de la pression osmotique, les loups ont été anesthésiés avec une dose faible de benzocaïne à 50 ppm. Pour les prélèvements de branchies, les loups ont été sacrifiés avec une dose létale d'anesthésiant (benzocaïne à 100 ppm).



### II.3.2. Prélèvement de sang

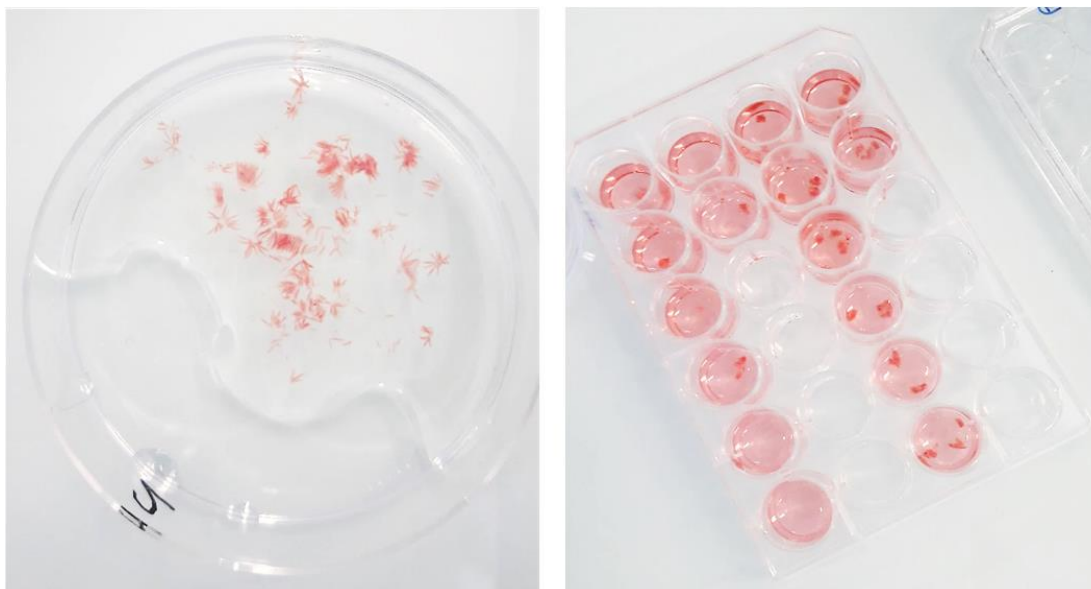
La prise de sang est effectuée au niveau de l'artère située au niveau de la nageoire caudale à l'aide d'une seringue héparinée de 1 ml pour éviter la coagulation du sang.

### II.3.3. Mesure de pression osmotique

Immédiatement après la ponction sanguine, l'osmolalité sanguine a été déterminée par la mesure de la pression osmotique grâce à un osmomètre cryoscopique (Advanced Instruments modèle 3300). La concentration ionique étant proportionnelle à la température de congélation, la mesure de l'osmolalité est calculée d'après la mesure du point de congélation. La mesure de l'osmolalité sanguine des loups, selon la durée d'exposition à l'eau douce, permet en général d'évaluer le maintien de l'homéostasie hydro-minérale et donc l'efficacité des processus d'osmorégulation mis en place. Dans notre étude, l'osmolalité sanguine a été mesurée afin de définir 1) une osmolalité proche de celle du sang après une acclimatation à long terme (4 mois) et 2) une osmolalité basse reflétant un stress osmotique. Cette expérience préliminaire réalisée dans le cadre d'une thèse (L'Honoré et al., 2019) nous a permis d'utiliser dans les expériences *in vitro* des osmolalités physiologiquement pertinentes correspondant à un milieu isotonique et hypotonique.

### II.3.4. Préparation des filaments branchiaux et des milieux d'incubation

Immédiatement après la mort des loups, les huit arcs branchiaux de dix loups ont été prélevés et rincés dans une solution saline tamponnée stérile (BSS : NaCl 120 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 4 mmol.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mmol.l<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol.l<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2 mmol.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mmol.l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.3 mmol.l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 2.1 mmol.l<sup>-1</sup>, Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup>, pH 7.4) puis incubés dans une solution de KMNO<sub>4</sub> à 0.025 % pendant 1 minute à température ambiante. Les filaments ont été sectionnés et détachés de l'arc pour permettre aux composants du milieu de culture d'accéder aux ionocytes. Ils ont ensuite été mélangés par poisson et l'ensemble divisé en huit échantillons de tailles égales: un échantillon (1 puit dans un plaque de 24, Fig. 23) par condition (voir ci-dessous). Les filaments ont été incubés dans des plaques de 24 puits contenant du milieu de culture L-15 de Leibovitz complété par 6 mg. l<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 mg. l<sup>-1</sup> de streptomycine pour bloquer la croissance bactérienne. Afin d'examiner **l'effet de l'osmolalité extracellulaire**, les filaments branchiaux ont été incubés dans des milieux de culture d'osmolalités différentes à 280 mOsm.kg<sup>-1</sup> (considéré comme hypotonique par rapport au sang) et 360 mOsm.kg<sup>-1</sup> (considéré comme isotonique par rapport au sang), sans prolactine, pendant 1 h et 8 h. Pour étudier **l'effet de la prolactine**, les filaments ont également été incubés dans les milieux de cultures à 280 et 360 mOsm.kg<sup>-1</sup>, en présence de prolactine d'origine ovine (oPRL) à deux concentrations : 0.1 µg.ml<sup>-1</sup> et 1 µg.ml<sup>-1</sup> pendant 8 h. Les concentrations de prolactine ont été choisies d'après la littérature (Breves et al., 2014b; Inokuchi et al., 2015). Après incubation, les filaments branchiaux ont été stockés dans du Trizol™ (Invitrogen) et conservés à -80 °C avant l'extraction des ARN.



**Fig. 23 : Prélèvement et incubation des filaments branchiaux**

Filaments branchiaux sectionnés et détachés de l'arc branchial puis incubés dans des plaques de 24 puits contenant les différents milieux de culture.

### II.3.5. Choix des transporteurs ioniques

Nous avons sélectionné des marqueurs biologiques potentiellement impliqués dans les fonctions d'hyper-osmorégulation des ionocytes branchiaux. Les résultats obtenus dans le premier chapitre ont permis de sélectionner plusieurs gènes impliqués dans l'absorption ionique, et potentiellement des osmodétecteurs via leur sensibilité aux variations de salinités. Suite à une recherche bibliographique d'autres gènes codant pour des transporteurs d'ions ont été ajoutés pour cette étude *in vitro* : l'échangeur d'anion  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  *ae1*, potentiellement impliqué dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$  et dans la régulation acido-basique (Tang et Lee, 2007a), et le transporteur *clc 3* ayant un rôle dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$  et dans la régulation du volume cellulaire (Bossus et al., 2013). Nous avons également ajouté les trois récepteurs à la prolactine présents chez le loup *prlr 1*, *prlr 2* et *prlr 3*.

### II.3.6. Extraction d'ARN, synthèse de l'ADN complémentaire et qPCR

Le protocole utilisé est le même que celui présenté dans le matériel et méthode de la partie I (paragraphes I.1.3 et I.1.5, page 27). Les amorces utilisées dans cette étude sont indiquées dans le Tableau 2. La normalisation, la visualisation et la représentation graphique des résultats de l'analyse en qPCR, ont fait l'objet d'un développement d'outils et la rédaction d'un script utilisant plusieurs fonctions de différents packages sous RStudio (RStudio Team, 2019).

### II.3.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant RStudio version 1.1.383. En raison de la petite taille de l'échantillon, des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis suivis de tests *post-hoc* de comparaisons multiples de Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons statistiques des valeurs moyennes. Pour examiner l'effet des deux facteurs et de leur interaction, un test de Scheirer Ray Hare (SRH) a été réalisé. Les données sont présentées en tant que moyennes et le niveau de signification statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .

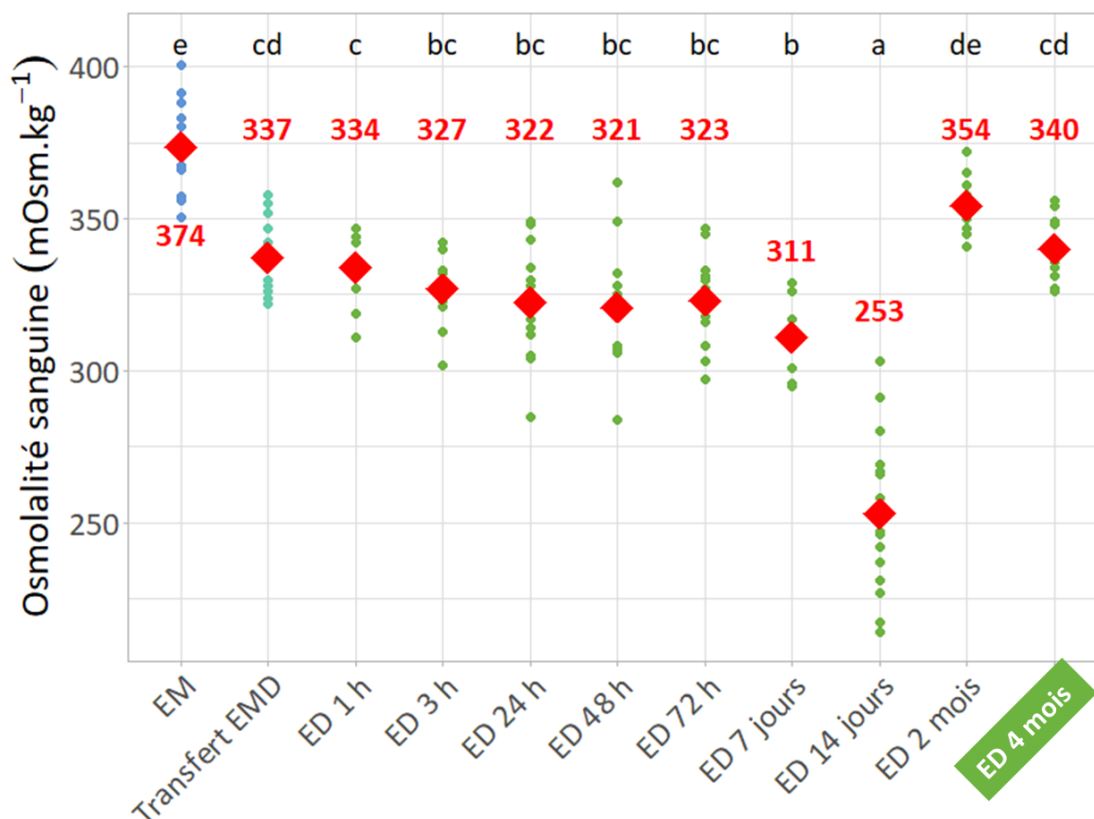
**Tableau 2 : Amorces utilisées dans ce chapitre**

Les séquences identifiées sous la forme « DLAgn\_ » proviennent du génome du loup (Tine et al., 2014). Les autres séquences proviennent de la base de données de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

ID séquences	Gène	Séquence (5'-3')	Taille	Efficacité
DLAgn_00204050	<i>nhe 3 / slc9a3</i>	GGATACCTCGCTACCTGAC AAGAGGAGGGTGAGGAGGAT	251	1,98
KP400258	<i>nka α1a / atp1a1a</i>	CCTCAGATGGCAAGGAGAAG CCCTGCTGAGATCGGTTCC	146	1,89
DLAgn_00038210	<i>ncc 2a / slc12a3-like</i>	ATGATGAGCCTCTTCGAGCC GCTGCTCTCATCACCTTCTGT	278	1,94
JN998891.1	<i>clc 3</i>	CAAGTACAGCAAGAACGAGGC ACAGCGTCTTGAGAGGGAAG	146	1,82
DLAgn_00101870	<i>ae1 a</i>	TCTGAAGGAATCGGTGGTGC CTCGTTCTGGATCTCGGTGG	253	1,84
DLAgn_00193420	<i>ae1 b</i>	TGAACAAGGGTGAGATCCGC ACAAAGCGAATAGGGACGGG	283	1,96
DLAgn_00166370	<i>rhcg 1</i>	TCAGGGAATTGTGTGACCGC AGAATCAAGTCCACGCTGGG	118	2,01
DLAgn_00083540	<i>prlr 1</i>	GGGACAGAGGCAGAAGACAT GAGGTAGGAGGATGTGGAGC	189	1,85
DLAgn_00121350	<i>prlr 2</i>	GAATGACAATGGGCCTCTGC GTTCCGTTGCTTCTGGGTTT	245	2,03
DLA_LG24_000180	<i>prlr 3</i>	ACAACCTGACAGACGGAGAG AGTTTCCATTGGCGGTGATG	183	1,99
AY831388.1	<i>18S</i>	CCAACGAGCTGCTGA CCGTTACCGTGGTCC	208	1,82
FM004681	<i>fau</i>	GACACCAAGGTTGACAAGCAG GGCATTGAAGCACTTAGGAGTTG	150	2,07
AJ866727	<i>ef1α</i>	GGCTGGTATCTCTAAGAACG CCTCCAGCATGTTGTCTCC	239	2,09

## II.4. Résultats

### II.4.1. Osmolalité sanguine et choix de l'osmolalité des milieux de culture



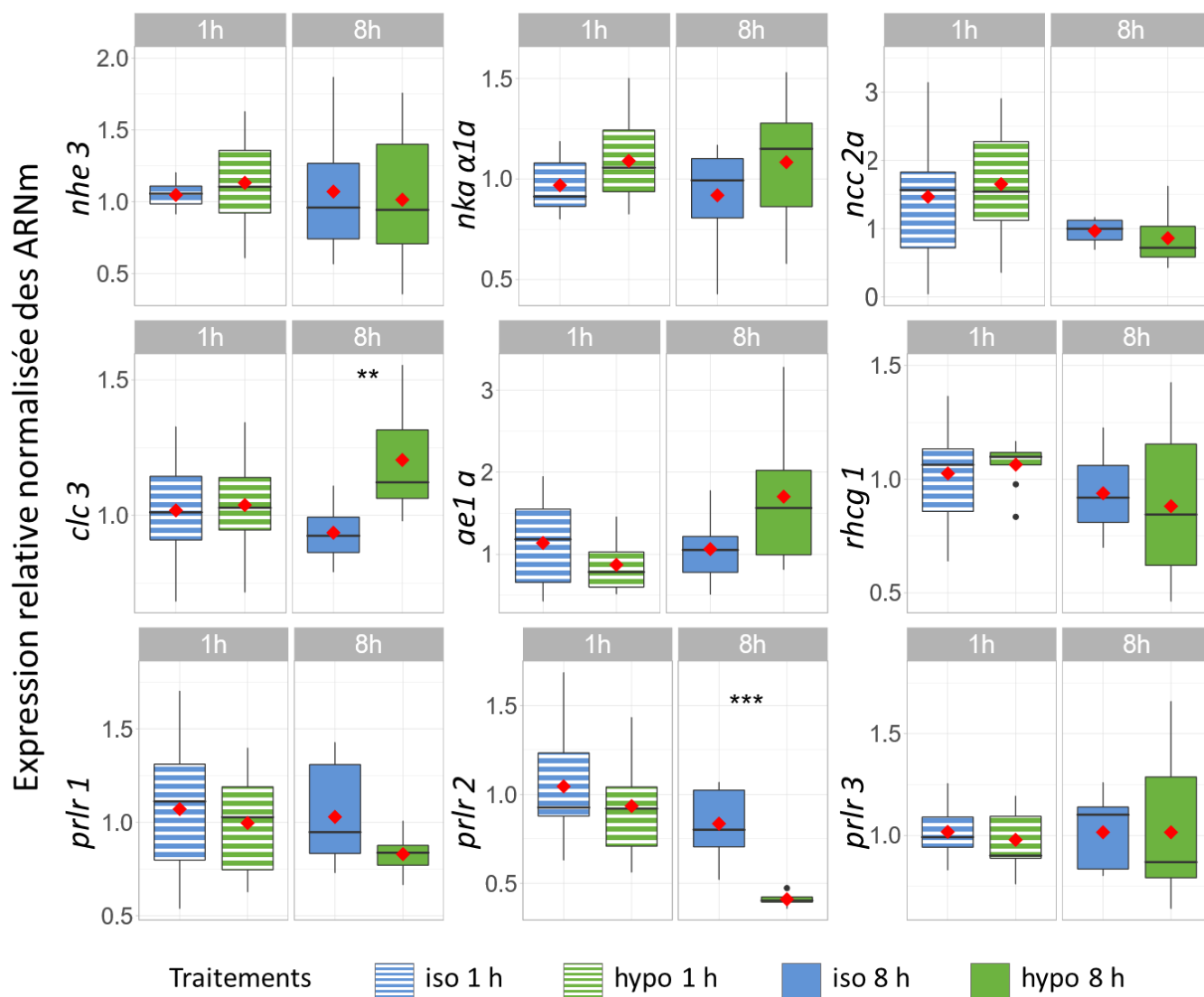
**Fig. 24 : Evolution de l'osmolalité sanguine chez le loup après un transfert en eau douce**

Osmolalité sanguine mesurée chez des loups maintenus en eau de mer (EM, 1208 mOsm.kg<sup>-1</sup>), puis transférés en eau de mer diluée (EMD, 475 mOsm.kg<sup>-1</sup>) et en eau douce (ED, 8 mOsm.kg<sup>-1</sup>). Mesures enregistrées entre 1 h et 4 mois d'acclimatation. Les nombres et losanges en rouge indiquent les moyennes de chaque relevé. Les conditions ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test *post-hoc* de comparaison multiples de Dunn,  $p < 0,05$ . N = 10-16. Données issues de la thèse de Thibaut L'Honoré (L'Honoré, 2019), complétées avec les valeurs des pressions osmotique obtenues à partir des poissons de cette expérience.

L'osmolalité du sang diminue significativement après le transfert des loups de l'eau de mer (EM) en eau de mer diluée (EMD), puis elle diminue progressivement pour atteindre une valeur significativement plus basse 1 semaine après le transfert, en comparaison avec les loups EM, EMD et ED 1 h. On constate une importante baisse à 2 semaines avec des valeurs significativement plus basses que toutes les autres conditions. Après 2 et 4 mois en eau douce, l'osmolalité sanguine augmente jusqu'à atteindre des valeurs proches et légèrement en dessous de l'osmolalité du sang des loups témoins maintenus en eau de mer. A 4 mois d'acclimatation, on constate une légère diminution de l'osmolalité avec comme valeur moyenne 340 mOsm.kg<sup>-1</sup>, avec une large distribution des valeurs, entre 326 à 356 mOsm.kg<sup>-1</sup>.

Le choix des osmolalités du milieu de culture s'est fait à partir des données ci-dessus (Fig. 24). Nous avons sélectionné la valeur de 360 mOsm.kg<sup>-1</sup> pour la condition iso-osmotique car cette valeur est intermédiaire entre les valeurs d'osmolalité sanguine des loups témoins en eau de mer et des loups en eau douce pleinement adaptés. Concernant la condition hypotonique, la valeur de 280 mOsm.kg<sup>-1</sup> a été retenue car elle est suffisamment basse pour refléter un stress osmotique et physiologiquement viable.

## II.4.2. Effet de l'osmolalité extracellulaire sur l'expression des transcrits



**Fig. 25 : Effets de l'osmolalité extracellulaire sur l'expression des ARNm**

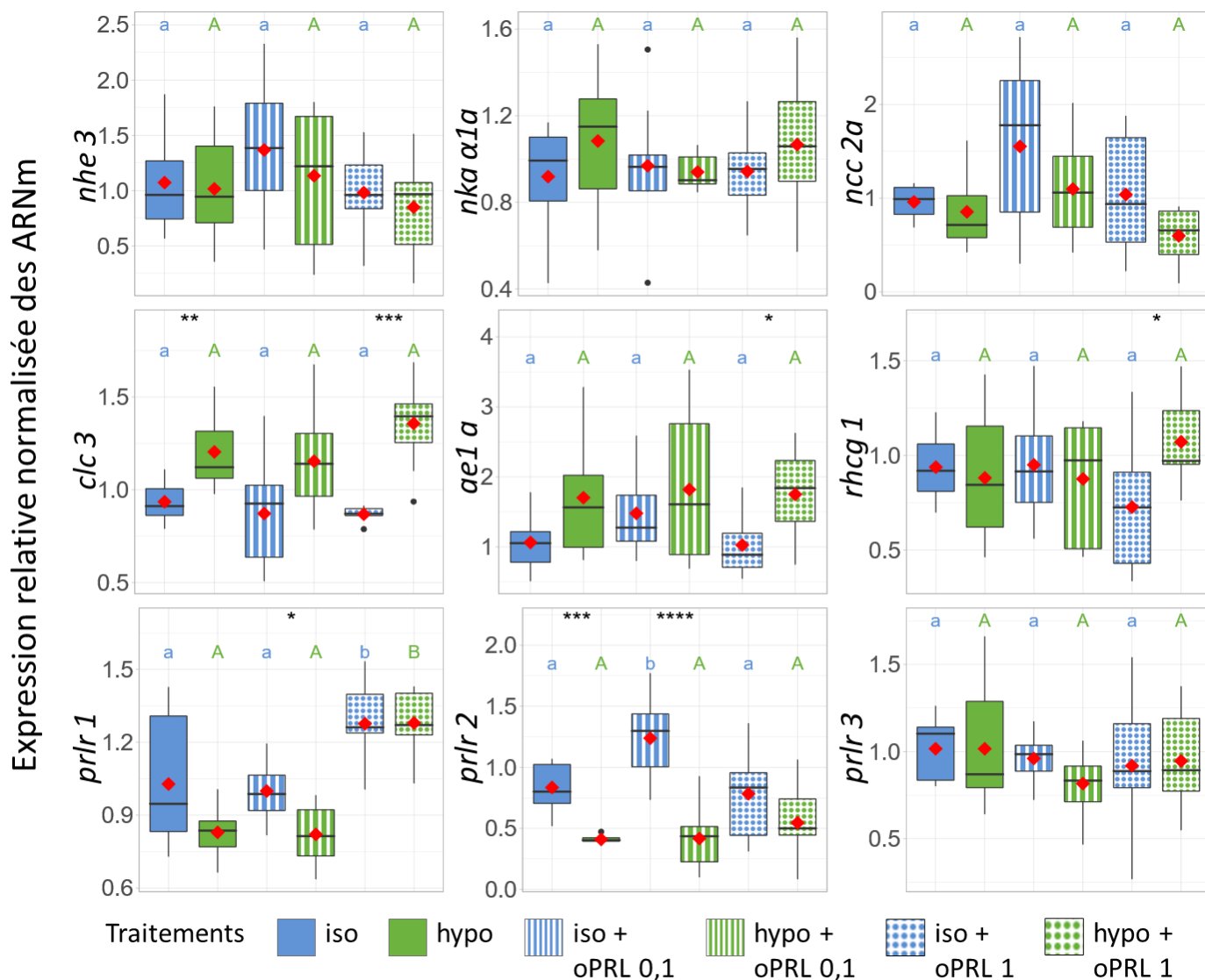
Traitements : « iso 1 h » et « iso 8 h », correspond à une incubation en condition isotonique ( $360 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) pendant 1 h et 8 h ; « hypo 1 h » et « hypo 8 h », incubation en condition hypotonique ( $280 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) pendant 1 h et 8 h. Les niveaux d'expression pour les traitements à 1 h et 8 h sont respectivement représentés par rapport au niveau d'expression des conditions témoins « iso 1 h » et « iso 8 h ». La moyenne est représentée par le losange rouge. Les astérisques symbolisent la valeur des p-value du test de comparaison entre les osmolalités isotonique et hypotonique. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Wilcoxon-Mann-Whitney,  $p < 0,05$ . Code de signification des symboles de p-value : \*\*\*  $< 0,001$  ; \*\*  $< 0,01$  ; \*  $< 0,05$  ;  $< 0,1$  ; rien  $\leq 1$ . N = 6-10.

Pour tester l'effet de l'osmolalité, deux temps d'incubations sont comparés, 1 h et 8 h (Fig. 25).

Pour l'ensemble des transcrits, aucune différence significative de l'expression n'a été observée entre les milieux d'osmolalité isotonique et hypotonique, après 1 h d'incubation. Après 8 h d'incubation, l'expression des transcrits de *nhe3*, *nka α1a*, *ncc 2a*, *ae1 a*, *rhcg1*, *prlr 1* et *prlr 3* ne montre aucune différence significative entre les traitements. Les niveaux d'expression des ARNm du canal à  $\text{Cl}^-$ , *clc 3*, sont significativement plus élevés en condition hypotonique par rapport au milieu isotonique ( $p = 0,0014$ ). On observe la même tendance mais non significative pour les transcrits du gène *ae1 a* ( $p = 0,053$ ). Inversement, l'expression du récepteur à la prolactine *prlr 2* est significativement plus basse en milieu hypotonique par rapport au milieu isotonique ( $p = 0,00058$ ).

Il est important de noter que nous avons observé une augmentation des valeurs de crossing point (CP) après 8 h d'incubation pour l'ensemble des gènes y compris les gènes de référence en comparaison avec les valeurs à 1 h d'incubation. La différence observée est en moyenne inférieure à 1 CP pour les gènes *18S* et *ef1α* et est en moyenne d'environ 2 CP pour les gènes d'intérêts.

### II.4.3. Effet de la prolactine sur l'expression des gènes



**Fig. 26 : Effets de la concentration de la prolactine ovine sur l'expression des ARNm**

Traitements : « iso », « iso + oPRL 0,1 » et « iso + oPRL 1 », correspond à une incubation en condition isotonique (360 mOsm.kg<sup>-1</sup>) pendant 8 h, sans prolactine, avec 0,1 µg.ml<sup>-1</sup> et 1 µg.ml<sup>-1</sup> de prolactine ovine ; « hypo », « hypo + oPRL 0,1 » et « hypo + oPRL 1 », incubation en condition hypotonique (280 mOsm.kg<sup>-1</sup>) pendant 8 h, sans prolactine, avec 0,1 µg.ml<sup>-1</sup> et 1 µg.ml<sup>-1</sup> de prolactine ovine. Les niveaux d'expression sont représentés par rapport au niveau d'expression de la condition témoin « iso ». La moyenne est représentée par le losange rouge. Les lettres bleues en minuscules représentent les différences entre les traitements de prolactine pour la condition isotonique et les lettres vertes en majuscules pour la condition hypotonique. Les conditions ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes (Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test *post-hoc* de comparaison multiples de Dunn,  $p < 0,05$ ). Les astérisques indiqués correspondent au test de comparaison deux à deux entre les osmolalités isotonique et hypotonique (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). N = 6-10. Code de signification des symboles de p-value : \*\*\* < 0,001 ; \*\* < 0,01 ; \* < 0,05 ; . < 0,1 ; cellule vide  $\leq 1$ .

Pour tester l'effet de la prolactine, l'absence et l'ajout de prolactine ovine a été comparé à deux concentrations : 0,1 µg.ml<sup>-1</sup> et 1 µg.ml<sup>-1</sup>, après 8 h d'incubation (Fig. 26).



Après 8 h d'incubation, l'expression des transcrits de *nhe3*, *nka α1a*, *ncc 2a*, et *prlr3* ne montre aucune différence significative entre les différents traitements. Les niveaux d'expression des transcrits des gènes *clc 3*, *ae1 a*, *rhcg 1*, *prlr 1* et *prlr 2* montrent des différences significatives entre certains traitements (d'osmolalité différentes en absence ou présence de prolactine à deux concentrations). Un test statistique non paramétrique de type Scheirer Ray Hare (SRH) à deux facteurs avec interaction a été réalisé afin d'examiner l'influence de chaque facteur de régulation et de leur interaction (Tableau 3).

**Tableau 3 : Synthèse des résultats du test statistique Scheirer Ray Hare à deux facteurs avec interaction**

Les étoiles symbolisent le degré de significativité des p-value au seuil de 0,05. Code de signification : \*\*\* < 0,001 ; \*\* < 0,01 ; \* < 0,05 ; . < 0,1 ; cellule vide ≤ 1. Abréviations : Prl, prolactine.

Gènes	Osmolalité	Dose Prl	Interaction
<i>nhe 3</i>			
<i>nka α1a</i>			
<i>ncc 2a</i>	.		
<i>clc 3</i>	***		
<i>ae1 a</i>	**		
<i>rhcg 1</i>			.
<i>prlr 1</i>	*	***	
<i>prlr 2</i>	***		.
<i>prlr 3</i>			

Pour le canal à Cl<sup>-</sup> *clc 3*, en condition isotonique, aucune différence n'est constatée entre les deux traitements de prolactine ainsi qu'avec la condition sans prolactine. Il en est de même en condition hypotonique, pour laquelle les niveaux d'ARNm ne varient pas en présence ou absence de prolactine, aux deux doses testées. Cependant, en milieu hypotonique, on observe une surexpression des transcrits en comparaison avec les milieux isotoniques ; cette surexpression est significative en l'absence et en présence de prolactine à 1 µg.ml<sup>-1</sup> (p = 0,0031 et 0,00025 respectivement). Seule l'osmolalité semble influencer l'expression des transcrits de *clc 3* et aucune interaction entre l'osmolalité et la dose de prolactine n'a été détectée (Tableau 3).

Concernant l'expression de *ae1 a* et de *rhcg 1*, aucune différence n'est constatée en milieu isotonique entre les traitements de prolactine et la condition sans prolactine. En revanche, l'expression de ces gènes est significativement supérieure en condition hypotonique par rapport au milieu isotonique, seulement en présence de prolactine à 1 µg.ml<sup>-1</sup> (p = 0,013 et 0,035, respectivement). Pour *ae1 a* en absence de prolactine, une tendance est observée avec une expression légèrement supérieure en milieu hypotonique comparé au milieu isotonique (p = 0,053). Pour *rhcg 1*, une interaction entre l'osmolalité et la dose de prolactine non significative au seuil de 0,05 a été détectée (P<sub>SRH</sub> = 0,053).

Pour le récepteur à prolactine *prlr 1*, on observe une diminution de l'expression en condition hypotonique comparée à la condition isotonique, significative en présence de prolactine à 0,1 µg.ml<sup>-1</sup> (p = 0,021). Fait intéressant, l'ajout de 1µg.ml<sup>-1</sup> de prolactine induit une surexpression des transcrits pour les deux osmolalités, par rapport aux traitements sans prolactine et par rapport aux faibles doses de prolactine à 0,1 µg.ml<sup>-1</sup>. D'après les résultats du test SRH, les différences observées pour *prlr 1* pourraient être dues principalement à la dose de prolactine et dans une moindre mesure à l'osmolalité mais par à leur interaction.

Concernant les niveaux des transcrits du récepteur à la prolactine *prlr 2*, on observe une expression inférieure des transcrits en condition hypotonique par rapport à la condition isotonique, significative en l'absence et en présence de prolactine à 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p = 0,00058$  et  $8,7\cdot 10^{-5}$  respectivement). On constate également une différence d'expression en milieu isotonique avec une augmentation de l'expression de *prlr 2* en présence de 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de prolactine par rapport au traitement à 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p = 0,0243$ ) et en absence de prolactine ( $p = 0,0430$ ). Les données du test SRH indiquent que seule l'osmolalité semble influencer l'expression de *prlr 2*.

## II.5. Discussion

### II.5.1. Evolution de l'osmolalité sanguine suite à un changement de salinité

La diminution progressive de l'osmolalité sanguine 14 jours après le transfert en eau douce, est cohérente avec une étude précédente réalisée sur des loups du même âge. Bossus et al. (2011) ont observé une baisse significative de l'osmolalité sanguine à partir de 24 h et jusqu'à 30 jours, après un transfert direct en eau douce, pour atteindre des valeurs moyennes d'environ 280  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ce qui est proche de nos valeurs d'osmolalité à 14 jours. Nos données indiquent qu'entre 2 semaines et 2 mois, l'osmolalité sanguine remonte jusqu'à des valeurs légèrement plus faibles par rapport aux témoins en eau de mer. Prises ensemble, ces données suggèrent une réponse en deux temps de l'acclimatation en eau douce chez le loup. Une première phase durant laquelle certains mécanismes de régulation doivent être rapidement activés ou désactivés, probablement déclenchés par des osmorécepteurs dès le transfert en eau de mer diluée (Fiol et Kültz, 2007; Kültz, 2012a, 2012b). Cette phase permet d'empêcher une baisse trop importante de la pression osmotique suite au changement de salinité et se traduit au niveau branchial par une imperméabilisation de l'épithélium branchial, une fermeture de certains canaux ioniques et une inactivation de certains transporteurs ioniques (Kültz, 2015). Ensuite, une phase de régulation à plus long terme se met en place afin de rétablir un nouvel équilibre hydrominéral. Nos résultats suggèrent que la phase de régulation est un long processus chez le loup, car après 14 jours d'acclimatation l'homéostasie n'est pas encore rétablie. Le nouvel équilibre est atteint 2 à 4 mois après le transfert en eau douce à environ 340-350  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Fig. 24). Ces valeurs sont cohérentes avec celles enregistrées par Nebel et al. (2005) chez le loup, montrant une baisse de l'osmolalité sanguine de 12 % chez les loups acclimatés à l'eau douce durant 3 semaines, par rapport à ceux maintenus en eau de mer.

Une fois cet équilibre atteint, l'ensemble des transporteurs et canaux ioniques sont mis en place pour efficacement absorber les ions afin de maintenir ce nouvel équilibre hydrominéral. Les loups sont alors considérés pleinement acclimatés à l'eau douce. Nos données montrent également une forte dispersion des valeurs de l'osmolalité sanguine entre les loups transférés en eau douce, indiquant une importante variabilité intraspécifique des capacités d'acclimatation à une diminution de la salinité.

Dans notre étude, les filaments branchiaux exposés à un milieu de culture à 280  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  sont exposés à une diminution de l'osmolalité. Cette valeur d'osmolalité est donc hypotonique puisqu'elle est inférieure à l'osmolalité du sang d'un animal pleinement acclimaté. Il est à noter tout de même que cette valeur est physiologique comme le montre la Fig. 24. La pression osmotique sanguine de certains loups peut atteindre des valeurs très basses en eau douce ; dans notre cas le minimum mesuré est de 214  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  correspondant probablement à des animaux en stress osmotique sévère et qui ne vont pas survivre comme l'ont montré plusieurs études (L'Honoré et al., 2020, 2019; Nebel et al., 2005b).

### II.5.2. Pas de réponse à court terme pour *nka α1a*, *ncc 2a* et *nhe3*

L'absence de réponse observée après 8 h d'incubation pour les transcrits de *nka α1a*, *ncc 2a* et *nhe3*, suggère que leur expression n'est pas activée par une variation de l'osmolalité ou l'ajout de prolactine à court terme. Leur activation pourrait faire partie des réponses à plus long terme ou nécessiter la présence d'autres facteurs impliqués dans la régulation du pH ou l'excrétion azotée. Inokuchi et al. (2015) n'ont pas observé de changement d'expression entre les différentes osmolalités en l'absence de prolactine pour les transcrits de *nka α1a*, *ncc* et *nhe3* après 6 h d'incubation. Cependant, après 3 h d'incubation et pour l'osmolalité la plus élevée (450 mOsm.kg<sup>-1</sup>), ils ont enregistré une diminution significative de l'expression pour *nka α1a* et *ncc*. Chez le tilapia, l'ajout de prolactine ovine à forte dose (1 et 5 µg.ml<sup>-1</sup>) induit l'expression des transcrits de *nka α1a* et *ncc* après 8 h d'incubation à une osmolalité de 330 mOsm.kg<sup>-1</sup> et l'expression de *nh3* après 24 h d'incubation. Il serait intéressant de poursuivre le temps d'incubation pour étudier si une activation des transcrits a lieu à plus long terme chez le loup.

### II.5.3. Surexpression de *clc 3* en milieu hypotonique

Nos résultats indiquent que la diminution de l'osmolalité extracellulaire induit la surexpression de *clc 3* après 8 h d'incubation (Fig. 25 et Fig. 26), vraisemblablement due à une baisse de l'osmolalité (Tableau 3).

Plusieurs études précédentes ont suggéré que les canaux ClC dont le canal à Cl<sup>-</sup> ClC 3 pourraient participer à l'absorption des Cl<sup>-</sup> par les branchies chez les poissons acclimatés à l'eau douce. Chez le loup, l'utilisation d'un anticorps hétérologue a permis de localiser la protéine ClC 3 au niveau de la membrane basolatérale des ionocytes branchiaux en eau douce et en eau de mer (Bossus et al., 2013). De plus, son expression serait stimulée par un environnement hypo-osmotique ou à faible teneur en Cl<sup>-</sup> chez le tétraodon vert (*Tetraodon nigroviridis*) et le poisson lait (Tang et al., 2011, 2010; Tang et Lee, 2007b). Dans les branchies de loups acclimatés à l'eau douce pendant 14 jours, un niveau plus élevé de protéine ClC 3 a été observé en eau douce par rapport à l'eau de mer (Bossus et al., 2013). Cependant, dans une étude plus récente, l'expression des ARNm dans les branchies du loup n'est pas différente entre l'eau de mer et l'eau douce à deux semaines d'acclimatation (L'Honoré, comm. pers.).

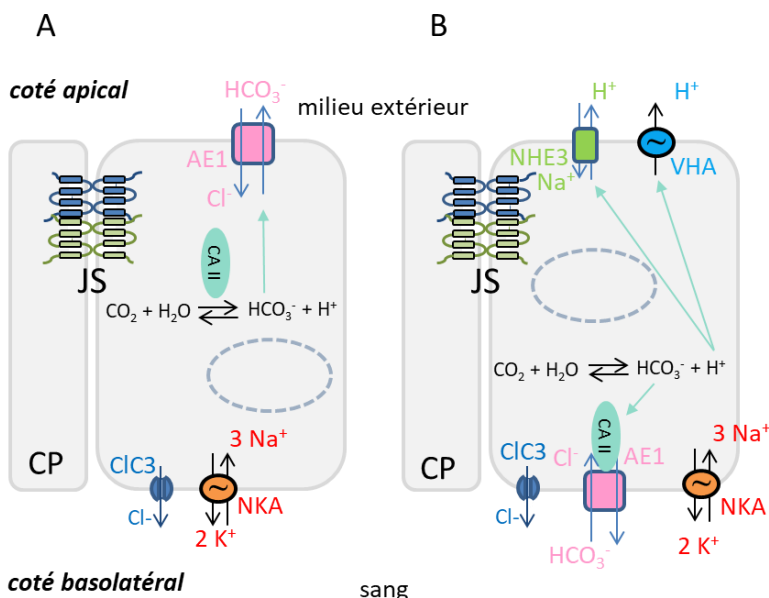
La surexpression dès 8 h, en condition hypotonique, des transcrits du gène *clc 3*, indique que la transcription des ARNm est rapidement activée suite à une diminution de l'osmolalité du milieu de culture. Nos résultats semblent donc cohérents avec l'hypothèse que le *clc 3* soit activé lors d'une baisse rapide de l'osmolalité sanguine suite à une dessalure. La rapidité de la réponse observée pour *clc 3* laisse penser que cette réponse est liée à son rôle dans le maintien du volume cellulaire. Un choc hypo-osmotique suite à une diminution de l'osmolalité du milieu induit au niveau de la cellule une entrée d'eau par le pôle apical, provoquant une augmentation de volume immédiate. Pour répondre, la cellule active un transport actif d'ions de la cellule vers le sang, suivi d'une sortie d'eau de la cellule par osmose : ce phénomène est appelé la régulation du volume cellulaire ou RVD (Regulatory Volume Decrease) et est essentiel pour l'intégrité des fonctions cellulaires (Duan et al., 2001; Vessey et al., 2004). Le transfert d'eau hors de la cellule s'effectue par osmose et est également facilité par la présence d'aquaporine 3 (AQP3), exprimée du côté basal des ionocytes du loup, notamment en eau douce (Giffard-Mena et al., 2008). Il a été démontré une augmentation de l'expression de *clc 3*, dans la membrane plasmique de certains types cellulaires de vertébrés, suite à un stress hypo-osmotique (Rossow et al., 2006; Vessey et al., 2004). Duan et al. (1999) ont montré que les canaux ClC 3 s'ouvrent

en réponse à un gonflement cellulaire par un mécanisme, sensible à l'osmolalité, de phosphorylation / déphosphorylation d'une sérine. La surexpression de *cic 3* observée en milieu hypotonique à 8 h pourrait donc faire partie des premières réponses permettant à la fois de réguler le volume des ionocytes, mais aussi d'absorber des ions vers le sang pour éviter une baisse trop importante de l'osmolalité sanguine. La protéine ClC 3 semble être présente dans les ionocytes en eau de mer et en eau douce afin de transporter les ions Cl<sup>-</sup> de la cellule vers le sang. Du point de vue ionique, ceci a moins de sens en eau de mer car les ionocytes doivent excréter des ions Cl<sup>-</sup> pour faire face à l'invasion ionique. Cependant, la présence de ClC 3 en milieu salé peut s'expliquer par le fait qu'en cas de diminution rapide de la salinité du milieu externe provoquant une diminution de l'osmolalité sanguine, ClC 3 est déjà présente et peut-être très rapidement activée.

#### II.5.4. La diminution de l'osmolalité induit une surexpression de *ae1 a*

Nous avons observé une augmentation des niveaux des transcrits de *ae1 a* suite à une diminution de l'osmolalité extracellulaire, significative en présence de prolactine à 0.1 µg.ml<sup>-1</sup> (Fig. 25 et Fig. 26). Nous n'avons pas observé de différence d'expression entre les osmolalités pour les transcrits d'*ae1 b* (non montré).

Chez les téléostéens, l'absorption de Cl<sup>-</sup> dans les branchies est effectuée via plusieurs protéines transmembranaires transporteuses d'ions impliquant un échangeur d'anions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> tel que AE1 (l'échangeur d'anions 1). AE1 transporte du Cl<sup>-</sup> du milieu extracellulaire vers la cellule en échange de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Evans et al., 2005; Gilmour et Perry, 2009). Sa localisation dans les ionocytes de l'épithélium branchial est donc déterminante pour son rôle dans l'absorption ionique (Fig. 27). Cependant, la localisation de cette protéine dans les ionocytes varie en fonction des espèces (Gilmour et Perry, 2009). Wilson et al. (2000, 2002) ont localisé la protéine AE1 au niveau de la surface apicale des ionocytes chez le tilapia du Mozambique et le saumon Coho (*Oncorhynchus kisutch*) et suggéré son rôle dans l'absorption du Cl<sup>-</sup>.



**Fig. 27 : Localisation apicale versus localisation basolatérale de l'échangeur AE1**

Schéma de ionocytes branchiaux en eau douce présentant la localisation apicale (A) ou basolatérale (B) de l'échangeur d'anions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> AE1. Selon les espèces, la protéine AE1 serait localisée apicalement ou basolatéralement, ce qui implique un rôle différent dans l'absorption de Cl<sup>-</sup>. L'anhydrase carbonique II est représentée sous ces 2 formes : cytosolique et membranaire. Abréviations : CP : cellule pavimenteuse, JS : jonction serrée, CA II : anhydrase carbonique 2, NKA : Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, NHE3 : échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, VHA : H<sup>+</sup>-ATPase, Clc 3 : canal à chlorure 3.

Par contre, chez le poisson lait, le medaka et le tétraodon vert, la protéine AE1 a été localisée, au niveau de la membrane basolatérale des ionocytes, en eau douce et en eau de mer (Hsu et al., 2014; Liu et al., 2016; Tang et al., 2011). Grâce à une technique de co-immunoprécipitation, Tang et Lee (2007a) ont mis en évidence l'interaction de l'anhydrase carbonique II (CA2) avec la protéine AE1 au niveau de la membrane basolatérale. La CA2 catalyse la conversion du dioxyde de carbone en  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{H}^+$ . Les ions  $\text{H}^+$  générés sont sécrétés apicalement via la pompe VHA ou un échangeur NHE tandis que AE1 transporte le  $\text{HCO}_3^-$  vers le sang en échange du  $\text{Cl}^-$ . Lee et al. (2010) ont également localisé au niveau basolatéral deux isoformes d'AE1 (zAE1a et zAE1b) dans les ionocytes de type « HR » du poisson-zèbre, important pour la sécrétion acide.

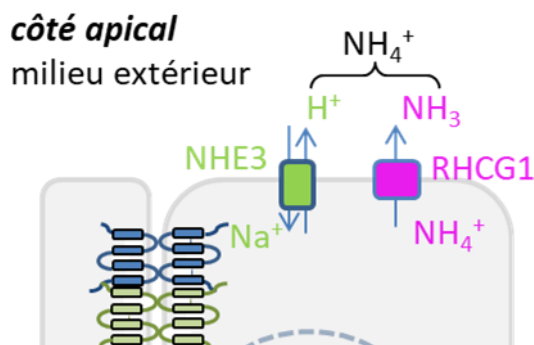
Contrairement à nos résultats *in vitro*, L'Honoré et al. (2020), n'ont pas observé chez le loup *in vivo* de différence significative d'expression des ARNm d'*ae1 a*, en fonction de la salinité. Tang et Lee (2007b) ont décrit dans une première étude chez le tétraodon vert une augmentation du niveau de la protéine AE1 chez les poissons acclimatés en eau douce par rapport à ceux en eau de mer, suggérant une implication dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$ . Puis dans une seconde étude, sur le poisson lait et le tétraodon vert, ils ont localisé la protéine AE1 au niveau de la membrane basolatérale des ionocytes branchiaux. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que pour ces deux espèces, AE1 pourrait ne pas être impliqué dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$  mais plutôt jouer un rôle dans la régulation acido-basique ou dans la modulation de l'homéostasie intracellulaire du  $\text{Cl}^-$  (Tang et al., 2011). Chez le poisson-zèbre, l'expression de l'ARNm d'*ae1* n'est pas affectée par une exposition à une eau douce faible en  $\text{Cl}^-$ , connue pour stimuler l'absorption de  $\text{Cl}^-$  (Hwang, 2009). Chez le medaka, deux homologues d'*ae1* sont présents et présentent *in vivo* des différences d'expression en fonction de la salinité. Les niveaux d'expression d'*ae1 a* augmentent significativement en même temps que la salinité tandis que les niveaux d'expression d'*ae1 b* diminuent avec la salinité (Liu et al., 2016).

Dans notre expérience, nous avons fixé les valeurs du pH des milieux d'incubation isotonique et hypotonique à 7,4. La tendance observée n'est donc pas induite par une variation de pH entre les milieux mais par une diminution de l'osmolalité extracellulaire. La réponse observée, est cohérente avec la nécessité pour l'épithélium branchial d'absorber des ions du milieu extérieur afin de compenser la perte de ces ions suite à un choc hypo-osmotique. De plus, il est largement admis que l'excrétion des ions  $\text{HCO}_3^-$  se produit en échange d'ions  $\text{Cl}^-$ , la régulation acido-basique étant étroitement liée à la régulation ionique (Claiborne et al., 2002; Evans et al., 2005; Marshall, 2002). Bien que la localisation d'AE1 chez le loup ne soit pas connue, ces résultats sont plutôt en faveur d'une localisation apicale. Une surexpression des transcrits de *ae1 a* en condition hypotonique, pourrait indiquer un rôle potentiel dans l'absorption de  $\text{Cl}^-$ , comme suggéré chez le tilapia du Mozambique et le saumon coho (Wilson et al., 2002, 2000). Dans le cas d'une localisation apicale, AE1 pourrait participer avec le CIC 3 à l'absorption du  $\text{Cl}^-$  à court terme. Dans le cas d'une localisation basolatérale, AE1 serait impliquée dans la régulation acido-basique, ce qui implique la présence d'une autre protéine présente dans la membrane apicale, responsable de l'absorption de  $\text{Cl}^-$ .

#### II.5.5. L'effet synergique de l'osmolalité et de la prolactine dans l'activation de *rhcg 1*

Un effet de l'interaction des deux facteurs a été détecté à la limite du seuil de significativité, suggérant un effet synergique de la diminution de l'osmolalité et de l'ajout de prolactine à forte dose dans le milieu sur l'expression de *rhcg 1* (Tableau 3).

Dans la première partie de ce mémoire nous avons montré que *rhcg1* est un acteur clé pour l'absorption des ions en eau douce. Nos résultats *in vitro* montrent le même schéma d'expression observé *in vivo* (Fig. 20) : la diminution de la salinité induit une surexpression de *rhcg1*. Comme indiqué dans l'introduction et dans le premier chapitre de ce mémoire, l'absorption de  $\text{Na}^+$  est facilitée du point de vue thermodynamique en présence de RHCG1 apical (Patricia A. Wright et Wood, 2009). Wu et al. (2010) ont proposé un modèle dans lequel RHCG1 apical intervient dans la déprotonation du  $\text{NH}_4^+$  intracellulaire et le piégeage d'acide au niveau de la membrane apicale. Le  $\text{NH}_3$  sécrété par RHCG1 se fixerait aux  $\text{H}^+$  libérés par NHE3 en échange de l'absorption de  $\text{Na}^+$  (Fig. 28).



**Fig. 28 : Fonctionnement du métabolite NHE3/RHCG1**

Représentation schématique selon l'hypothèse de Wu et al. (2010) du mécanisme de piégeage de l'acide au niveau de la membrane apicale dans un ionocyte de type eau douce. NHE3 : échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , RHCG1 : rhésus glycoprotéine,  $\text{NH}_4^+$  : ammonium,  $\text{NH}_3$  : ammoniac

Shih et al. (2012) ont démontré que l'expression de *rhcg 1* dans les branchies de poisson-zèbre adultes est significativement induite après acclimatation dans une eau pauvre en  $\text{Na}^+$ , soutenant que RHCG1 est impliqué dans le mécanisme d'absorption de  $\text{Na}^+$  dépendant du  $\text{NH}_4^+$ . Bien que nous n'ayons pas observé d'induction de l'expression de *nhe3*, la surexpression de *rhcg 1* en milieu hypotonique pourrait être la première réponse permettant ensuite au métabolite NHE3/RHCG1 d'agir pour permettre l'absorption de  $\text{Na}^+$  suite à une diminution de l'osmolalité. Pour tester cette hypothèse de manière plus approfondie, sur les cultures de filaments branchiales de loup, un milieu pauvre en  $\text{Na}^+$  aurait pu être préparé avec une osmolalité isotonique.

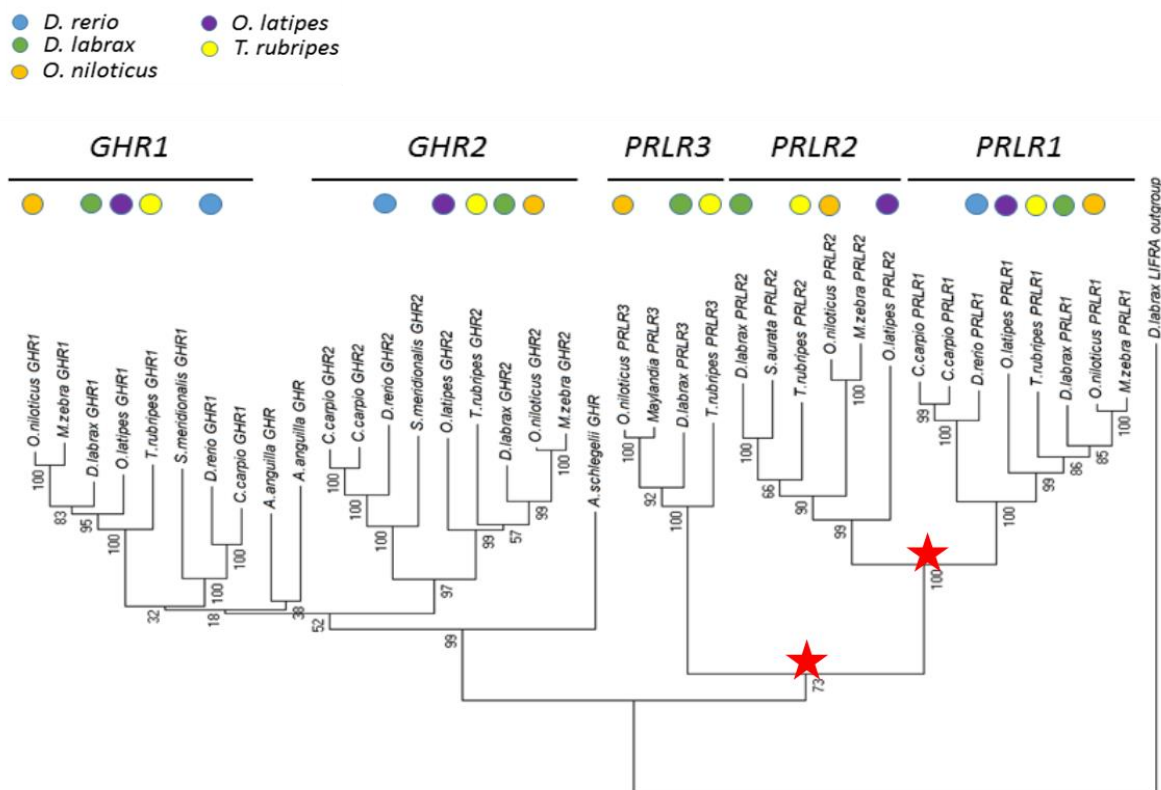
### II.5.6. Sensibilité différentielle des récepteurs à la prolactine aux stimuli osmotique et hormonal

Nos résultats indiquent qu'*in vitro* dans les filaments branchiaux de loup acclimatés en eau douce : 1) il n'y a pas d'effet de la diminution de l'osmolalité extracellulaire et de l'ajout de prolactine sur l'expression de *prlr 3* ; 2) que l'expression de *prlr 1* ne varie pas en fonction des variations de l'osmolalité extracellulaire mais augmente suite à l'ajout de prolactine à forte concentration ; et 3) que la diminution de l'osmolalité extracellulaire induit une sous-expression de *prlr 2*.

Peu d'espèces de téléostéens possèdent trois gènes distincts de récepteurs à la prolactine. C'est le cas pour le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et pour le fugu (Tine et al., 2014). La reconstruction phylogénétique des gènes des récepteurs à la prolactine et de l'hormone de croissance chez certaines espèces de téléostéens montre qu'un premier événement de divergence (étoiles rouges sur la Fig. 29) a conduit à la séparation des gènes *prlr* en deux clades distincts : *prlr 3* et *prlr 1-2*. Puis un second événement a provoqué la séparation du clade *prlr 1-2* en deux nouveaux clades constituant un groupe monophylétique partageant un ancêtre commun. Ces données indiquent que chez le loup, les gènes



*prlr 1* et *prlr 2* sont apparus après le gène *prlr 3* et que le loup en a conservé une copie dans son génome. Dans notre analyse, l'absence de réponse de *prlr 3* à un stimulus osmotique et/ou hormonal est peut-être dû au fait que *prlr 3* pourrait coder pour une protéine remplissant une fonction biologique différente ou être régulé par un autre paramètre et induire une autre voie de signalisation.



**Fig. 29 : Position des gènes des récepteurs de la prolactine (PRLR) et de l'hormone de croissance (GHR)**

Reconstruction phylogénétique des gènes de la famille des somatotropines. Le gène du récepteur de la prolactine (PRLR) est dupliqué chez la plupart des espèces de téléostéens. Cependant, une copie supplémentaire de l'homologue de type PRLR est présente chez le loup, le fugu (*Takifugu rubripes*), le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et chez certains cichlidés. Les étoiles rouges représentent les événements de divergences menant à l'apparition successive des trois clades de récepteurs à la prolactine chez le loup. Modifié d'après (Tine et al., 2014).

Nos résultats indiquent que l'expression des deux récepteurs *prlr 1* et *prlr 2* est activée par l'ajout de prolactine dans le milieu, suggérant la liaison entre la prolactine ovine et les récepteurs transmembranaires de la prolactine chez le loup. La réponse observée par *prlr 1* semble être davantage induite par un effet de dose à forte concentration ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) que par des changements d'osmolalité sanguine. Au contraire, l'expression de *prlr 2* semble être davantage activée par des variations de l'osmolalité que par l'ajout de prolactine. Fait intéressant, nos résultats sont en partie concordants avec une étude récente réalisée *in vivo* sur des loups acclimatés à l'eau douce pendant 2 semaines. Dans cette étude, *prlr 1* ne montre pas de différence significative d'expression suite au transfert en eau douce mais une tendance à l'augmentation. De plus, l'expression de *prlr 2* diminue chez les loups acclimatés à l'eau douce (L'Honoré et al., 2020).

Chen et al. (2011) ont démontré *in vitro* que les deux récepteurs de la prolactine chez le poisson-zèbre peuvent réguler la transcription de gènes cibles distincts lors de la liaison avec la prolactine, suggérant les fonctions biologiques différentes de *prlr 1* et *prlr 2*. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les deux protéines PRLR chez les téléostéens partagent de très faibles similitudes en acides aminés (environ 30%), principalement en raison de différences dans le domaine intracellulaire (Huang et al., 2007).

De précédentes études *in vivo* chez le tilapia du Mozambique ont rapporté que l'expression de *prlr 1* branchial diminue suite à un transfert de l'eau douce vers l'eau de mer et augmente suite à un transfert de l'eau de mer vers l'eau douce (Breves et al., 2011, 2010). Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence, car l'article ne mentionne pas d'identifiants (numéro d'accès dans les bases de données telles que Genbank ou Ensembl) pour les deux gènes. Il est donc possible que le gène nommé « *prlr 1* » dans cette étude ne soit pas l'homologue du gène *prlr 1* chez le loup. Dans une autre étude sur le tilapia du Mozambique, il a été démontré que *prlr 1* dans l'hypophyse ne répond pas aux transferts de salinité *in vivo* ou aux changements de l'osmolalité extracellulaire *in vitro* (Seale et al., 2012a). Cependant, les réponses observées dans l'hypophyse peuvent être différentes de celles observées dans les branchies. Inversement l'expression de *prlr 2*, augmente de façon transitoire dans les branchies de tilapia du Mozambique transférés de l'eau douce à l'eau de mer (Fiol et al., 2009).

Dans leur étude *in vitro*, Inokuchi et al. (2015), ont rapporté qu'une incubation des filaments branchiaux de tilapia du Mozambique dans un milieu hyper-osmotique ( $480 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) provoque l'augmentation de l'expression de *prlr 2*, tandis que l'expression de *prlr 1* ne varie pas en fonction des conditions osmotiques. En accord avec les résultats d'Inokuchi et al. (2015), l'expression de *prlr 1* chez le loup ne semble pas significativement affectée par les variations des conditions osmotiques. Inokuchi et al. (2015) ont émis l'hypothèse que *prlr 2* pourrait jouer un rôle important dans la réponse initiale suite à une augmentation de l'osmolalité externe. Nos observations montrent que chez le loup, *prlr 2* est également rapidement activé mais dans le cas présent, après une diminution de l'osmolalité extracellulaire. Chez le tilapia du Mozambique et le pagre à tête noire (*Acanthopagrus schlegeli*), l'expression des transcrits de *prlr 1* et *prlr 2* dans les branchies est différenciellement influencée par des stimuli osmotiques et endocriniens (Breves et al., 2011; Fiol et al., 2009; Huang et al., 2007). Nos résultats mettent également en évidence *in vitro* une réponse différentielle des récepteurs à la prolactine aux stimuli osmotique et hormonal. *Prlr 2* pourrait jouer un rôle dans la réponse rapide, suite à un stress hypo-osmotique et *prlr 1* un rôle dans la réponse à plus long terme, dont l'expression serait activée par une augmentation du niveau de prolactine.

#### II.5.7. Méthodes d'incubation

Dans un système d'incubation de tissus *in vitro*, le milieu de culture est le facteur le plus important et le plus difficile à maîtriser pour maintenir les tissus dans un bon état physiologique. Il doit répondre aux besoins nutritionnels et avoir un pH et une osmolalité adaptés au type de tissus cultivés (Waymouth, 1972). L'augmentation des CP observée après 8 h d'incubation pour l'ensemble des transcrits traduisant la baisse d'expression de l'ensemble des ARNm, pourrait peut-être être due à une dégradation des conditions de culture. Il se peut qu'après 8 h d'incubation le milieu de culture n'offre plus les conditions optimales pour maintenir les cellules dans un bon état physiologique. Il est alors impossible de quantifier l'effet de cette dégradation potentielle et de la soustraire à la réponse biologique que l'on souhaite mesurer. Bien que l'expression des niveaux de transcrits ait été normalisée par rapport aux gènes de référence, nous avons jugé préférable de ne pas comparer les durées d'incubation entre elles. Il aurait été intéressant d'évaluer l'état physiologique des ionocytes, en mesurant leur intégrité membranaire par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) après 8 h d'incubation. On peut également réaliser un marquage immunofluorescent de la NKA pour localiser les ionocytes et ainsi suivre leur densité, leur prolifération et/ou leur maintien durant l'expérimentation. Si l'expérience devait être répétée, on pourrait éventuellement améliorer la survie des cellules en remplaçant l'immersion de fragments de branchies dans les milieux expérimentaux par une perfusion des branchies avec ces milieux.

## II.6. Conclusion

Dans cette étude nous avons mis en évidence l'existence d'une régulation de l'expression de certains transporteurs ioniques par l'osmolalité extracellulaire, indépendante d'un contrôle hormonal par le système endocrinien (Fig. 30). Les transcrits d'*ae1 a* et de *clc 3* sont activés par la diminution de l'osmolalité pour répondre à la nécessité de maintenir l'intégrité des cellules et pour assurer l'absorption de Cl<sup>-</sup>. *Rhcg 1* semble répondre à la fois à la diminution de l'osmolalité et à l'ajout de prolactine à forte dose, peut-être pour augmenter la capacité des ionocytes à absorber du Na<sup>+</sup>. Nous avons également mis en évidence une réponse différentielle des récepteurs à la prolactine chez le loup. Notre hypothèse est que la transcription du gène *prlr 1* est principalement activée par la prolactine et ne dépend pas de l'osmolalité, tandis que la transcription du gène *prlr 2* est inhibée par une diminution de l'osmolalité et ne répond à la prolactine qu'à forte dose. Bien que nous ayons mis en évidence un effet direct de la diminution de l'osmolalité sur les effecteurs du transport ionique, la prolactine est indispensable à la survie en eau douce comme démontré par les anciens travaux de Pickford et Phillips (1959) sur l'hypophysectomie du choquemort exposé à l'eau douce. La modulation de l'expression des transporteurs ioniques induite par une osmolalité hypotonique peut être impliquée dans la réponse initiale des ionocytes branchiaux à une diminution de l'osmolalité extracellulaire et être ensuite complétée par l'action de la prolactine.

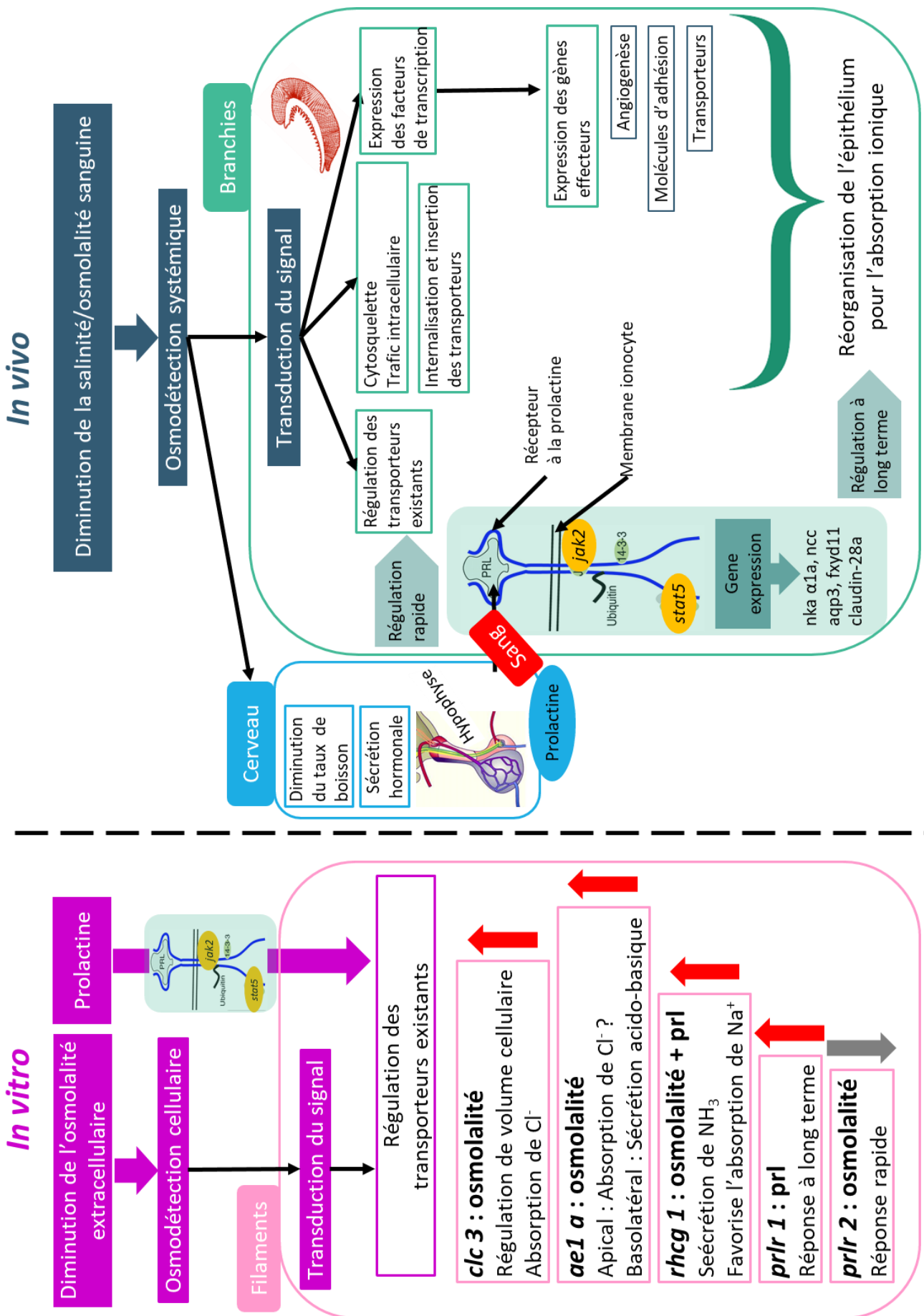


Fig. 30 : Synthèse des processus de régulation ionique *in vivo* et *in vitro* dans les branchies

### III. La salinité, un marqueur épigénétique ?

---

L'analyse fonctionnelle des données du séquençage du génome du loup après traitement au bisulfite a fait l'objet d'un stage d'une durée de 6 mois, durant lequel, j'ai co-encadré Ghizlane Banousse étudiante en 2<sup>ème</sup> année du Master de Biologie intégrative et physiologie de l'Université de la Sorbonne.

#### III.1. Introduction

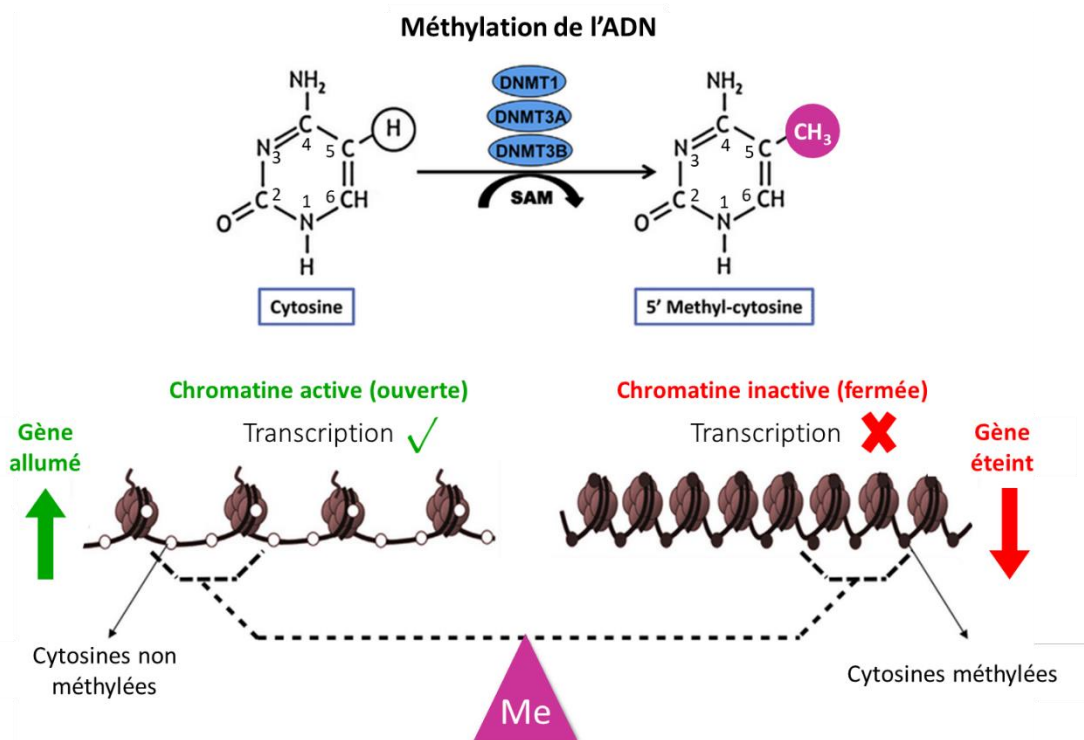
De plus en plus d'études suggèrent que les stimuli environnementaux contribuent aux variations phénotypiques par des changements dans la méthylation de l'ADN (Li et al., 2017a, 2017b). Plusieurs travaux sur des marqueurs épigénétiques ont démontré leur rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes (Ansel et al., 2003; Holliday, 2006).

Les recherches sur l'effet de facteurs environnementaux sur les marqueurs épigénétiques ont considérablement augmenté. Cependant, la plupart d'entre elles s'intéressent principalement à l'efficacité alimentaire, le métabolisme énergétique et le niveau de consommation d'oxygène (Li et al., 2017a). Il existe peu d'études sur la modification épigénétique régulant l'expression des gènes en réponse à un changement de salinité chez les poissons. Le maintien de l'équilibre hydrominéral, représente une contrainte majeure pour la survie et le développement des poissons et peut contribuer à la variation phénotypique, potentiellement liée à des changements de méthylation.

##### III.1.1. Biologie de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN fait partie des nombreux mécanismes contrôlant et modulant l'expression des gènes à travers la structure de la chromatine (Andersen et Tost, 2018). C'est une modification post-réplication, dans laquelle un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) est ajouté à la position cinq du cycle pyrimidine d'une cytosine (5mC) par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) (Fig. 31) (Rottach et al., 2009). Dans les cellules eucaryotes, la majorité des cytosines sont méthylées au niveau des dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG), ce qui entraîne une méthylation complémentaire des motifs CpG sur les deux brins d'ADN, aussi bien au niveau des promoteurs, des régions intergéniques ou intragéniques. On retrouve souvent des zones non méthylées, riche en CpG, dans le génome au niveau des régions promotrices et du premier exon. Ces zones sont appelées îlots CpG et sont définies par un taux de plus de 55 % de CpG et une taille minimum de 500 paires de bases (pb) (Takai et Jones, 2002).

La méthylation de l'ADN est un "interrupteur épigénétique" qui régule l'équilibre entre la forme ouverte et fermée de la chromatine en modifiant les interactions entre l'ADN et les protéines. L'ajout de groupe méthyle, accompagné de modifications des histones, provoque un changement de conformation de la chromatine qui passe d'un état ouvert à fermé. L'ADN est moins accessible à la machinerie transcriptionnelle, ce qui rend les gènes « silencieux » (Agrawal et al., 2018; Ziller et al., 2013). L'ajout ou le retrait de ces groupements méthyles peut survenir de manière dynamique en réponse aux changements de l'environnement (Boyko et al., 2010; Cooney et al., 2002; Kucharski et al., 2008).



**Fig. 31 : Interaction entre la méthylation de l'ADN, la transcription des gènes et la structure de la chromatine**  
 Le processus de méthylation de l'ADN implique le transfert d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) de la S-adosylméthionine (SAM) sur la position du 5<sup>ème</sup> carbone de la cytosine, catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT). Schéma modifié d'après (Agrawal et al., 2018).

Les modèles de méthylation de l'ADN varient considérablement en fonction des espèces (Feng et al., 2010). Certaines espèces, comme la drosophile *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans* sont pratiquement dépourvues de méthylation de l'ADN (Gowher et al., 2000; Simpson et al., 1986). En revanche, chez les vertébrés, 60 à 80 % des sites CpG sont méthylés et le génome est globalement méthylé dans le sens où toutes les catégories de la séquence ADN (régions inter et intragéniques) sont des cibles pour la méthylation de l'ADN. Les sites CpG sont répartis de façon hétérogène dans le génome mais sont enrichis dans les îlots CpG qui recouvrent partiellement les régions promotrices et/ou le premier exon de 40 % de l'ensemble des gènes constitutifs des mammifères. La localisation des îlots CpG au niveau des promoteurs et à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS), montre l'importance de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes.

### III.1.2. Rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes

Les cytosines méthylées sont associées à de la chromatine condensée pouvant empêcher la fixation des facteurs de transcription. L'ARN polymérase (ARN pol II) ne peut pas se fixer sur l'ADN pour synthétiser l'ARN messager (ARNm). A l'inverse une importante densité de sites CpG non méthylés est en général accompagnée par l'ouverture de la chromatine, permettant l'initiation de la transcription (Banovich et al., 2014; Chodavarapu et al., 2010). Des niveaux élevés de méthylation au niveau du promoteur d'un gène sont souvent associés à une répression de la transcription (Li et Zhang, 2014).

La méthylation de l'ADN est plus répandue dans le corps des gènes que dans les promoteurs et une corrélation positive a été démontrée entre la méthylation du corps des gènes et l'expression génique



(Ball et al., 2009; Jjingo et al., 2012; Yang et al., 2014). Il a également été démontré une corrélation négative entre la méthylation de l'ADN du 1<sup>er</sup> exon et du 1<sup>er</sup> intron avec l'expression des gènes quels que soient les tissus et les espèces (Anastasiadi et al., 2018; Jo et Choi, 2019). Ces études suggèrent que la méthylation de l'ADN d'éléments régulateurs distaux ou intragéniques avec différents degrés de densité de CpG est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes et que la méthylation de l'ADN a un double rôle, à la fois inhibiteur et inducteur, selon la région génomique.

Plusieurs travaux chez les téléostéens montrent une importance fonctionnelle de la méthylation de l'ADN au cours du développement et en relation étroite avec les conditions du milieu. Chez le carreau hirme (*Paralichthys olivaceus*), des différences du niveau de méthylation des promoteurs pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes du déterminisme sexuel chez les poissons (Wen et al., 2014). Lors de l'exposition de poisson-zèbre adultes à des œstrogènes, le niveau de méthylation dans la région 5' UTR du gène de la vitellogénine (*vtg1*) a diminué, entraînant une surexpression du gène (Strömqvist et al., 2010). Chez le loup, une étude a démontré que la méthylation de l'ADN est influencée par la température. Sous un stress thermique, la méthylation du promoteur du gène de l'aromatase (*cyp19a*) a induit une diminution de son expression. Navarro-Martín et al. (2011) ont constaté que la méthylation de l'ADN influencée par la température peut entraîner des changements de sex-ratio chez le loup. Varriale et Bernardi (2006) ont également découvert que parmi les poissons de l'Antarctique, les *Channichthyidae* (les poissons de glace, dépourvus d'hémoglobine) ont un niveau de méthylation plus élevée que les poissons des régions tempérées. Ils suggèrent l'existence d'une relation inverse entre la méthylation de l'ADN et la température corporelle. Peu d'études se sont intéressées à la méthylation de l'ADN en fonction de la salinité. Des changements significatifs dans la méthylation de l'ADN en réponse à la salinité ont été détectés chez l'épinoche (Metzger et Schulte, 2018). Certaines modifications ont été identifiées sur des gènes impliqués dans la régulation ionique (la pompe à calcium *atp2b4*, le cotransporteur *ncc* (*slc12a3*) et le cotransporteur *nkcc2* (*slc12a1*). Ces données suggèrent que des changements dans la méthylation de l'ADN pourraient jouer un rôle dans la transition entre les environnements marin et d'eau douce.

### III.2. Objectif

La capacité de tolérer le stress de salinité varie entre les espèces et au sein même de l'espèce. C'est également le cas pour notre modèle biologique, le loup, qui présente une réponse différentielle au stress hypo-osmotique. Individuellement, les loups répondent différemment à la diminution de la salinité, ce qui suggère une variabilité intraspécifique. Le loup est donc un bon modèle pour étudier la plasticité phénotypique et la méthylation de l'ADN est un outil particulièrement adapté pour tenter de comprendre les mécanismes de l'acclimatation à une diminution de salinité environnementale. Cette étude a pour objectif d'étudier les profils de méthylation de l'ADN chez le loup soumis à une diminution de salinité, en particulier pour les fonctions assurées par les branchies et plus particulièrement l'osmorégulation. Dans cette étude, un focus sera porté sur l'effet de la dessalure sur les profils de méthylation de l'ADN dans un contexte CpG. *In fine*, l'objectif sera de comparer le méthylome et le transcriptome pour tenter d'établir une relation entre méthylation de l'ADN et régulation de l'expression génique. Dans ce mémoire, les résultats présentés concernent uniquement l'analyse du méthylome.

### III.3. Matériel et Méthodes

#### III.3.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental de ce chapitre est identique à celui schématisé dans la Fig. 17, et présenté dans la partie Matériel et Méthodes de la partie 2 (II.3.1 Protocole expérimental) page 40.

Après 2 semaines d'exposition à l'eau douce, cinq poissons de chaque groupe ont été sacrifiés par dose létale d'anesthésiant (100 ppm de benzocaïne). Les arcs branchiaux du côté gauche ont été prélevés pour l'analyse épigénétique et les arcs branchiaux du côté droit prélevés en prévision de l'analyse transcriptomique. Les branchies ont été immédiatement immergées dans du RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, EUA) puis stockées à -80 °C jusqu'à l'extraction des acides nucléiques.

#### III.3.2. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir de 30 mg de tissus branchial des loups, à l'aide du kit LEV Blood DNA Kit et du robot d'extraction Maxwell<sup>®</sup> 16 (Promega, Madison, WI, EUA). Une première étape de broyage mécanique a été réalisée à l'aide du vibro-broyeur MM 400 (Retsch technology, Haan, Allemagne). Les branchies ont été homogénéisées par l'action combinée de deux billes d'acier inoxydables de 4 mm de diamètre et de 300 µl de tampon de lyse pendant 1 minute, avant d'être centrifugées pendant 10 secondes. Une incubation du broyat à 56°C pendant 30 minutes avec 20 µl de protéinase K a été effectuée afin de digérer les protéines. Le mélange a ensuite été déposé dans le premier puit de la cartouche du kit, qui a été insérée dans le robot d'extraction pour une durée de 45 minutes. La quantité et la pureté de l'ADNg extrait ont été mesurées grâce au spectrophotomètre NanoDrop<sup>™</sup> One (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) par la mesure des rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm. Une seconde mesure de la concentration a été réalisée grâce à l'utilisation du kit Qubit<sup>™</sup> dsDNA BR Assay et du fluorimètre Qubit<sup>™</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

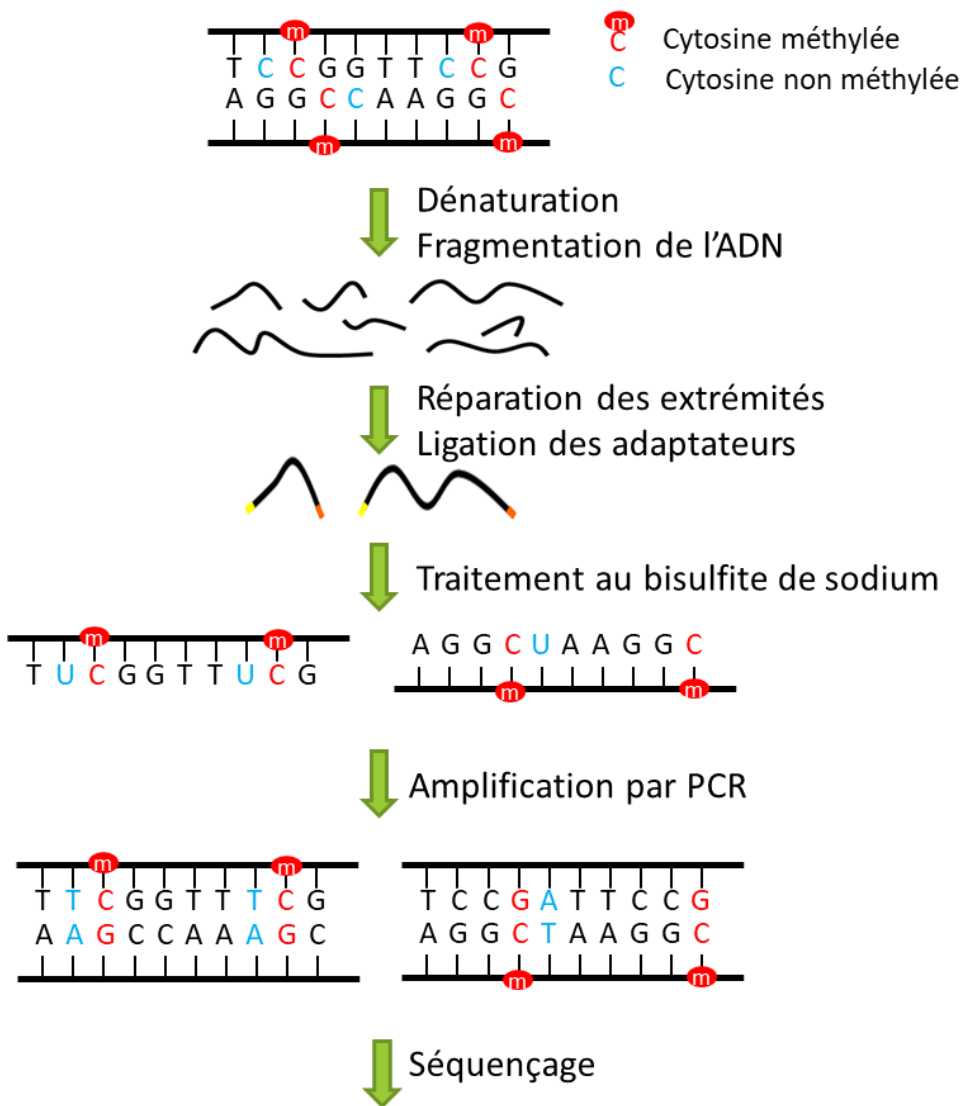
#### III.3.3. Extraction des ARN

L'ARN total a été extrait à partir de 30 mg de branchies provenant du côté gauche des loups, à l'aide du kit d'extraction sur colonnes Nucleospin<sup>®</sup> RNA (Machery-Nagel, Allemagne), en suivant les indications du fabricant. La quantité et la pureté des ARN extraits ont été mesurées grâce au spectrophotomètre NanoDrop<sup>™</sup> One (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) par la mesure des rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm. L'intégrité des ARN a été évalué à l'aide du Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). Le RIN « number RNA integrity » était supérieur à 9,7 pour les 15 échantillons.

#### III.3.4. Séquençage du génome après traitement au bisulfite de sodium

L'intérêt du séquençage du génome après traitement au bisulfite de sodium (WGBS) est qu'il permet d'étudier les profils de méthylation du génome avec une résolution à l'échelle de la base (Gu et al., 2011). Dans cette méthode, l'ADN génomique est purifié puis fragmenté. Les extrémités 3' des fragments sont réparées grâce à l'ajout de bases adénines puis des adaptateurs sont ligaturés aux deux extrémités. La taille des fragments est sélectionnée avant le traitement au bisulfite de sodium. Les fragments d'ADN génomique sont traités avec du bisulfite de sodium, qui désamine la cytosine en uracile. Après dénaturation du double brin d'ADN, les cytosines de chaque brin d'ADN sont converties

en uracile puis reconnues comme thymine dans l'amplification et le séquençage PCR ultérieurs (Fig. 32). La désamination est bloquée par la présence de méthylation qui peut alors être déduite par l'identification de résidus cytosines non convertis (Frommer et al., 1992). Cette modification de base peut être identifiée par les technologies de séquençage haut-débit en comparant les séquences générées avec un génome de référence, permettant d'identifier les sites de méthylation dans une condition donnée. Après extraction de l'ADN génomique, les échantillons ont été envoyés à Genome Quebec (<http://www.genomequebec.com>) qui a réalisé les bibliothèques d'ADN avec conversion au bisulfite pour l'identification des sites de méthylation. Les bibliothèques ont été séquencées en format paillé (paired-end) et des lectures de 150 bases ont été effectuées grâce au séquenceur HiSeq4000 (Illumina, San Diego, CA, EUA).



**Fig. 32 : Principe général du séquençage haut-débit après traitement au bisulfite**

Dénaturation : séparation des deux brins d'ADN. Traitement au bisulfite : conversion des cytosines non méthylées (bleues) en uraciles ; les cytosines méthylées (rouges) restent inchangées. Amplification par PCR des séquences traitées au bisulfite résultant en quatre brins distincts. Abréviation : PCR, polymerase chain reaction.

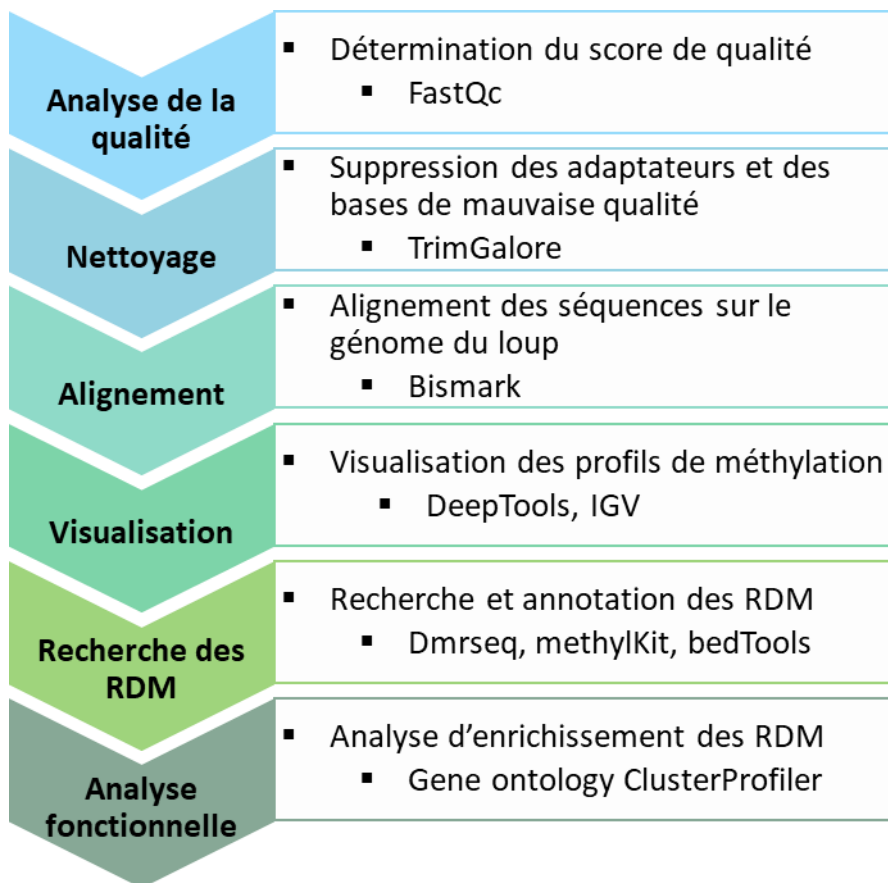


Fig. 33 : Pipeline d'analyses bio-informatiques pour l'analyse des données du séquençage WGBS

### III.3.5. Analyses des données du séquençage

#### III.3.5.1. Qualité, alignement et visualisation

Les analyses de données ont été réalisées sur la plateforme en ligne pour les analyses bioinformatiques Galaxy (Afgan et al., 2016). Un rapport de la qualité des séquences a été généré à l'aide du programme FastQC (Andrews, 2010) (Fig. 33). La qualité des fragments séquencés (reads en anglais) est estimée par la mesure d'un score noté Q. Les séquences sont habituellement considérées de bonne qualité quand leur score est supérieur à 30. Les séquences ayant un score (Phred) inférieur à 20 (sur une échelle de 0 à 40) et les séquences correspondant aux adaptateurs utilisés lors du séquençage Illumina ont été supprimées, grâce au logiciel Trim Galore (Krueger, 2012). Les séquences nettoyées ont ensuite été alignées sur le génome du loup (Tine et al., 2014), grâce au logiciel Bismark (Krueger et Andrews, 2011). Afin de contrôler l'efficacité du traitement au bisulfite, la conversion des cytosines (C) non méthylées en tyrosine (T) a été examinée. Le taux de conversion du bisulfite est déterminé en partant du principe que chaque C hors contexte CpG (CHH et CHG, où H est A, T ou C) est converti en T. Le taux correspond à la somme des C non méthylées (T) hors contexte CpG divisé par la somme des C méthylées et des C non méthylées (T) hors contexte CpG. Les fichiers de format BAM résultant de l'alignement sont converti au format WIG grâce à l'outil MethylExtract (Barturen et al., 2013) pour permettre la visualisation des niveaux de méthylation des génomes du loup avec l'outil IGV (Integrative Genomics Viewer) (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

### III.3.5.2. Tracé des profils de méthylation

Afin d'identifier les zones enrichies de la méthylation, les profils des niveaux moyens de la méthylation de l'ADN sont tracés selon les positions génomiques. Pour cela les fichiers BAM sont préalablement convertis en fichiers BigWig à l'aide du script DeepTools « bamCoverage » sous Linux, en utilisant les paramètres par défaut (<https://deeptools.readthedocs.io/>) (Ramírez et al., 2016). A partir de ces fichiers, une matrice est générée à l'aide du script DeepTools « computeMatrix » avec le mode « scale-region » pour mettre tous les gènes à la même échelle, soit une longueur de 1600 pb (longueur moyenne des gènes du loup). Les sites des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription (TSS et TES, respectivement) sont également alignés. Afin de visualiser les profils au niveau du promoteur et de l'extrémité 3' UTR des gènes, 2000 pb ont été ajoutées à chaque extrémité du corps des gènes. Les profils sont ensuite obtenus grâce à la commande « plotProfile » de DeepTools.

### III.3.5.3. Analyse globale des profils de méthylation

Les fichiers BAM sont également convertis en fichier TAB par MethylExtract afin de pouvoir être lu par le package methylKit de R pour l'analyse globale des données du séquençage (Akalin et al., 2012). Une première étape de filtration, est réalisée, afin de supprimer les bases ayant une faible couverture (inférieure à 10 séquences) et celles au contraire ayant une très grande couverture (99% de séquences). Une analyse de regroupement hiérarchique a été réalisée selon les similitudes des profils de méthylation des échantillons. Une matrice de corrélation des distances a été générée avec la méthode Pearson puis le regroupement a été réalisé selon la méthode Ward.

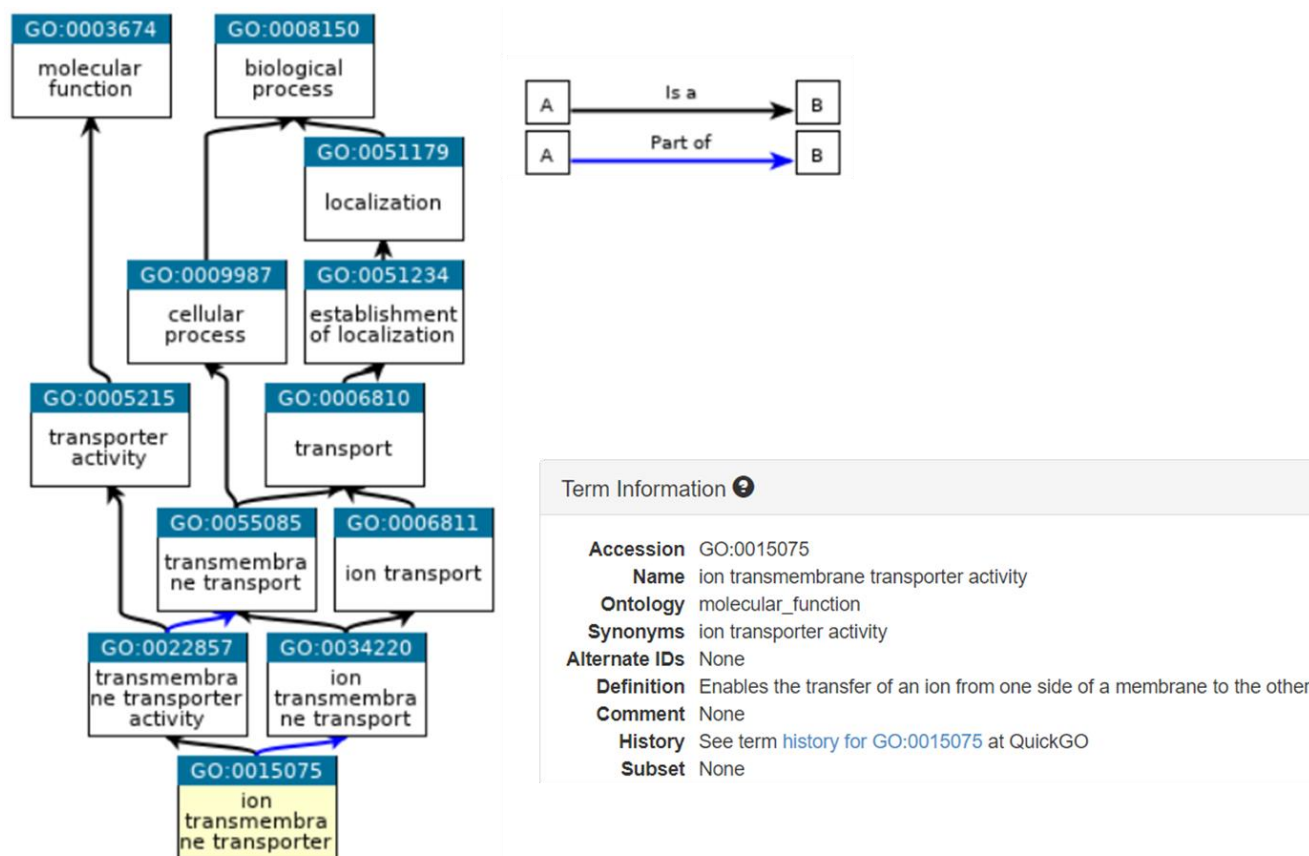
### III.3.5.4. Analyse ciblée des régions différenciellement méthylées

L'analyse des régions différenciellement méthylées (RDM) entre les conditions a été réalisée grâce au package DMRseq (Korthauer, 2017). Les RDM ont été déterminées par comparaison entre les échantillons, ED *versus* EM. Une région est considérée comme différenciellement méthylée entre les deux conditions, à partir de 25 % de différence. Le résultat de l'analyse de DMRseq fournit une valeur « beta » positive ou négative, correspondant respectivement à une hyper- et hypométhylation. La valeur de « beta » est associée à une valeur « p » statistique, indiquant le niveau de significativité des RDM au seuil de 0,05. Les niveaux de méthylation par chromosome ont été calculés à partir du fichier de sortie DMRseq, par comptage d'après les coordonnées génomiques des groupes de liaisons (chromosomes). Les positions des RDM au niveau des gènes et des promoteurs sont déterminées par croisement du fichier d'annotation du génome du loup avec le fichier de sortie de l'analyse des RDM, grâce à la fonction « intersect » du programme BEDtools (Quinlan, 2014). Nous avons sélectionné les RDM localisées à l'intérieur des gènes (corps de gène ou gene body en anglais) et sur les promoteurs dont les positions ont été définies, à + 2000 paires de bases (pb) en amont du site du signal d'initiation de la transcription (TSS).

### III.3.5.5. Annotation fonctionnelle

Suite à l'identification des positions des RDM sur les promoteurs ou portions de gènes codant pour des protéines, les fonctions biologiques de ces séquences ont été déterminées grâce à une annotation fonctionnelle. Des analyses de la distribution et de l'enrichissement de ces annotations ont ensuite été réalisées. Afin de procéder à l'annotation, les identifiants des RDM ont été convertis au format « Entrez Gene » de la base de données NCBI (Maglott et al., 2011). Le format de ces identifiants (GeneID) uniques et spécifiques à une espèce, est utilisé dans la plupart des programmes d'annotation fonctionnelle. Le

loup n'étant pas une espèce modèle, une étape de conversion a été nécessaire. Pour cela les identifiants des RDM, sous la forme des symboles des noms des gènes du loup, ont été convertis en identifiants « Entrez Gene » de la souris (*Mus musculus*) grâce à l'outil en ligne MouseMine (Motenko et al., 2015). Une fois les identifiants obtenus, les analyses d'annotation fonctionnelle ont été réalisées grâce au package R clusterProfiler prenant en charge les bases de données des organismes modèles (Yu et al., 2012). Une première analyse d'ontologie génétique (Gene Ontology, <http://geneontology.org/>) a été effectuée, afin d'associer les fonctions biologiques des RDM aux trois catégories : fonctions moléculaires (MF), compartiments cellulaires (CC) et processus biologiques (BP). Ces associations sont résumées sous la forme d'un « GO term » (Fig. 34).



**Fig. 34 : Exemple d'arborescence pour la sous-catégorie « ion transmembrane transporter »**

Détails des niveaux hiérarchiques du « GO term » « ion transmembrane transporter » de la catégorie fonctions moléculaires. Les flèches bleues et noires indiquent les relations entre les catégories. Source : <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>



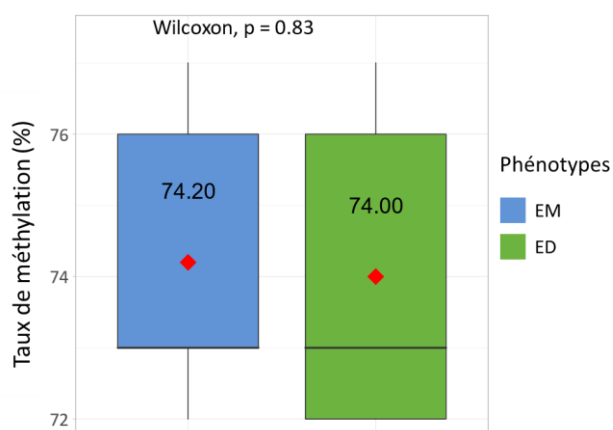
### III.4. Résultats

#### III.4.1. Données statistiques du séquençage

**Tableau 4 : Résumé statistique des données du séquençage**

Abréviations : C, cytosines ; CpG : dinucléotides cytosine-phosphate-guanine ; CHH, CHG : dinucléotides où H est A, T ou C

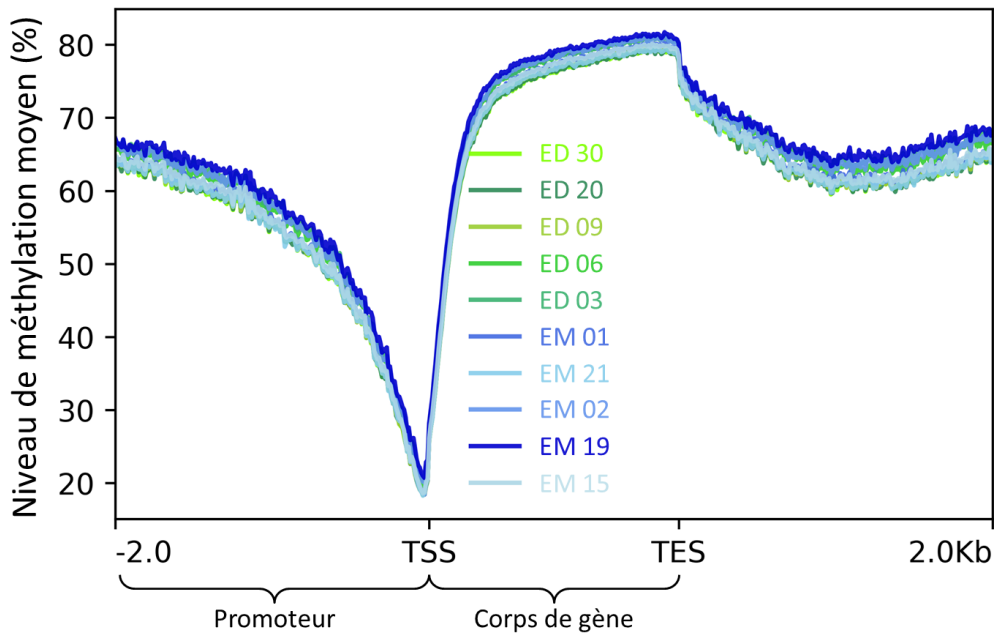
Echantillons	Nb séquences brutes	Nb séquences nettoyées	Contrôle qualité %	Efficacité alignement %	Nb total de C	C méthylées CpG %	C méthylées CHH, CHG %	Conversion bisulfite %
ED-20	133850199	133699582	99,9%	74,5%	5471425495	71,8%	0,4%	99,6%
ED-03	113428398	113367791	99,9%	74,1%	4201371933	76,6%	1,3%	98,7%
ED-30	116602366	116484290	99,9%	75,9%	4765953027	73,0%	0,5%	99,5%
ED-06	135278081	135205660	99,9%	75,6%	5251575173	76,0%	0,7%	99,3%
ED-09	132967055	132786281	99,9%	76,1%	5577360963	71,8%	0,4%	99,6%
EM-01	128021239	127859024	99,9%	76,3%	5283353049	73,4%	0,4%	99,6%
EM-02	117069463	117003510	99,9%	74,7%	4530698642	75,9%	0,9%	99,1%
EM-15	112779755	112650811	99,9%	76,3%	4649274452	73,2%	0,5%	99,5%
EM-19	113514609	113447986	99,9%	74,6%	4220130235	77,0%	1,2%	98,8%
EM-21	102274332	102163208	99,9%	76,1%	4232911640	72,4%	0,4%	99,6%
<b>Moy</b>	<b>120578549</b>	<b>120466814</b>	<b>99,9%</b>	<b>75,4%</b>	<b>4818405461</b>	<b>74,1%</b>	<b>0,7%</b>	<b>99,3%</b>



**Fig. 35 : Niveau global de méthylation de l'ADN**

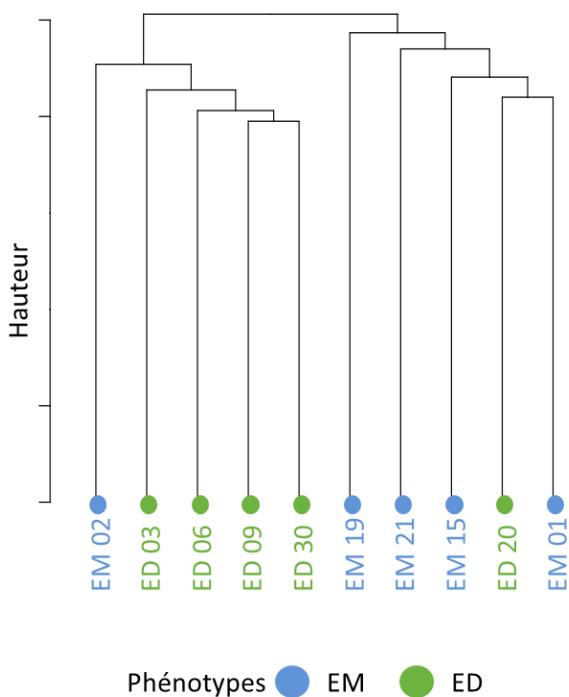
Les niveaux de méthylation sont exprimés en pourcentage et correspondent à la moyenne des niveaux de méthylation de l'ADN dans un contexte CpG, de cinq échantillons de branchies des phénotypes EM (bleu) et ED (vert). Abréviations : EM, eau de mer ; ED, eau douce. Test de Wilcoxon, N=5.

Entre 100 et 135 millions de séquences par échantillon ont été générées à partir du séquençage du génome après traitement au bisulfite (Tableau 4). Après la suppression des séquences de mauvaise qualité (score < 20) et des séquences des adaptateurs, 99 % des séquences soit environ 90 millions de séquences uniques par échantillon ont été alignées sur le génome du loup avec une efficacité moyenne de 75 %. Les niveaux de méthylation ont été observés dans différents contextes de séquence : CpG et hors CpG. Le nombre total de cytosines méthylées dans le contexte CpG représente en moyenne 74 % des cytosines, tandis que les niveaux de méthylation dans les contextes CHG et CHH atteignent 0,7 %. Le taux de conversion des cytosines non méthylées en tyrosine est en moyenne de 99,3 %.



**Fig. 36 : Profils de méthylation de l'ADN en fonction des positions génomiques**

Profils de méthylation de l'ADN pour les cinq individus de chaque phénotype, au niveau des gènes avec une longueur moyenne de 1600 b  $\pm$  2 Kb, comprenant le promoteur -2 Kb en amont du signal d'initiation de la transcription (TSS) et la région 3' UTR + 2 Kb en aval du signal de terminaison de la transcription (TES).



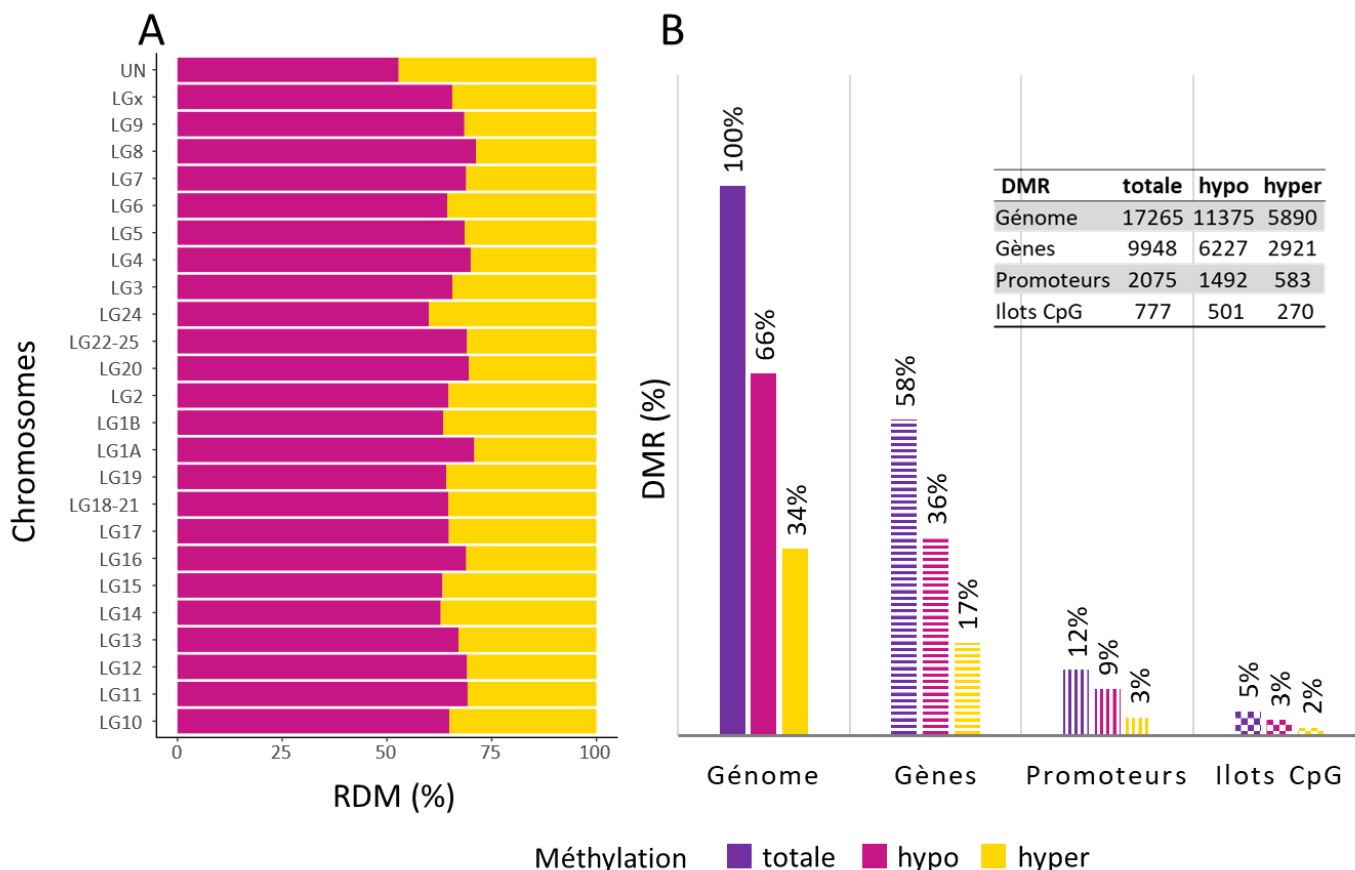
**Fig. 37 : Regroupement des phénotypes selon leur profil de méthylation**

Dendrogramme des dix profils de méthylation des branchies des phénotypes EM (bleu) et ED (vert). Abréviations : EM, eau de mer ; ED, eau douce.

Le taux de pourcentage moyen de la méthylation de l'ADN est de 74 % (Fig. 35). Les pourcentages des deux groupes sont similaires et aucune différence significative n'est observée entre les deux phénotypes EM et ED (Test de Wilcoxon, N=5). Concernant les profils de méthylation, le niveau de méthylation est inférieur au niveau des promoteurs, maximum 65 %, comparé au niveau du corps des gènes présentant un pourcentage moyen d'environ 80 %. On observe une baisse importante de la

méthylation au niveau du TSS avec un pourcentage d'environ 20 %, pour tous les individus des deux phénotypes (Fig. 36). Au niveau du TES, une légère diminution est également visible. Les échantillons ED et EM sont à 80 % hiérarchiquement regroupés au sein de deux clusters distincts (Fig. 37). Quatre échantillons sur cinq, du phénotype ED sont regroupés au sein d'un même cluster. On observe le même schéma pour le phénotype EM.

### III.4.2. Analyse des zones différenciellement méthylées entre les phénotypes ED et EM



**Fig. 38 : Distribution de la méthylation selon les positions génomiques**

Les graphiques indiquent le pourcentage de RDM hypo et hyperméthylées pour le phénotype ED par rapport au phénotype EM. A : Distribution des régions significativement différenciellement hypo (violet) ou hyper (jaune) méthylées par chromosome. B : Répartition des RDM détectées en domaines génomiques tels que gènes (rayures horizontales), promoteurs (rayures verticales) et îlots CpG (damier). Abréviations : RDM, régions différenciellement méthylées ; LG, groupe de liaison (chromosomes) ; UN, groupe de liaison « unknown ».

L'analyse des RDM a permis d'identifier environ 200000 régions dans le génome du loup, entre les conditions ED et EM. Au total, 17265 RDM significatives au seuil de 5 % ont été identifiées. Les RDM sont présentes sur tous les chromosomes du loup, avec un pourcentage moyen de 66 % de régions hypométhylées et de 34 % de régions hyperméthylées (Fig. 38A). La majorité des RDM sont localisées au niveau du corps des gènes c'est-à-dire du TSS au TES incluant les exons et les introns (58 %), suivi par les promoteurs (12 %) et par les îlots CpG (5 %) (Fig. 38B). Au niveau des gènes, on observe un pourcentage plus important de RDM hypométhylées (36 %) comparé au pourcentage de RDM hyperméthylées (17 %). On retrouve la même tendance au niveau des promoteurs et des îlots CpG avec un pourcentage plus important de RDM hypométhylées (9 et 3 %) contre 3 et 2 % pour les RDM hyperméthylées.

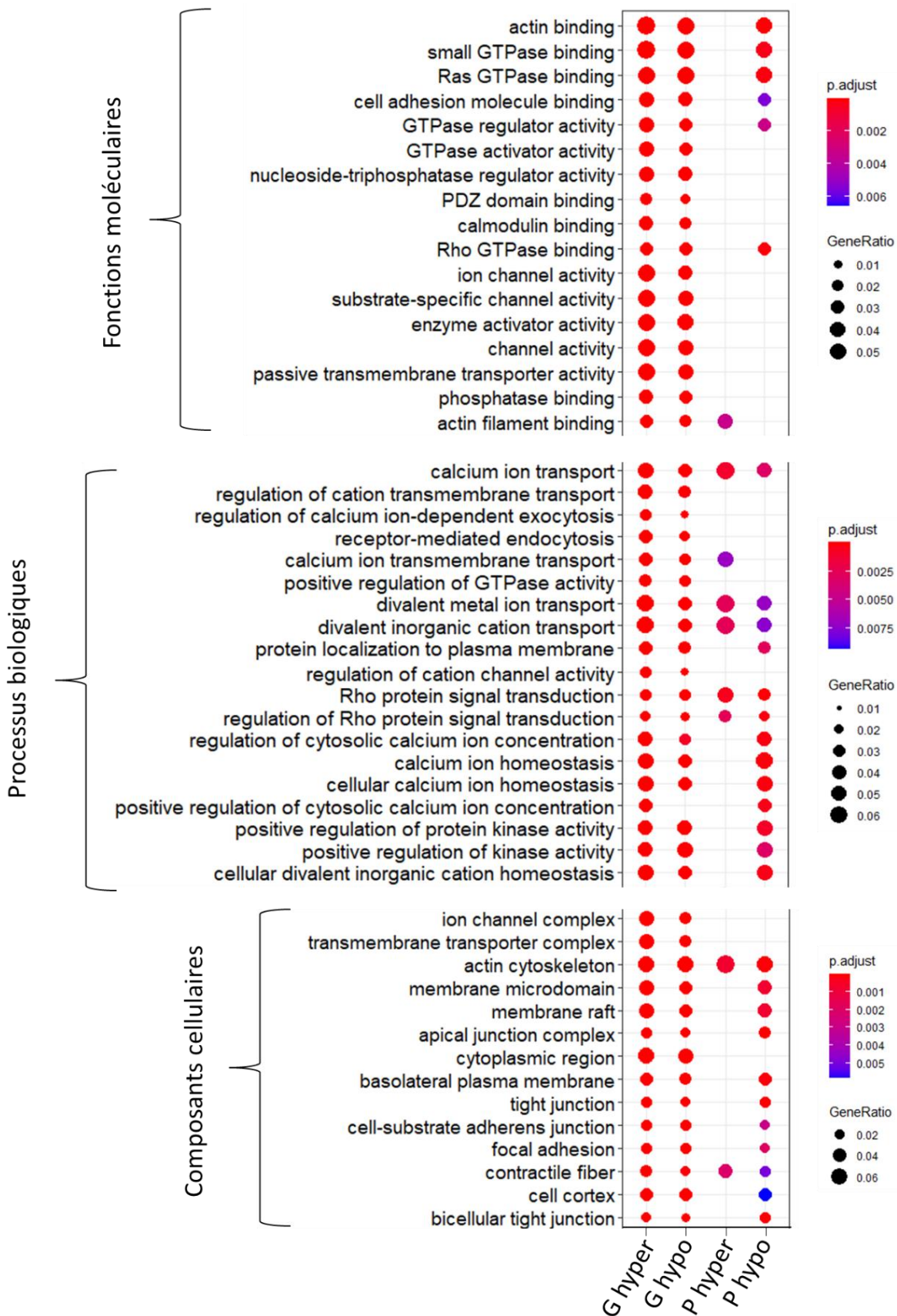
### III.4.3. Annotation fonctionnelle des RDM



**Fig. 39 : Distribution des termes d'ontologie génétique pour la catégorie « fonctions moléculaires »**

Pour chaque domaine génomique, les cinq catégories comportant le plus de RDM sont représentées. L'axe des abscisses indique le pourcentage du nombre de RDM pour chaque sous-catégorie des fonctions moléculaires.

En considérant les fonctions moléculaires (MF), pour les quatre domaines génomiques, les sous-catégories « binding » (80 % en moyenne), « catalytic activity » (35 %) et « molecular function regulator » (12 %) sont les plus représentées (Fig. 39). Il est intéressant de noter que la catégorie « transporter activity » (barres entourées de noir) compte également un nombre important de RDM au niveau des gènes hyper et hypométhylés et des promoteurs hyperméthylés. Concernant la distribution des GO termes de la catégorie des processus biologiques (BP, non montrée), les sous-catégories « cellular process » (88 %), « biological regulation » (73 %), « regulation of biological process » (69 %), « metabolic process » (60 %) et « response of stimulus » (55 %) sont les plus représentées. Enfin pour la catégorie des composants cellulaires (CC, non montrée), les sous-catégories majoritaires sont dans l'ordre, « cell part » (93 %), « organelle » (73 %), « membrane » (56 %), « protein-containing complex » (32 %) et « membrane-enclosed lumen » (22 %).



**Fig. 40 : Analyse d'enrichissement des termes d'ontologie génétique des domaines génomiques**

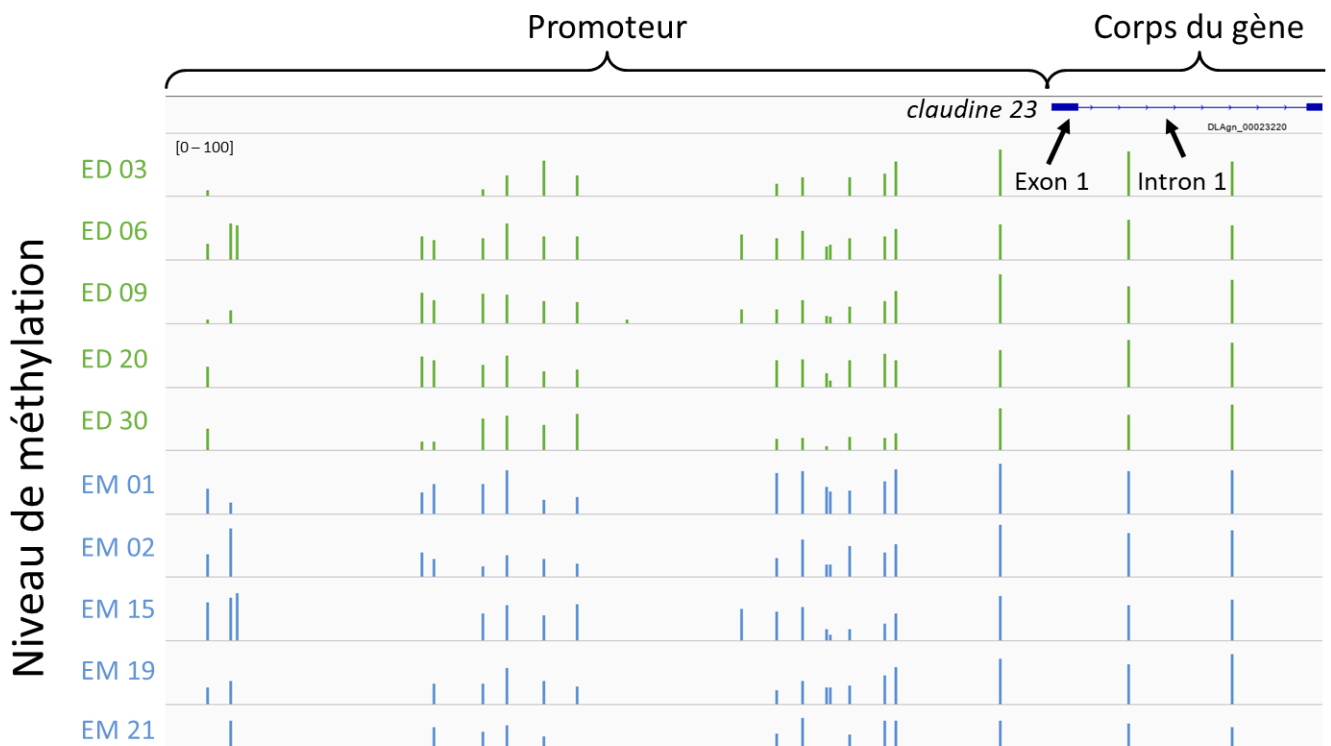
Abréviations : G, gènes ; P, promoteur. Afin de faire apparaître les termes GO les plus pertinents pour cette étude, un filtre a été appliqué sur les niveaux de GO. Le graphique a été généré à plusieurs niveaux d'ontologie : composants cellulaires à partir du niveau 4, fonctions moléculaires à partir du niveau 5 et processus biologiques à partir du niveau 7. Test de Fisher, méthode : FDR et seuil de la P value = 0,01.

**Tableau 5 : Gènes différentiellement méthylés impliqués dans l'osmorégulation**

Liste des RDM hypo ou hyperméthylées localisées au niveau des promoteurs et du corps des gènes impliqués dans la formation des jonctions serrées, le contrôle hormonal et le transport ionique.

	Séquence	Gène	Description	Position	Méthylation
Jonctions serrées	DLAgn_00036080	<i>cldn4</i>	claudine 4	promoteur	hypo
	DLAgn_00193010	<i>cldn4</i>	claudine 4	promoteur	hypo
	DLAgn_00036050	<i>cldn4</i>	claudine 4	promoteur	hypo
	DLAgn_00044120	<i>cl دنب</i>	claudine b	promoteur	hypo
	DLAgn_00023220	<i>cl دنب23</i>	claudine 23	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00035220	<i>cl دنب8</i>	claudine 8	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00081130	<i>ocln</i>	occludine	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00258740	<i>oclnب</i>	occludine b	gène	hypo
	DLAgn_00169520	<i>tjp1</i>	protéines des jonctions serrées zo-1	gène	hyper
	DLAgn_00087290	<i>tjp2</i>	protéines des jonctions serrées zo-2	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00151400	<i>tjp3</i>	protéines des jonctions serrées zo-3	promoteur+gène	hypo
Récepteurs hormonaux	DLAgn_00083540	<i>prlr 1</i>	récepteur à la prolactine 1	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00121350	<i>prlr 2</i>	récepteur à la prolactine 2	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00155250	<i>igf1ra</i>	récepteur IGFH1	gène	hypo
	DLAgn_00136380	<i>ghr1</i>	récepteur de l'hormone croissance 1	gène	hypo
	DLAgn_00087370	<i>ghr2</i>	récepteur de l'hormone croissance 2	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00183440	<i>mr</i>	récepteur des minéralocorticoïdes	gène	hyper
	DLAgn_00045010	<i>gr1</i>	récepteur des glucocorticoïdes	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00110330	<i>gr2</i>	récepteur des glucocorticoïdes	promoteur+gène	hypo
Transporteurs ioniques	DLAgn_00101870	<i>ae1a</i>	échangeur d'anion HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup>	promoteur	hyper
	DLAgn_00080120	<i>nkcc1</i>	cotransporteur Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> 1	gène	hypo/hyper
	DLAgn_00018050	<i>vha-b</i>	V-type H <sup>+</sup> -ATPase sous-unité V1	gène	hypo
	DLAgn_00137410	<i>nka α1a</i>	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase sous-unité α1a	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00082210	<i>nbc1</i>	cotransporteur Na <sup>+</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1	gène	hypo
	DLAgn_00222650	<i>rhbg</i>	transporteur NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Rh type B	gène	hypo
	DLAgn_00157760	<i>rhcg1</i>	transporteur NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Rh type C1	promoteur+gène	hypo
	DLAgn_00049060	<i>asic4</i>	canal ionique à détection d'acide 4	gène	hypo/hyper
	DLAgn_00160760	<i>nkcc2</i>	cotransporteur Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> 2	gène	hypo
	DLAgn_00133440	<i>slc26a6b</i>	échangeur d'anion HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup> b	gène	hypo
	DLAgn_00144740	<i>clc3</i>	canal à Cl <sup>-</sup> 3	gène	hypo
	DLAgn_00172160	<i>cfr</i>	canal à Cl <sup>-</sup>	gène	hyper





**Fig. 41 : Niveau de méthylation de chaque échantillon au niveau du promoteur du gène de la claudine 23**

Visualisation des niveaux de méthylation des dix échantillons de branchies des phénotypes EM (bleu) et ED (vert) pour le gène de la claudine 23 au niveau du promoteur. Cette région correspond à une zone différenciellement hypométhylée située dans la région promotrice. Les flèches noires indiquent les exons et les introns du corps du gène. Les niveaux de méthylation de chaque échantillon sont représentés par des barres sur une échelle de 0 à 100. Abréviations : EM, eau de mer ; ED, eau douce.

L'analyse de l'enrichissement de l'ontologie génétique pour la catégorie « fonctions moléculaires » montre que les sous-catégories « actin binding », « GTPase binding » et « Rho GTPase binding » sont enrichies (Fig. 40). Il est intéressant de noter que les sous-catégories « ion channel activity » et « passive transmembrane transporter activity » sont fortement enrichies. Concernant les processus biologiques, on observe que plusieurs sous-catégories concernent le transport ionique, (« regulation of cation transmembrane transport », « calcium ion transmembrane transport » et « divalent inorganic cation transport »). Fait intéressant, la sous-catégorie « cellular divalent inorganic cation homeostasis » est également enrichie. On retrouve ces mêmes sous-catégories pour les composants cellulaires. En effet, les termes « ion channel complex », « transmembrane transporter complex » et « actin cytoskeleton » sont enrichies. Les processus biologiques impliquant le calcium sont également très représentés. Enfin on peut noter la présence de la sous-catégorie « tight junctions » (jonctions serrées) parmi les termes enrichis.

L'analyse plus détaillée des catégories associées à la formation des jonctions serrées et du transport ionique, a montré que plusieurs gènes sont différenciellement méthylés (Tableau 5). A l'échelle de ces RDM, on remarque majoritairement une hypométhylation du corps des gènes et des promoteurs. Parmi les RDM identifiées des jonctions serrées, on retrouve les claudines (4, 8, 10, 23, b), les occludines et les protéines du type « zo », principalement hypométhylées au niveau du promoteur (Fig. 41). Les récepteurs hormonaux (*prlr 1-2* et *ghr 1-2*) sont hypométhylés au niveau du corps des gènes et des promoteurs. Concernant les transporteurs ioniques, les gènes impliqués dans le transport de  $\text{Na}^+$  (*nka \alpha 1a*, *nkcc1b*, *nkcc2* et *nbc1*) et de  $\text{Cl}^-$  (*ae1a*, *nkcc1b*, *nkcc2*, *slc26a6b*, *clc 3* et *cftr*) sont majoritairement hypométhylés, au niveau du corps des gènes.

## III.5. Discussion

### III.5.1. Conservation des profils de méthylation de l'ADN chez les téléostéens

Selon nos résultats de l'analyse du méthylome des branchies de loups, en moyenne 74 % de cytosines dans le contexte CpG sont méthylées (Tableau 4 et Fig. 35). Ces résultats sont cohérents avec ceux observées chez d'autres espèces de téléostéens. En effet chez le tilapia du Mozambique, 69,6 % des cytosines sont méthylées (Wan et al., 2016), chez le tétrodon vert, le pourcentage de cytosines méthylées atteint 65,5 % (Zemach et al., 2010) et 70,3 % chez l'épinoche (Metzger et Schulte, 2018). Des niveaux de méthylation plus importants ont été enregistrés chez le poisson-zèbre, 80,3% (Feng et al., 2010) et jusqu'à 85,7 % chez la sole (*Cynoglossus semilaevis*) (Changwei et al., 2014). Concernant les niveaux de méthylation dans les contextes hors CpG, nos résultats indiquent un pourcentage moyen de 0,6 % pour les contextes CHG et CHH. Ces valeurs sont conformes à celles observées chez le tilapia du Mozambique, qui sont de 0,47 % et de 0,57 %, respectivement (Wan et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les profils de méthylation de la cytosine sont conservés chez les téléostéens.

Le tracé des profils de la méthylation de l'ADN ne varie pas entre les individus analysés et montre une baisse rapide à proximité du TSS (transcription start site), région riche en sites de liaison des facteurs de transcription (Fig. 36). Nos données montrent également une légère diminution de la méthylation au niveau du TES (transcription end site). Des profils similaires ont été rapportés chez plusieurs espèces de téléostéens (Changwei et al., 2014; Feng et al., 2010; Wan et al., 2016; Zemach et al., 2010). La diminution du niveau de méthylation des promoteurs peut s'expliquer par le fait que les promoteurs soient des régions riches en îlots CpG connus pour être peu méthylés (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). La modulation de la méthylation au niveau de ces sites est à prendre en compte du fait qu'il s'agit souvent de sites d'initiation de la transcription (Jeltsch, 2010). Contrairement au TSS, un niveau élevé de méthylation des sites CpG dans le corps du gène avec une baisse légère au niveau du TES, pourrait être d'après Zemach et al. (2010) un mécanisme pour empêcher l'initiation de la transcription, cependant les mécanismes restent encore peu connus.

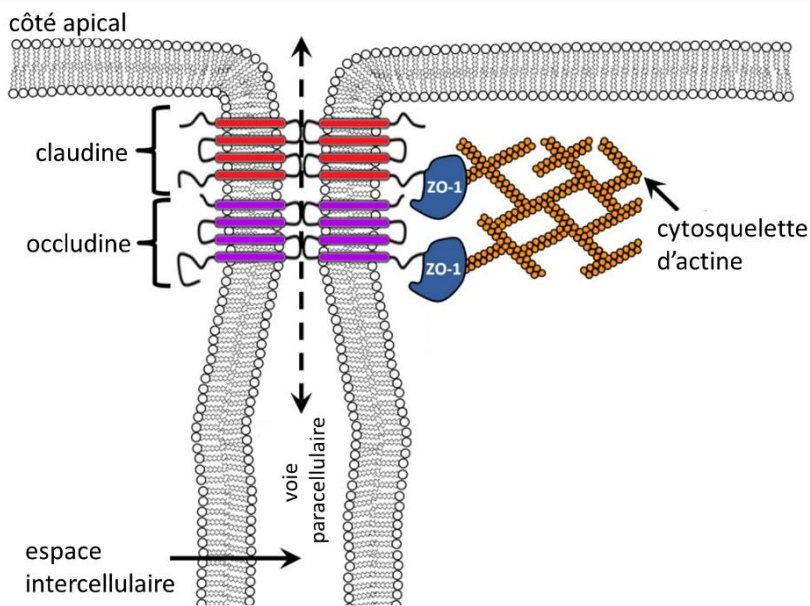
### III.5.2. La diminution de la salinité environnementale modifie la méthylation de l'ADN chez le loup

L'analyse du regroupement hiérarchique des profils de méthylation, a mis en évidence l'existence de deux groupes correspondants aux phénotypes ED et EM (Fig. 37). De plus, l'identification des régions différenciellement méthylées (RDM) entre les deux conditions, a mis en évidence une proportion plus importante de régions hypométhylées en eau douce par rapport à l'eau de mer pour l'ensemble des domaines génomiques : chromosomes, corps de gènes et promoteurs, avec un niveau de méthylation global plus important du corps des gènes comparé aux promoteurs, cohérent avec les profils de méthylation (Fig. 38). Des résultats comparables ont été rapportés chez la sole pour laquelle, Li et al. (2017a) ont rapporté une hypométhylation globale de l'ADN associée à la diminution de la salinité. En revanche, chez l'épinoche au stade larvaire (à l'âge de 1 mois), la majorité des RDM sont hyperméthylées chez les individus d'une salinité faible (2 ppt) par rapport à une salinité élevée (21 ppt) (Metzger et Schulte, 2018). Cette différence pourrait être liée à l'espèce étudiée et/ou s'expliquer par le stade de développement plus précoce utilisé chez l'épinoche. Chez le loup, par exemple, l'augmentation de température entraîne une modification globale du niveau de méthylation au stade larvaire mais pas chez les juvéniles (Anastasiadi et al., 2017). Il est donc possible que les modifications de la méthylation de l'ADN dépendent du stade de développement des individus. Ce serait une voie d'étude à l'avenir en suivant l'ontogenèse de la méthylation des stades embryonnaires aux adultes.

Chez les végétaux, l'hypométhylation est considérée comme une caractéristique commune associée à la réponse adaptative à divers stress abiotiques (Garg et al., 2015). Chez l'homme, Li et al. (2012) ont montré que l'hypométhylation de l'ADN est associée à une fréquence plus élevée de recombinaison homologue et à une instabilité génomique. Selon Flores et al. (2013), il serait possible que l'hyperméthylation ou l'hypométhylation de l'ADN induite par l'environnement puisse entraîner un taux de mutation plus élevé et ainsi fournir un moyen d'étendre la flexibilité du génome en modifiant le transcriptome et ainsi augmenter la plasticité phénotypique.

### III.5.3. Méthylation des gènes impliqués dans la perméabilité transépithéliale

L'étude des termes d'ontologie génétique a mis en avant l'enrichissement des fonctions impliquées dans la formation des jonctions serrées. Les claudines et les occludines sont des protéines transmembranaires qui régulent directement la perméabilité sélective entre les cellules pour les ions (Fig. 42). Elles relient l'espace intercellulaire pour former les jonctions serrées. Les protéines zo-1 fournissent un support structurel en reliant les protéines transmembranaires aux filaments d'actine (Chasiotis et al., 2012). En eau douce, les jonctions serrées forment ainsi une barrière limitant la perte passive d'ions par voie paracellulaire. Nos résultats montrent que de nombreux gènes impliqués dans la formation des jonctions serrées sont hypométhylés au niveau du promoteur. C'est notamment le cas du gène de la claudine 23 (Fig. 41). Chez plusieurs espèces de téléostéens, l'expression des ARNm des claudines et occludines varie en fonction de la salinité. Par exemple, les niveaux des ARNm de la *claudine 3a*, *3c* et *8d* du poisson-globe, de la *claudine 3* et *4* du choquemort, sont significativement plus élevés dans les branchies de poissons acclimatés à l'eau douce par rapport à ceux d'eau de mer (Chasiotis et al., 2009; Tipsmark et al., 2008; Whitehead et al., 2011), ce qui témoigne de leur importance dans la mise en place des jonctions serrées pour éviter la fuite d'ions par voie paracellulaire. L'hypométhylation observée au niveau des promoteurs pourrait être corrélée avec une induction transcriptionnelle des gènes des jonctions serrées. Cette hypothèse est cohérente avec les observations réalisées par Roth et al. (2006) dans différents types de tissus cancéreux. Les auteurs ont montré que l'hyperméthylation des promoteurs de plusieurs claudines inhibait l'expression génique des claudines, indiquant que la réduction de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN dans le promoteur est un mécanisme de régulation important qui contrôle la formation des jonctions serrées (Balda et Matter, 2009).



**Fig. 42 : Modèle du complexe des jonctions serrées entre cellules épithéliales**

Les protéines transmembranaires telles que les claudines (en rouge) et l'occludine (en violet) régulent directement les caractéristiques de perméabilité sélective des jonctions serrées en reliant l'espace intercellulaire (via leurs domaines extracellulaires) pour former une barrière. La protéine zo-1 (en bleu) fournit un support structural aux jonctions serrées en liant les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. Modifié d'après Chasiotis et al. 2012.

### III.5.4. Méthylation des gènes impliqués dans le transport ionique

Nos données montrent que de nombreux transporteurs ioniques sont différentiellement méthylés. Parmi ces transporteurs, la sous-unité  $\alpha 1$  de la *nka* présente une hypométhylation au niveau du promoteur et du corps du gène. En détaillant la localisation des RDM intragéniques du gène de la sous-unité  $\alpha 1a$  de la *nka*, il s'avère que le 1<sup>er</sup> intron et le 2<sup>ème</sup> exon sont hypométhylés dans les branchies en eau douce par rapport à l'eau de mer. Parmi les transporteurs différentiellement méthylés, nous avons également noté la présence des gènes *rhcg1* et *clc 3* qui sont hypométhylés en eau douce au niveau du 1<sup>er</sup> exon pour *rhcg1* et au niveau du 1<sup>er</sup> exon et du 1<sup>er</sup> intron pour *clc 3*. Une corrélation négative entre l'expression des gènes et la méthylation de l'ADN au niveau du 1<sup>er</sup> exon et du 1<sup>er</sup> intron a été mise en évidence chez plusieurs espèces, dont le loup, dans certains types cellulaires (Anastasiadi et al., 2018; Brenet et al., 2011). Il a été suggéré que le 1<sup>er</sup> intron possède des propriétés distinctes du reste des introns qui seraient associées à la régulation transcriptionnelle (H. Li et al., 2012; Majewski, 2002). Ces propriétés pourraient être liées à la proximité du 1<sup>er</sup> intron avec le TSS (Hartono et al., 2015).

Les mesures d'expression des transcrits de la *nka  $\alpha 1a$* , de *clc 3* et de *rhcg1* corroborent cette hypothèse. Plusieurs études ont montré que l'expression des transcrits de la *nka  $\alpha 1a$*  est plus élevée dans les branchies de loups acclimatés à l'eau douce par rapport à l'eau de mer (Blondeau-Bidet et al., 2019, 2016; L'Honoré et al., 2020). *Rhcg1* et *clc 3* présentent également, *in vitro*, une surexpression en condition hypotonique (Fig. 25). *In vivo*, l'expression de *rhcg1* est également supérieure en eau douce (Fig. 20). Concernant les gènes impliqués dans la sécrétion ionique tels que *nkcc1* et le *cftr*, chez le loup, leur expression est inférieure en eau douce par rapport à l'eau de mer (Lorin-Nebel et al. 2006b; Bodinier et al. 2009; Blondeau-Bidet et al. 2019; L'Honoré et al. 2020). Or nos résultats montrent respectivement une hyperméthylation en eau douce des introns 11 et 23 pour le gène du *nkcc1* et du *cftr*. Ces observations sont contradictoires avec la démonstration d'une corrélation positive entre la méthylation de l'ADN du corps des gènes et l'expression génique. La relation entre la méthylation de

l'ADN et l'expression génique semble spécifique de certaines régions intragéniques, d'autant plus que dans certains cas, les mêmes gènes présentent à la fois des RDM hypo et hyperméthylées.

Les différences de méthylation de l'ADN entre les phénotypes ED et EM, localisées sur les gènes impliqués dans l'osmorégulation, pourraient représenter une réponse à un stress hypo-osmotique. La méthylation différentielle de l'ADN et, par conséquent, la régulation des gènes osmorégulateurs pourraient contribuer à l'acclimatation en eau douce chez le loup. Huang et al. (2017), proposent que la variation de la méthylation de l'ADN provoquée par un stress puisse contribuer, à l'échelle individuelle à l'acclimatation rapide aux changements environnementaux soudains.

### III.5.5. Méthylation des gènes impliqués dans le contrôle hormonal

Nous avons relevé la présence de RDM au niveau du promoteur et du corps des gènes pour plusieurs récepteurs hormonaux, tels que les récepteurs de la prolactine (*prlr 1* et *2*), du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (*igfh1ra*), de l'hormone de croissance (*ghr 1* et *2*), des minéralocorticoïdes (*mr*) et des glucocorticoïdes (*gr 1* et *2*).

En admettant qu'une corrélation négative existe entre la méthylation de l'ADN du promoteur et l'expression génique, cela serait cohérent avec le rôle de la prolactine dans les processus d'acclimatation en eau douce. Cependant, *in vitro* et *in vivo*, l'expression de *prlr 1* ne montre pas de différence significative en fonction de la salinité, contrairement à l'expression de *prlr 2* qui diminue en condition hypotonique (L'Honoré et al., 2020). Dans leur revue, Zhang et Ho (2011) ont démontré que les gènes codant pour les hormones et leurs récepteurs peuvent être des cibles épigénétiques potentielles. Par exemple, il a été constaté que l'hypométhylation de la région promotrice du récepteur des glucocorticoïdes induit l'augmentation de l'expression du gène dans l'hypothalamus chez les fœtus de brebis sous-alimentées, développant une obésité au cours de leur développement (Stevens et al., 2010). Concernant les récepteurs des glucocorticoïdes *gr 1* et *gr 2* chez le loup, ils présentent une hypométhylation du promoteur et du corps du gène, consistante avec les résultats de L'Honoré et al. (2019). Dans cette étude, l'expression des transcrits de *gr 1* et de *gr 2* diminue dans les branchies et le rein des juvéniles de loups qui ne tolèrent pas l'eau douce. Plusieurs études, ont mis en évidence la modification des niveaux de corticoïdes, tels que le cortisol, et leurs récepteurs en réponse à des variations de salinités (Kiilerich et al., 2007; McCormick et al., 2008; Sakamoto et McCormick, 2006). Chez la truite arc-en-ciel, une expression plus faible de *gr 1* et *gr 2* a été mesurée dans les branchies des individus acclimatés à l'eau douce par rapport à ceux en eau de mer (Yada et al., 2008). Chez la sole, les niveaux de méthylation et d'expression du gène du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (*igf1*) sont corrélés avec une exposition à un milieu de faible salinité (15 ‰). Les niveaux de méthylation sont opposés à ceux de l'expression des ARNm, suggérant une régulation inhibée (Li et al., 2017b). Chez le loup, le gène codant pour l'hormone IGF1 ne présente pas de RDM, seul le récepteur de l'IGF-1 (*igfh1ra*) est hypométhylé au niveau du corps du gène.

En se basant sur ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que la méthylation de l'ADN pourrait contrôler l'acclimatation en eau douce chez le loup via une régulation hormonale.

### III.6. Conclusion

Pour la première fois chez le loup nous avons montré que la dessalure affecte la méthylation de l'ADN. Grâce à la technique du WGBS, nous avons étudié les niveaux de méthylation de l'ADN dans les branchies de loups exposés à une diminution de la salinité. Les résultats montrent que les profils de méthylation de l'ADN sont conservés chez les téléostéens et que la diminution de la salinité affecte les profils de méthylation. Nous avons observé une hypométhylation chez les loups acclimatés à l'eau douce par rapport à l'eau de mer avec une prédominance des RDM au niveau du corps des gènes. L'enrichissement des catégories GO, a mis en évidence les termes relatifs au transport ionique, aux jonctions serrées et au contrôle hormonal. L'analyse détaillée des RDM a montré la présence de nombreux gènes impliqués dans l'osmorégulation, présentant une hypométhylation au niveau du promoteur, du 1<sup>er</sup> exon et/ou du 1<sup>er</sup> intron. Puisque la méthylation de l'ADN joue un rôle fonctionnel dans la régulation transcriptionnelle, il est possible que les changements de méthylation de l'ADN induits par l'environnement puissent, à leur tour, modifier des changements dans l'expression des gènes et jouer un rôle clé dans les processus d'acclimatation. Cependant, la corrélation entre la méthylation de l'ADN et l'expression des transcrits reste à établir ; c'est pourquoi l'analyse du transcriptome de ces mêmes individus nous permettra de mieux comprendre la complexité des mécanismes d'acclimatation en eau douce.



## D. Discussion générale

---

### Effets du changement climatique sur les lagunes méditerranéennes

Dans le contexte du **changement climatique global**, les capacités d'acclimatation et d'adaptation des populations aux variations de leur environnement sont particulièrement mises à l'épreuve. Jusqu'à présent, les recherches sur le changement climatique en relation avec les milieux marins se sont concentrées sur le réchauffement et l'acidification des océans, tandis que les effets des changements de salinité sur les écosystèmes marins sont peu étudiés (Przeslawski et al., 2015). Les modèles climatiques prédisent une augmentation de la salinité dans les régions autour de l'équateur associée à une évaporation élevée, en raison de la hausse des températures à l'échelle de la planète (Boyer et al., 2005; Friedman et al., 2017; Siepielski et al., 2017). Dans les régions côtières et polaires, il est prédit une **diminution de la salinité** liée à l'intensification du cycle hydrologique et à la fonte des glaces dans l'hémisphère nord (Gibson et Najjar, 2000; Loder et al., 2015). Plus localement, les modèles climatiques prédisent une **augmentation de l'intensité des événements de fortes précipitations sur le nord-ouest de la Méditerranée** (Gualdi et al., 2013a, 2013b). Selon ces projections, les espèces passant une partie de leur cycle biologique dans les lagunes pourraient être exposées plus fréquemment à des événements extrêmes de fortes pluies pouvant mener à des baisses soudaines de salinité dans ces milieux. En effet, des changements de salinité brusques et notamment la dessalure représentent un défi physiologique important notamment pour les espèces d'origine marine tel que le loup *Dicentrarchus labrax*. Un milieu de faible salinité peut donc conduire à des mortalités, des distributions différentielles des espèces en fonction de leur origine, de leur euryhalinité et plasticité phénotypique (Pierce et al., 2012; Wong et al., 1999).

### Variation intraspécifique dans la capacité d'osmoréguler

Des **différences dans la capacité d'hyper-osmoréguler** en eau douce ont été démontrées en comparant les individus d'une même espèce chez l'épinoche et le choquemort (McCairns et Bernatchez, 2010; Scott, 2004). Scott et al. (2004b) ainsi que Scott et Schulte (2005) ont étudié la variation intraspécifique dans les réponses physiologiques à l'eau douce entre deux populations de choquemort en provenance d'habitats différents aux Etats-Unis. Ces travaux ont mis en évidence que malgré leur grande tolérance à la salinité, la capacité d'acclimatation à l'eau douce des deux populations de choquemort diverge. Ces différences intraspécifiques seraient le résultat d'une adaptation locale, traduisant ainsi la grande plasticité de cette espèce face à un facteur de stress environnemental. En tant que téléostéen euryhalin, le loup, *Dicentrarchus labrax*, est également capable **d'ajuster rapidement sa physiologie osmorégulatrice** en réponse aux changements de salinité en utilisant une série de mécanismes moléculaires et cellulaires que nous avons analysés dans ce mémoire. Nous avons étudié les mécanismes chez des juvéniles de loup ayant montré des capacités d'acclimatation à l'eau douce. Cependant, nous n'avons pas exploré dans ce travail la **variabilité intraspécifique** chez le loup suite à l'acclimatation à l'eau douce montrée par plusieurs études menées au laboratoire (L'Honoré et al., 2020, 2019; Nebel et al., 2005b).

Dans les populations naturelles, un **choix d'habitat différentiel** a été suggéré, certains loups pénétrant dans des environnements à salinité très variable tandis que d'autres restent dans les eaux marines à salinité stable. La coexistence de sous-populations distinctes a été suggérée à plusieurs reprises (Boutet et al., 2006; Guinand et al., 2014; Lemaire et al., 2000; Nebel et al., 2005b). En condition expérimentale, les loups ne s'acclimatant pas à l'eau douce et exposés à ce milieu présentent un phénotype caractérisé

par des déplacements incohérents et lents, ainsi qu'un isolement du banc et une couleur plus sombre comparée au reste du groupe. De plus, leur osmolalité sanguine est faible, 30 % inférieure à celle des loups acclimatés ( $213.6 \text{ mOsm.kg}^{-1} \pm 6.6$  contre  $268 \text{ mOsm.kg}^{-1} \pm 3.6$ ), ce qui est un signe de défaillance dans les capacités osmorégulatrices (L'Honoré et al., 2019; Nebel et al., 2005b). Un déséquilibre du ratio  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  plasmatique a été observé, mettant en évidence un **dysfonctionnement dans la régulation ionique**. Cette **mortalité différentielle** suggère que les juvéniles de loups ne possèdent pas tous les mêmes capacités osmorégulatrices pour faire face à l'eau douce (Allegrucci et al., 1994; Dendrinis et Thorpe, 1985; Giffard-Mena et al., 2008; Jensen et al., 1998; Nebel et al., 2005b). Du fait de l'importance des branchies dans l'osmorégulation, une étude du méthylome et du transcriptome est en cours pour mieux comprendre **pourquoi certains loups s'acclimatent à l'eau douce quand d'autres meurent ?** Pour comprendre l'origine de cette variabilité intraspécifique, il est dans un premier temps nécessaire d'examiner en détail les mécanismes de l'acclimatation en eau douce, afin de poser « les briques » du processus d'hyper-osmorégulation chez le loup. C'est ce que nous avons tenté de réaliser à travers les trois parties de ce travail de recherche.

## Le loup acclimaté en eau douce possède au moins deux types d'ionocytes

Dans la première partie de ce projet, nous avons identifié les gènes exprimés dans les ionocytes branchiaux et ceux dont l'expression est régulée par la diminution de la salinité. Ces données couplées aux résultats de la localisation des protéines par immunohistochimie, nous ont permis de proposer un **premier modèle comportant au moins deux sous-types de ionocytes dans les branchies en eau douce** (type NCC et NHE3) ayant probablement des rôles complémentaires dans l'absorption ionique (Kwong et Perry, 2016). Il semblerait que les ionocytes de type eau douce du loup ne soient pas exactement les mêmes que chez le poisson zèbre, d'origine dulcicole, qui sert souvent de modèle dans ces études (Hwang et Chou, 2013). Les connaissances acquises sur le poisson-zèbre ne peuvent pas être directement appliquées à de nombreuses espèces marines euryhalines. L'établissement de modèles alternatifs d'ionocytes complets chez ces espèces est donc d'autant plus important, comme souligné par Hsu et al., (2014). Les approches utilisées dans ce premier chapitre ne permettent pas de connaître avec précision le rôle de chaque transporteur dans l'absorption ionique. Etant donné que les ionocytes ne représentent qu'un faible pourcentage de la totalité de l'épithélium branchial, les niveaux d'expression mesurés ne sont pas spécifiques des ionocytes et peuvent inclure d'autres types cellulaires de la branchie telles que les cellules pavimenteuses. Couplé aux profils d'expression des ARNm, l'immunohistochimie a permis de déterminer avec précision la localisation de certains transporteurs dans les ionocytes. **Ce travail montre l'importance d'utiliser plusieurs approches complémentaires pour mieux comprendre la complexité des mécanismes biologiques.**

## La diminution de l'osmolalité régule directement l'expression des transporteurs

L'objectif de la deuxième partie était de compléter l'approche *in vivo* par une approche *in vitro* afin d'examiner en détail l'effet d'une diminution de la salinité en s'affranchissant des autres processus de régulation agissant à l'échelle de l'organisme et notamment du contrôle hormonal. Nous avons montré que certains gènes (*ae1a* et *clc3*) impliqués dans le transport ionique et potentiellement dans l'osmodétection peuvent être **directement activés par un changement d'osmolalité** (Inokuchi et al., 2015). D'autre part, nous avons mis en évidence une **réponse différentielle des récepteurs à la prolactine à une diminution de salinité**, en accord avec de précédentes études menées chez d'autres espèces (Breves et al., 2014b, 2011; Inokuchi et al., 2015; Seale et al., 2014). La diminution d'expression de *prlr 2 in vitro* lors d'une baisse d'osmolalité est corrélée à une baisse d'expression *in vivo* en milieu d'eau douce (L'Honoré et al., 2020). Ceci permet d'émettre l'hypothèse que **le facteur déclencheur de**

**la diminution de l'expression du récepteur *prlr 2* au niveau branchial serait une baisse d'osmolalité.**

Au contraire, la présence de **prolactine** dans le milieu de culture induit une **surexpression de *prlr 1*** quelle que soit la salinité. L'approche *in vitro* utilisée dans ce chapitre n'a pas fait l'objet de mise au point particulière. Nous avons suivi le protocole décrit dans l'article d'Inokuchi et al. (2015) afin d'examiner chez le loup l'effet découplé d'une diminution de salinité et de l'ajout de la prolactine. Il est à noter que cette technique n'est pas adaptée sur du long-terme car après 8 h d'incubation nous avons observé une diminution de la quantité d'ARNm cible dans les tissus (augmentation des Ct). Cette diminution pourrait être le signe d'une dégradation, peut-être dû aux conditions d'incubation. Cette méthode reste cependant adaptée et facile à mettre en œuvre pour déterminer l'effet d'un paramètre à court terme sur des tissus ou organes isolés.

## La salinité affecte la méthylation de l'ADN : les transporteurs ioniques, les protéines des jonctions serrées et les récepteurs hormonaux sont différentiellement méthylés

Dans la troisième partie, nous avons mis en évidence pour la **première fois l'effet d'une dessalure sur les profils de méthylation de l'ADN chez le loup**. La salinité est donc un facteur clé qui peut affecter les profils de méthylation des téléostéens et potentiellement aussi les profils d'expression des gènes (Flores et al., 2013). L'utilisation de la méthode WGBS a permis à la fois d'avoir une réponse globale à l'échelle du méthylome et une réponse très précise à l'échelle du gène ou d'une région d'un gène. Nos résultats montrent globalement **une diminution de la méthylation de l'ADN en eau douce par rapport à l'eau de mer**, ce qui semble être une réponse globale à la diminution de la salinité dans les branchies du loup. Nos résultats ont mis en évidence que plusieurs **gènes impliqués dans l'absorption ionique sont différentiellement méthylés**, et la plupart du temps hypométhylés en eau douce par rapport à la condition eau de mer, indiquant que l'expression de ces gènes pourrait être en partie régulée par l'ajout ou le retrait de groupements méthyles. Fait intéressant, de nombreux gènes différentiellement méthylés, sont impliqués dans **la formation des jonctions serrées et dans le contrôle hormonal**.

La méthylation a des rôles doubles et opposés dans la régulation de l'expression des gènes: dans les régions promotrices, la méthylation de l'ADN est associée à la répression transcriptionnelle, tandis que dans les corps des gènes, la méthylation de l'ADN est généralement associée à des niveaux d'expression élevés. Cependant, une corrélation négative entre l'expression des gènes et la méthylation de l'ADN au niveau du 1<sup>er</sup> exon et du 1<sup>er</sup> intron a été mise en évidence chez plusieurs espèces, dont le loup, dans certains types cellulaires (Anastasiadi et al., 2018; Brenet et al., 2011). Bien que les fonctions régulatrices de la méthylation intragénique restent encore mal comprises, une théorie suggère que la fonction de la méthylation des exons serait la régulation de l'épissage alternatif (Laurent et al., 2010; Lev Maor et al., 2015; Lyko et al., 2010; Park et al., 2011). Le rôle de la méthylation intragénique de l'ADN chez les mammifères est récemment devenu un point d'intérêt clé, car les séquences d'exons ont tendance à avoir des niveaux de méthylation plus élevés que les séquences d'intron. Dans leur revue, Lev Maor et al. (2015), ont examiné plusieurs données indiquant que la méthylation de l'ADN est un régulateur de l'épissage de l'ARNm et donc affecte l'épissage alternatif, révélant un autre rôle important pour la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes supérieurs.

Une approche en transcriptomique prévue prochainement sur ces mêmes échantillons sera très utile pour évaluer les niveaux de transcrits de tous les gènes identifiés dans cette étude et pour les corréler aux niveaux de méthylation.

## E. Perspectives

---

Dans ce projet nous avons étudié les **mécanismes de l'hyper-osmorégulation dans la branchie de loup en condition contrôlée**. L'ensemble des résultats issus de ce travail de recherche et des précédentes études a fourni un ensemble de transporteurs ioniques que l'on pourrait utiliser comme marqueurs biologique de la tolérance à l'eau douce (Blondeau-Bidet et al., 2019, 2016; Bossus et al., 2013; L'Honoré et al., 2020, 2019; Lorin-Nebel et al., 2006; Masroor et al., 2019, 2017). Les précédents travaux réalisés sur l'acclimatation à l'eau douce chez le loup ont mis en évidence la variabilité intraspécifique de la capacité à tolérer l'eau douce (L'Honoré et al., 2020, 2019; Nebel et al., 2005b). Étudier ces marqueurs au niveau transcriptionnel et protéique chez des individus tolérants et intolérants à l'eau douce pourrait contribuer à une meilleure compréhension des causes de l'acclimatation et de la répartition des organismes dans leur environnement.

Ces marqueurs pourraient également être étudiés sur des **populations de loup sauvages**. Récemment un projet de connectivité des poissons à l'interface lagune – mer en Méditerranée a été lancé. Le projet Connect-Med est un projet de recherche ciblant quatre espèces côtières, la daurade royale, le loup, le muge et la saupe, au sein des lagunes méditerranéennes (<https://pole-lagunes.org/projet-connect-med/>). L'objectif du projet est de mieux comprendre la connectivité de ces espèces entre les lagunes et la mer en fonction de différents types d'habitats. Les premiers résultats de ce projet montrent que les loups sont plutôt sédentaires et sont présents toute l'année dans la lagune, même s'ils font des allers-retours plus fréquents entre mer et lagune en hiver ; les loups font également des incursions en eau douce. Il serait intéressant de récupérer ces loups dont on connaît les préférences d'habitat et d'étudier chez ces individus l'expression des transporteurs impliqués dans l'absorption ionique pour tester l'hypothèse de l'existence de différences entre ces groupes.

Nos résultats ont mis en avant la complexité de déterminer précisément la fonction biologique des transporteurs ioniques impliqués dans l'osmorégulation. Il serait intéressant de compléter les approches utilisées dans cette étude et d'en utiliser de nouvelles afin d'approfondir la connaissance des mécanismes de l'hyper-osmorégulation pour *in fine* proposer un modèle d'absorption ionique plus complet. Les modèles d'ionocytes d'espèces marines sont encore peu explorés ; ces travaux permettront de mieux comprendre ce qui se passe chez un téléostéen euryhalin d'origine marine confronté à une diminution de salinité.

L'emploi de la technique de la **microdissection par capture laser**, conçue par Emmert-Buck et al. (1996), permet d'isoler des cellules individuelles, ou un groupe de cellules, à partir de coupes de tissus par visualisation microscopique directe. Cette technique couplée à une analyse transcriptomique a été utilisée chez la truite arc-en-ciel pour isoler des ionocytes de branchies exposées à l'eau de mer et à l'eau douce (Leguen et al., 2015). Plus d'une centaine de gènes différentiellement exprimés entre les ionocytes d'eau de mer et d'eau douce ont été identifiés, dont la plupart sont surexprimés en eau douce. Les gènes les plus différentiellement exprimés sont impliqués dans le transport ionique et notamment *nka α1a*, *clc2* et *slc26a6*. Dans le cadre de nos études, nous pourrions **isoler les ionocytes des branchies de loups exposés à l'eau de mer et à l'eau douce** et également sélectionner les ionocytes en eau douce selon leur localisation sur la branchie (filament ou lamelle). À partir des ionocytes isolés et de l'ARN extrait, l'étape suivante consisterait à analyser et comparer l'expression génique sur une population de cellules et/ou à partir d'une seule cellule (Bevilacqua et Ducos, 2018). Ainsi à l'échelle d'une population ou d'un seul ionocyte, nous pourrions mesurer l'expression des transcrits spécifiques des ionocytes et non pas de l'épithélium branchial en entier et comparer leur expression suite à une

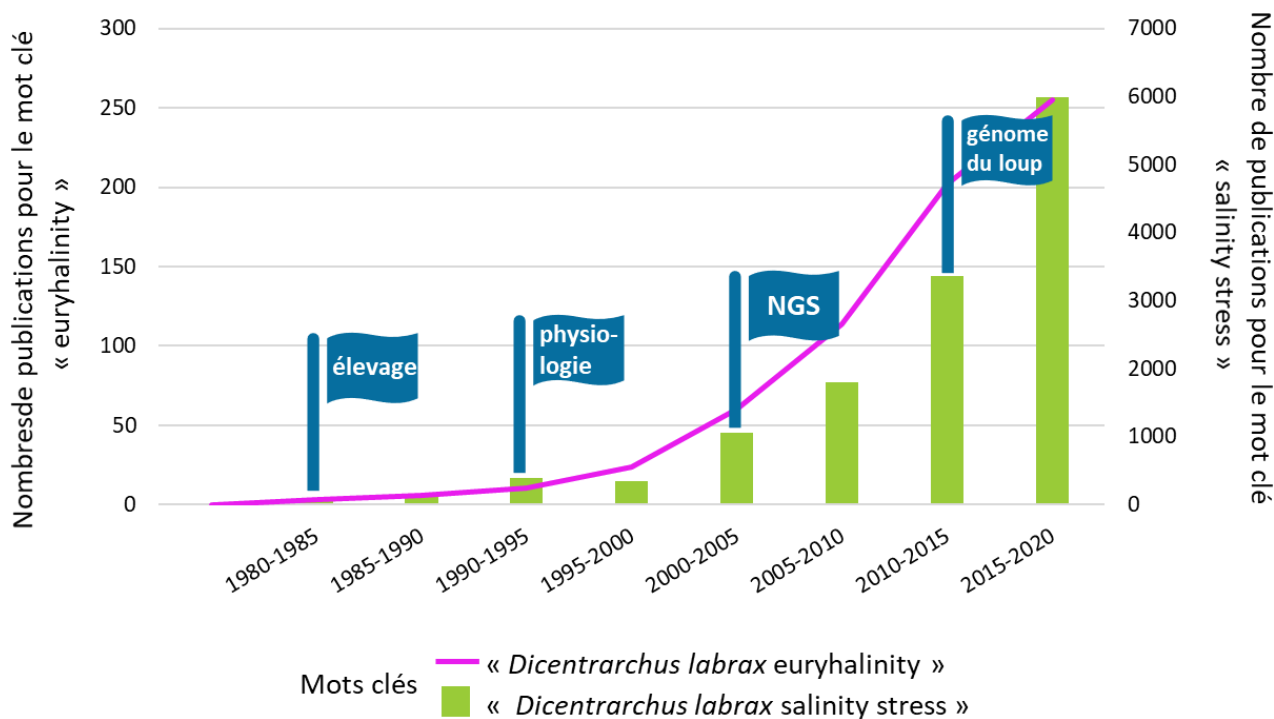
modification de la salinité. De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques permettrait de localiser précisément les protéines au sein de chaque sous-type d'ionocytes.

La technique d'incubation des filaments branchiaux offre des avantages, de par sa facilité de mise en œuvre, le nombre limité de poissons nécessaire et la possibilité de tester de nombreux traitements différents. Il serait intéressant de tester sur des **cultures de filaments *in vitro* différentes compositions ioniques** avec par exemple en condition hypotonique un milieu pauvre en Na<sup>+</sup> et un milieu pauvre en Cl<sup>-</sup>. Du fait d'un lien étroit entre la régulation ionique et la régulation acido-basique, on pourrait également faire varier le pH des milieux d'incubation et analyser par qPCR l'expression des transcrits. L'incubation dans ces différents milieux pourrait nous permettre de caractériser de manière plus approfondie les fonctions biologiques des transporteurs ioniques. Une autre alternative serait la perfusion de branchies permettant d'augmenter le temps d'exposition aux traitements (Perry et al., 1984).

Connaitre la localisation précise des transporteurs ioniques dans les ionocytes est indispensable pour déterminer leur rôle dans le maintien de l'homéostasie. Cependant, peu d'anticorps spécifiques des transporteurs sont disponibles pour les organismes « non-modèles » comme le loup et leur synthèse s'avère couteuse et ne garantit pas leur bon fonctionnement. Une autre approche consisterait à induire la perte de fonction d'un gène et d'étudier sa signification physiologique. C'est ce qu'a réalisé très récemment Zimmer et al. (2020), afin d'évaluer la contribution de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHE3b dans l'absorption de Na<sup>+</sup> chez le poisson-zèbre, à l'aide de la **technologie CRISPR/Cas9** et l'injection de morpholino. Leur hypothèse était que l'absorption de Na<sup>+</sup> serait réduite suite à la perte de fonction (knockout, KO) de *nhe3b*. Mais, contrairement à leur hypothèse, l'absorption de Na<sup>+</sup> a été maintenue chez des larves KO de *nhe3b*. De plus, la perte de fonction des deux autres voies d'absorption de Na<sup>+</sup>, régulée par la *vha* et *ncc*, n'ont pas révélé de mécanismes de régulation compensatoires en réponse à la perte de fonction de *nhe3b*. Ces résultats suggèrent l'existence potentielle d'une autre voie inconnue pour l'absorption de Na<sup>+</sup> chez le poisson-zèbre et peut être chez les autres téléostéens.

Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur un seul effecteur osmotique. Or, le **rein** est également un organe osmorégulateur très important en eau douce de par son implication dans l'absorption ionique à partir de l'urine, notamment au niveau des tubes collecteurs (Perry et al., 2003), Nebel et al., (2005a) ont montré l'importance de son dysfonctionnement chez les loups intolérants à l'eau douce. Des analyses supplémentaires, notamment de la méthylation de l'ADN et du transcriptome sur des échantillons de rein, sont nécessaires pour compléter les données obtenues.

**En conclusion**, comprendre les mécanismes de l'euryhalinité est indispensable pour évaluer l'effet des changements environnementaux sur la plasticité phénotypique des individus. Une approche intégrative permet une meilleure compréhension des mécanismes d'acclimatation à une diminution de salinité chez les téléostéens. L'étude des réponses physiologiques, génétiques et épigénétiques offre une vue d'ensemble des différents processus impliqués dans l'hyper-osmorégulation chez une espèce migratrice d'origine marine telle que le loup. Depuis une dizaine d'années, le loup a reçu une attention particulière concernant sa tolérance à une large gamme de salinité, comme en témoigne le nombre grandissant de publications sur le sujet (Fig. 43). Basé sur une approche mécanistique, ce projet de recherche s'intègre dans l'étude écophysiologique de l'acclimatation du loup à un choc hypo-osmotique, situation qu'il rencontre en milieu naturel lors de fortes précipitations dans les lagunes et les estuaires. Les trois parties de ce travail de recherche ont contribué à une meilleure compréhension des processus d'acclimatation suite à une diminution de salinité chez le loup.



**Fig. 43 : Nombre de publications ayant pour sujet le stress de salinité et l'euryhalinité chez le loup**

Résultats de recherche de l'outil Google Scholar avec les mots-clés « *Dicentrarchus labrax* euryhalinity » (représenté par la courbe violette) et « *Dicentrarchus labrax* salinity stress » (représenté par l'histogramme en vert) par période de 5 ans. Les drapeaux bleus situent les avancées majeures ayant influencé le nombre d'études réalisées sur le sujet : en 1980 la mise au point des techniques d'élevage du loup en aquaculture, dans les années 1990 l'avancée des connaissances sur la physiologie des téléostéens, dans les années 2000 l'essor des technologies de séquençage haut-débit (NGS) et en 2014 la publication du génome du loup par Tine et al. (2014).



## F. Références bibliographiques

---

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Von Kuster, G., Rasche, E., Soranzo, N., Turaga, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Goecks, J., 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44, W3-W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Agrawal, K., Das, V., Vyas, P., Hajdúch, M., 2018. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacol. Ther.* 188, 45-79. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.006>
- Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S., Garrett-Bakelman, F.E., Figueroa, M.E., Melnick, A., Mason, C.E., 2012. MethylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* 13, R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r87>
- Alderdice, D.F., 1988. Osmotic and Ionic Regulation in Teleost Eggs and Larvae. p. 163-251. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60200-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60200-9)
- Alexandrou, M.A., Swartz, B.A., Matzke, N.J., Oakley, T.H., 2013. Genome duplication and multiple evolutionary origins of complex migratory behavior in Salmonidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 514-523. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.026>
- Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R., Sbordoni, V., 1995. Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Mar. Biol.* 121, 591-599. <https://doi.org/10.1007/BF00349294>
- Allegrucci, G., Fortunato, C., Cataudella, S., Sbordoni, V., 1994. Acclimation to fresh-water of the sea bass- evidence of selective mortality of allozyme genotypes, in: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms Conference*. p. 486-502.
- Allegrucci, G., Fortunato, C., Sbordoni, V., 1997. Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*) in the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 128, 347-358. <https://doi.org/10.1007/s002270050100>
- Amaral, P.P., Dinger, M.E., Mattick, J.S., 2013. Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: an evolutionary perspective. *Brief. Funct. Genomics* 12, 254-278. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt016>
- Anastasiadi, D., Díaz, N., Piferrer, F., 2017. Small ocean temperature increases elicit stage-dependent changes in DNA methylation and gene expression in a fish, the European sea bass. *Sci. Rep.* 7, 12401. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10861-6>
- Anastasiadi, D., Esteve-Codina, A., Piferrer, F., 2018. Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species. *Epigenetics Chromatin* 11, 37. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0205-1>
- Andersen, G.B., Tost, J., 2018. A Summary of the Biological Processes, Disease-Associated Changes, and Clinical Applications of DNA Methylation. Springer, p. 3-30. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7481-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7481-8_1)
- Andrews, S., 2010. FastQC-A Quality Control application for FastQ files.
- Angers, B., Castonguay, E., Massicotte, R., 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Mol. Ecol.* 19, 1283-1295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04580.x>
- Ansel, K.M., Lee, D.U., Rao, A., 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 4, 616-623. <https://doi.org/10.1038/ni0703-616>
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., others, 2002. Whole-Genome Shotgun Assembly and Analysis of the Genome of *Fugu rubripes*. *Science* (80-. ). 297, 1301-1310. <https://doi.org/10.1126/science.1072104>
- Avella, M., Ehrenfeld, J., 1997. Fish gill respiratory cells in culture: A new model for Cl<sup>-</sup>-secreting epithelia. *J. Membr. Biol.* 156, 87-97. <https://doi.org/10.1007/s002329900190>
- Bahri-Sfar, L., Lemaire, C., Hassine, O.K. Ben, Bonhomme, F., 2000. Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 267, 929-935. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1092>
- Balda, M.S., Matter, K., 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* -

- Biomembr. 1788, 761-767. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.024>
- Baldisserotto, B., 2003. Osmoregulatory adaptations of freshwater teleosts, in: Fish adaptations. CRC Press, Boca Raton, p. 179-201.
- Ball, M.P., Li, J.B., Gao, Y., Lee, J.-H., LeProust, E.M., Park, I.-H., Xie, B., Daley, G.Q., Church, G.M., 2009. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat. Biotechnol.* 27, 361-368. <https://doi.org/10.1038/nbt.1533>
- Banovich, N.E., Lan, X., McVicker, G., de Geijn, B., Degner, J.F., Blischak, J.D., Roux, J., Pritchard, J.K., Gilad, Y., 2014. Methylation QTLs are associated with coordinated changes in transcription factor binding, histone modifications, and gene expression levels. *PLoS Genet.* 10, e1004663.
- Bao, J., Wu, J., Schuster, A.S., Hennig, G.W., Yan, W., 2013. Expression Profiling Reveals Developmentally Regulated lncRNA Repertoire in the Mouse Male Germline. *Biol. Reprod.* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113308>
- Barnabé, G., 1989. Aquaculture Vol 1 - Vol 2, in: Lavoisier (Éd.), Aquaculture. Paris, p. 675-720.
- Barturen, G., Rueda, A., Oliver, J.L., Hackenberg, M., 2013. MethylExtract: High-Quality methylation maps and SNV calling from whole genome bisulfite sequencing data. *F1000Research* 2, 217. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-217.v1>
- Bernstein, E., 2005. RNA meets chromatin. *Genes Dev.* 19, 1635-1655. <https://doi.org/10.1101/gad.1324305>
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G.H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J.N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Crollius, H.R., Guiguen, Y., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Bevilacqua, C., Ducos, B., 2018. Laser microdissection: A powerful tool for genomics at cell level. *Mol. Aspects Med.* 59, 5-27. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.09.003>
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-8. <https://doi.org/10.1038/nature05913>
- Blel, H., Panfili, J., Guinand, B., Berrebi, P., Said, K., Durand, J.-D., 2010. Selection footprint at the first intron of the Prl gene in natural populations of the flathead mullet (*Mugil cephalus*, L. 1758). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 387, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.02.018>
- Blondeau-Bidet, E., Bossus, M., Maugars, G., Farcy, E., Lignot, J.-H.H., Lorin-Nebel, C., 2016. Molecular characterization and expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 isoforms in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory tissues following salinity transfer. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1647-1664. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0247-x>
- Blondeau-Bidet, E., Hiroi, J., Lorin-Nebel, C., 2019. Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Gene* 692, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.006>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr. Rev.* 19, 225-268. <https://doi.org/10.1210/er.19.3.225>
- Bollinger, R.J., Ellis, L. V., Bossus, M.C., Tipsmark, C.K., 2018. Prolactin controls Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransporter via Stat5 pathway in the teleost gill. *Mol. Cell. Endocrinol.* 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.06.014>
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Fordyce, J.A., Yang, L.H., Davis, J.M., Hulsey, C.D., Forister, M.L., 2003. The ecology of individuals: Incidence and implications of individual specialization. *Am. Nat.* 161, 1-28. <https://doi.org/10.1086/343878>
- Bossus, M., Charmantier, G., Blondeau-Bidet, E., Valletta, B., Boulo, V., Lorin-Nebel, C., 2013. The ClC-3 chloride channel and osmoregulation in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Comp. Physiol. B* 183, 641-662. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0737-9>
- Bossus, M., Charmantier, G., Lorin-Nebel, C., 2011. Transient receptor potential vanilloid 4 in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*: A candidate protein for osmosensing. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 160, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.04.014>
- Boutet, I., Long Ky, C.L., Bonhomme, F., 2006. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene* 379, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.04.011>
- Boutet, I., Lorin-Nebel, C., De Lorgeril, J., Guinand, B., 2007. Molecular characterisation of prolactin and analysis of extrapituitary expression in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* under various salinity

- conditions. *Comp. Biochem. Physiol. D-Genomics Proteomics* 2, 74-83.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.12.002>
- Boyer, T.P., Levitus, S., Antonov, J.I., Locarnini, R.A., Garcia, H.E., 2005. Linear trends in salinity for the World Ocean, 1955–1998. *Geophys. Res. Lett.* 32, L01604. <https://doi.org/10.1029/2004GL021791>
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Illynskyy, Y., Hollander, J., Meins Jr, F., Kovalchuk, I., 2010. Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PLoS One* 5, e9514.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., Scandura, J.M., 2011. DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS One* 6, e14524.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014524>
- Breves, J.P., Inokuchi, M., Yamaguchi, Y., Seale, A.P., Hunt, B.L., Watanabe, S., Lerner, D.T., Kaneko, T., Grau, E.G., 2016. Hormonal regulation of aquaporin 3: opposing actions of prolactin and cortisol in tilapia gill. *J. Endocrinol.* 230, 325-337. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0162>
- Breves, J.P., Keith, P.L.K., Hunt, B.L., Pavlosky, K.K., Inokuchi, M., Yamaguchi, Y., Lerner, D.T., Seale, A.P., Grau, E.G., 2017. Clc-2c is regulated by salinity, prolactin and extracellular osmolality in tilapia gill. *J. Mol. Endocrinol.* 59, 391-402. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0144>
- Breves, J.P., McCormick, S.D., Karlstrom, R.O., 2014a. Prolactin and teleost ionocytes: New insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 21-28.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.12.014>
- Breves, J.P., Seale, A.P., Helms, R.E., Tipsmark, C.K., Hirano, T., Grau, E.G., 2011. Dynamic gene expression of GH/PRL-family hormone receptors in gill and kidney during freshwater-acclimation of Mozambique tilapia. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 158, 194-200.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.030>
- Breves, J.P., Seale, A.P., Moorman, B.P., Lerner, D.T., Moriyama, S., Hopkins, K.D., Grau, E.G., 2014b. Pituitary control of branchial NCC, NKCC and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Comp. Physiol. B* 184, 513-523. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0817-0>
- Breves, J.P., Serizier, S.B., Goffin, V., McCormick, S.D., Karlstrom, R.O., 2013. Prolactin regulates transcription of the ion uptake Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter (ncc) gene in zebrafish gill. *Mol. Cell. Endocrinol.* 369, 98-106.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.021>
- Breves, J.P., Watanabe, S., Kaneko, T., Hirano, T., Grau, E.G., 2010. Prolactin restores branchial mitochondrion-rich cells expressing Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter in hypophysectomized Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 299, R702-R710. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00213.2010>
- Brunet, F.G., Crollius, H.R., Paris, M., Aury, J.-M., Gibert, P., Jaillon, O., Laudet, V., Robinson-Rechavi, M., 2006. Gene Loss and Evolutionary Rates Following Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1808-1816. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl049>
- Bu, G., Liang, X., Li, J., Wang, Y., 2015. Extra-pituitary prolactin (PRL) and prolactin-like protein (PRL-L) in chickens and zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 220, 143-153.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.001>
- Carroll, A., 2014. Population Dynamics of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in. Bangor University.
- Cataudella, S., Allegrucci, G., Bronzi, P., Cataldi, E., Cioni, C., Corti, M., Crosetti, D., De Merich, D., Fortunato, C., Garibaldi, L., others, 1991. Multidisciplinary approach to the optimisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) rearing in freshwater--Basic morpho-physiology and osmoregulation. *Aquacult. Env* 14, 56-57.
- Changwei, S., Qiye, L., Songlin, C., Pei, Z., Jinmin, L., Qiaomu, H., Bing, S., Lijun, J., Shanshan, L., Zongji, W., Shao, C., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Lian, J., Hu, Q., Sun, B., Jin, L., Liu, S., Wang, Z., Zhao, H., Jin, Z., Liang, Z., Li, Y., Zheng, Q., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, G., 2014. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Res.* 24, 604-615. <https://doi.org/10.1101/gr.162172.113>
- Chaoui, L., Gagnaire, P.-A., Guinand, B., Quignard, J.-P., Tsigenopoulos, C., Kara, M.H., Bonhomme, F., 2012. Microsatellite length variation in candidate genes correlates with habitat in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Mol. Ecol.* 21, 5497-5511. <https://doi.org/10.1111/mec.12062>
- Chasiotis, H., Effendi, J.C., Kelly, S.P., 2009. Occludin expression in goldfish held in ion-poor water. *J. Comp. Physiol. B* 179, 145-154. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0297-1>
- Chasiotis, H., Kolosov, D., Bui, P., Kelly, S.P., 2012. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 269-281.

<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.020>

- Chen, M., Huang, X., Yuen, D.S.H., Cheng, C.H.K., 2011. A study on the functional interaction between the GH/PRL family of polypeptides with their receptors in zebrafish: Evidence against GHR1 being the receptor for somatolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 337, 114-121.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.006>
- Chen, X.L., Zhang, B., Chng, Y.R., Ong, J.L.Y., Chew, S.F., Wong, W.P., Lam, S.H., Ip, Y.K., 2017. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 Is Expressed in Two Distinct Types of Ionocyte, and Probably Augments Ammonia Excretion in One of Them, in the Gills of the Climbing Perch Exposed to Seawater. *Front. Physiol.* 8.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00880>
- Chodavarapu, R.K., Feng, S., Bernatavichute, Y. V, Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., Hetzel, J.A., Kuo, F., Kim, J., Cokus, S.J., Casero, D., Bernal, M., Huijser, P., Clark, A.T., Krämer, U., Merchant, S.S., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., others, Casero, D., Bernal, M., Huijser, P., Clark, A.T., Krämer, U., Merchant, S.S., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* 466, 388-392. <https://doi.org/10.1038/nature09147>
- Claiborne, J.B., Blackston, C.R., Choe, K.P., Dawson, D.C., Harris, S.P., Mackenzie, L. a, Morrison-Shetlar, a I., 1999. A mechanism for branchial acid excretion in marine fish: identification of multiple Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NHE) isoforms in gills of two seawater teleosts. *J. Exp. Biol.* 202, 315-324.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319. <https://doi.org/10.1002/jez.10125>
- Conides, A.J., Glamuzina, B., 2001. Study on the effects of rearing density, temperature and salinity on hatching performance of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquac. Int.* 9, 217-224.  
<https://doi.org/10.1023/A:1015330608607>
- Cooney, C.A., Dave, A.A., Wolff, G.L., 2002. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* 132, 2393S--2400S.
- Cuenot, L., 1925. L'Adaptation, Paris, G. Doin Co.
- Dauder, S., Young, G., Hass, L., Bern, H.A., 1990. Prolactin receptors in liver, kidney, and gill of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Characterization and effect of salinity on specific binding of iodinated ovine prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 368-377. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90226-C](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90226-C)
- Deans, C., Maggert, K.A., 2015. What Do You Mean, "Epigenetic"? *Genetics* 199, 887-896.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Demaurex, N., Grinstein, S., 1994. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *J. Exp. Biol.* 196, 389-404.
- Dendrinou, P., Thorpe, J.P., 1985. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture* 49, 333-358.
- Derome, N., Duchesne, P., Bernatchez, L., 2006. Parallelism in gene transcription among sympatric lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchell) ecotypes. *Mol. Ecol.* 15, 1239-1249.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02968.x>
- Duan, D., Zhong, J., Hermoso, M., Satterwhite, C.M., Rossow, C.F., Hatton, W.J., Yamboliev, I., Horowitz, B., Hume, J.R., 2001. Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus oocytes* by anti-CIC-3 antibody. *J. Physiol.* 531, 437-444.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0437i.x>
- Dufour, S., Marchelidon, J., Milet, C., Querat, B., Salmon, C., 1994. Méthodologie de l'étude endocrinienne d'une espèce sauvage, l'Anguille. *Bull. Français la Pêche la Piscic.* 147-169.  
<https://doi.org/10.1051/kmae:1994011>
- Dymowska, A.K., Hwang, P.P., Goss, G.G., 2012. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 282-292. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.025>
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K., 1999. Équilibre ionique et osmotique. *Physiol. Anim. Mécanismes Adapt.* Boeck Univ. Bruxelles, Paris 571-626.
- Edery, M., Young, G., Bern, H.A., Steiny, S., 1984. Prolactin receptors in tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) tissues: Binding studies using 125I-labeled ovine prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 19-23.  
[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(84\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90056-X)
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Edwards, S.L., Weakley, J.C., Diamanduros, A.W., Claiborne, J.B., 2010. Molecular identification of Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchanger isoforms (NHE2) in the gills of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish Biol.* 76, 415-426. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02534.x>
- Eirin-Lopez, J.M., Putnam, H.M., 2019. Marine Environmental Epigenetics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 11, 335-368. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010318-095114>
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A., 1996. Laser Capture Microdissection. *Science* (80- ). 274, 998-1001. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.998>
- Eroldoğan, O.T., Kumlu, M., 2002. Growth performance, body traits and fillet composition of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in various salinities and fresh water. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 26, 993-1001.
- Esbaugh, A.J., Grosell, M., 2014. Esophageal desalination is mediated by Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> exchanger-2 in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 171, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.012>
- Evans, D.H., 2008. Osmotic and ionic regulation : cells and animals. CRC Press.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85, 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- FAO, 2019, 2019. Year book of Fisheries Statistics, Food and A. ed. Rome.
- Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y.P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., others, Ukomadu, C., Sadler, K.C., Pradhan, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8689-8694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>
- Fiol, D.F., Kültz, D., 2007. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS J.* 274, 5790-5798. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06099.x>
- Fiol, D.F., Sanmarti, E., Sacchi, R., Kultz, D., 2009. A novel tilapia prolactin receptor is functionally distinct from its paralog. *J. Exp. Biol.* 212, 2007-2015. <https://doi.org/10.1242/jeb.025601>
- Fletcher, M., Kelly, S.P., Pärt, P., O'Donnell, M.J., Wood, C.M., 2000. Transport properties of cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: A novel preparation with mitochondria-rich cells. *J. Exp. Biol.* 203, 1523-1537.
- Flores, K.B., Wolschin, F., Amdam, G. V., 2013. The Role of Methylation of DNA in Environmental Adaptation. *Integr. Comp. Biol.* 53, 359-372. <https://doi.org/10.1093/icb/ict019>
- Friedman, A.R., Reverdin, G., Khodri, M., Gastineau, G., 2017. A new record of Atlantic sea surface salinity from 1896 to 2013 reveals the signatures of climate variability and long-term trends. *Geophys. Res. Lett.* <https://doi.org/10.1002/2017GL072582>
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1827-1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- Fryer, J.N., 1979. Prolactin-binding sites in tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) kidney. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39, 397-403. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90137-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90137-0)
- Gao, L., GENG, Y., Li, B.O., Chen, J., YANG, J.I., 2010. Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation. *Plant. Cell Environ.* 33, 1820-1827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02186.x>
- García De León, F.J., Chikhi, L., Bonhomme, F., 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.* 6, 51-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.t01-1-00151.x>
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG Islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Garg, R., Narayana Chevala, V., Shankar, R., Jain, M., 2015. Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Sci. Rep.* 5, 1-16. <https://doi.org/10.1038/srep14922>
- Genz, J., Esbaugh, A.J., Grosell, M., 2011. Intestinal transport following transfer to increased salinity in an

- anadromous fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 159, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.011>
- Gibson, J.R., Najjar, R.G., 2000. The response of Chesapeake Bay salinity to climate-induced changes in streamflow. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1764-1772. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1764>
- Gibson, R.N., Barnes, M., Atkinson, R.J.A., 2002. Impact of changes in flow of freshwater on estuarine and open coastal habitats and the associated organisms, *Oceanography and marine biology: an annual review*. CRC.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J.S., MILLS, J.A., MERILÄ, J., Genetics, E., Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J.S., MILLS, J.A., MERILÄ, J., 2008. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Mol. Ecol.* 17, 167-178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03413.x>
- Giffard-Mena, I., Lorin-Nebel, C., Charmantier, G., Castille, R., Boulo, V., 2008. Adaptation of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) to fresh water: Role of aquaporins and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 150, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.04.004>
- Gilles, R., Anctil, M., Baguet, F., Charmantier, G., 2006. *Physiologie animale*.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 212, 1647-1661. <https://doi.org/10.1242/jeb.029181>
- Glasauer, S.M.K.K., Neuhaus, S.C.F.F., 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics* 289, 1045-1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
- González-Wangüemert, M., Vergara-Chen, C., 2014. Environmental variables, habitat discontinuity and life history shaping the genetic structure of *Pomatoschistus marmoratus*. *Helgol. Mar. Res.* 68, 357-371. <https://doi.org/10.1007/s10152-014-0396-1>
- Gowher, H., Leismann, O., Jeltsch, A., 2000. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J.* 19, 6918-6923. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6918>
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., Meissner, A., 2011. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 6, 468-481. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.190>
- Gualdi, S., Somot, S., Li, L., Artale, V., Adani, M., Bellucci, A., Braun, A., Calmanti, S., Carillo, A., Dell'Aquila, A., Déqué, M., Dubois, C., Elizalde, A., Harzallah, A., Jacob, D., L'Hévéder, B., May, W., Oddo, P., Ruti, P., Sanna, A., Sannino, G., Scoccimarro, E., Sevault, F., Navarra, A., 2013a. The CIRCE Simulations: Regional Climate Change Projections with Realistic Representation of the Mediterranean Sea. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 94, 65-81. <https://doi.org/10.1175/BAMS-D-11-00136.1>
- Gualdi, S., Somot, S., May, W., Castellari, S., Déqué, M., Adani, M., Artale, V., Bellucci, A., Breitgand, J.S., Carillo, A., Cornes, R., Dell'Aquila, A., Dubois, C., Efthymiadis, D., Elizalde, A., Gimeno, L., Goodess, C.M., Harzallah, A., Krichak, S.O., Kuglitsch, F.G., Leckebusch, G.C., L'Hévéder, B., Li, L., Lionello, P., Luterbacher, J., Mariotti, A., Navarra, A., Nieto, R., Nissen, K.M., Oddo, P., Ruti, P., Sanna, A., Sannino, G., Scoccimarro, E., Sevault, F., Struglia, M.V., Toreti, A., Ulbrich, U., Xoplaki, E., 2013b. Future Climate Projections. p. 53-118. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5781-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5781-3_3)
- Guh, Y.-J.J., Lin, C.-H.H., Hwang, P.-P.P., 2015. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J.* 14, 627-59. <https://doi.org/10.17179/excli2015-246>
- Guinand, B., Quéré, N., Cerqueira, F., Desmarais, E., Bonhomme, F., 2014. Fitness difference between cryptic salinity-related phenotypes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Sci. Mar.* 78, 493-503. <https://doi.org/10.3989/scimar.03992.02C>
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hartono, S.R., Korf, I.F., Chédin, F., 2015. GC skew is a conserved property of unmethylated CpG island promoters across vertebrates. *Nucleic Acids Res.* gkv811. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv811>
- Hiroi, J., 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter and CFTR anion channel. *J. Exp. Biol.* 208, 2023-2036. <https://doi.org/10.1242/jeb.01611>
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 136, 593-620. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00287-2)
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological*



evolution. Oxford University Press.

- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A., 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* 59, 190-203. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2613-z>
- Holland, L.Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, È., Blow, M.J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L.J., others, 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 18, 1100-1111.
- Holliday, R., 2006. Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics* 1, 76-80. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.J.E.J.J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hsu, H.H., Lin, L.Y., Tseng, Y.C., Horng, J.L., Hwang, P.P., 2014. A new model for fish ion regulation: Identification of ionocytes in freshwater- and seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.* 357, 225-243. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1883-z>
- Huang, X., Jiao, B., Fung, C.K., Zhang, Y., Ho, W.K.K.K., Chan, C.B., Lin, H., Wang, D., Cheng, C.H.K.K., 2007. The presence of two distinct prolactin receptors in seabream with different tissue distribution patterns, signal transduction pathways and regulation of gene expression by steroid hormones. *J. Endocrinol.* 194, 373-392. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0076>
- Huang, X., Li, S., Ni, P., Gao, Y., Jiang, B., Zhou, Z., Zhan, A., 2017. Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives. *Mol. Ecol.* 26, 6621-6633. <https://doi.org/10.1111/mec.14382>
- Hwang, J., Kim, S., Seo, Y., Lee, K., Park, C., Choi, Y., Kim, D., Gilad, A.A., Choi, J., 2018. Mechanisms of Salinity Control in Sea Bass. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 23, 271-277. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0049-3>
- Hwang, P.-P., 2009. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* 212, 1745-1752. <https://doi.org/10.1242/jeb.026054>
- Hwang, P.-P., Chou, M.-Y., 2013. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 1233-1247. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1269-1>
- Hwang, P.-P., Lee, T.-H., Lin, L.-Y., 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 301, R28-R47. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00047.2011>
- Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 479-497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.416>
- Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2013. Gill ionic transport, acid-base regulation, and nitrogen excretion, in: *The physiology of fishes*. p. 205-233.
- Hwang, P.P., Sun, C.M., Wu, S.M., 1989. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Mar. Biol.* 100, 295-299. <https://doi.org/10.1007/BF00391142>
- Imaoka, T., Matsuda, M., Mori, T., 2000. Extrapituitary Expression of the Prolactin Gene in the Goldfish, African Clawed Frog and Mouse. *Zoolog. Sci.* 17, 791-796. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.791>
- Inokuchi, M., Breves, J.P., Moriyama, S., Watanabe, S., Kaneko, T., Lerner, D.T., Grau, E.G., Seale, A.P., 2015. Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309, R1251-63. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00168.2015>
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., others, 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431, 946.
- Jeltsch, A., 2010. Molecular biology. Phylogeny of methylomes. *Science* 328, 837-838. <https://doi.org/10.1126/science.1190738>
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282, 290-300. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19981015\)282:3<290::AID-JEZ2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19981015)282:3<290::AID-JEZ2>3.0.CO;2-H)
- Jjingo, D., Conley, A.B., Yi, S. V., Lunyak, V. V., Jordan, I.K., 2012. On the presence and role of human gene-body

- DNA methylation. *Oncotarget* 3, 462-474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.497>
- Jo, S.-S., Choi, S.S., 2019. Analysis of the Functional Relevance of Epigenetic Chromatin Marks in the First Intron Associated with Specific Gene Expression Patterns. *Genome Biol. Evol.* 11, 786-797. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz033>
- Kaneko, T., Watanabe, S., Lee, K.K.M., 2008. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. Terrapub, Yokyo.
- Kara, M.H., Quignard, J.-P., 2018. *Fishes in Lagoons and Estuaries in the Mediterranean 1*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119452751>
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., others, 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447, 714.
- Katoh, F., Hasegawa, S., Kita, J., Takagi, Y., Kaneko, T., 2001. Distinct seawater and freshwater types of chloride cells in killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Can. J. Zool.* 79, 822-829. <https://doi.org/10.1139/cjz-79-5-822>
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-29>
- Kelley, D.F., Farm, O., 1988. The importance of estuaries for sea-bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Biol.* 33, 25-33. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05555.x>
- Keys, A., Willmer, E.N., 1932. « Chloride secreting cells » in the gills of fishes, with special reference to the common eel. *J. Physiol.* 76, 368-378.2.
- Kiilerich, P., Kristiansen, K., Madsen, S.S., 2007. Hormone receptors in gills of smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*: Expression of growth hormone, prolactin, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.018>
- Korthauer, K., 2017. Detection and inference of differentially methylated regions from bisulfite sequencing Differential methylation Differential methylation commonly studied in.
- Kozak, G.M., Brennan, R.S., Berdan, E.L., Fuller, R.C., Whitehead, A., 2014. Functional and population genomic divergence within and between two species of killifish adapted to different osmotic niches. *Evolution (N. Y.)* 68, 63-80. <https://doi.org/10.1111/evo.12265>
- Krueger, F., 2012. Trim Galore: a wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries. URL [http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). (Date access 28/04/2016).
- Krueger, F., Andrews, S.R., 2011. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27, 1571-1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science (80- )* 319, 1827-1830.
- Kültz, D., 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J. Exp. Biol.* 218, 1907-1914. <https://doi.org/10.1242/jeb.118695>
- Kültz, D., 2012a. Osmosensing. *Fish Physiol.* 32, 45-68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00002-5>
- Kültz, D., 2012b. The combinatorial nature of osmosensing in fishes. *Physiology* 27, 259-275. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2012>
- Kumai, Y., Perry, S.F., 2012. Mechanisms and regulation of Na<sup>+</sup> uptake by freshwater fish. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.06.009>
- Kwong, R.W.M., Perry, S.F., 2016. A role for sodium-chloride cotransporters in the rapid regulation of ion uptake following acute environmental acidosis: new insights from the zebrafish model. *Am. J. Physiol. Physiol.* 311, C931-C941. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00180.2016>
- L'Honoré, T., 2019. Plasticité phénotypique et variabilité intraspecificue de la tolérance à la dessalure chez le loup méditerranéen *Dicentrarchus labrax*.
- L'Honoré, T., Farcy, E., Blondeau-Bidet, E., Lorin-Nebel, C., 2020. Inter-individual variability in freshwater tolerance is related to transcript level differences in gill and posterior kidney of European sea bass. *Gene* 741, 144547. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144547>
- L'Honoré, T., Farcy, E., Chatain, B., Gros, R., Ruelle, F., Hermet, S., Blondeau-Bidet, E., Naudet, J., Catherine, L.-N.N., Lorin-Nebel, C., Thibaut, L.H., Emilie, F., Béatrice, C., Romain, G., François, R., Sophie, H., Eva, B.B.,

- Jeanne, N., Catherine, L.-N.N., 2019. Are European sea bass as euryhaline as expected? Intraspecific variation in freshwater tolerance. *Mar. Biol.* 166, 102. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3551-z>
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsigirgos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J., Wei, C.-L., 2010. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 20, 320-331. <https://doi.org/10.1101/gr.101907.109>
- Laurent, P., Chevalier, C., Wood, C.M., 2006. Appearance of cuboidal cells in relation to salinity in gills of *Fundulus heteroclitus*, a species exhibiting branchial Na<sup>+</sup> but not Cl<sup>-</sup> uptake in freshwater. *Cell Tissue Res.* 325, 481-492. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0187-3>
- Le Guyader, H., Lecointre, G., 2013. Classification phylogénétique du vivant vol.2 Plantes à fleurs - Cnidaires - Insectes - Squamates - Oiseaux - Téléostéens, Belin scie. ed.
- Lecointre, G., Gallut, C., Chanet, B., Dettaï, A., 2010. Du rififi chez les poissons. *Pour Sci.* 56-63.
- Lee, K.M., Kaneko, T., Aida, K., 2006. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 318-328. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.003>
- Lee, Y.-C., Yan, J.-J., Cruz, S.A., Horng, J.-L., Hwang, P.-P., 2010. Anion exchanger 1b, but not sodium-bicarbonate cotransporter 1b, plays a role in transport functions of zebrafish H<sup>+</sup> -ATPase-rich cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 300, C295-C307. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00263.2010>
- Leguen, I., Cauty, C., Odjo, N., Corlu, A., Prunet, P., 2007. Trout gill cells in primary culture on solid and permeable supports. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 903-912. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.09.007>
- Leguen, I., Le Cam, A., Montfort, J., Peron, S., Fautrel, A., 2015. Transcriptomic analysis of trout gill ionocytes in fresh water and sea water using laser capture microdissection combined with microarray analysis. *PLoS One* 10, 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139938>
- Lemaire, C., Allegrucci, G., Naciri, M., Bahri-Sfar, L., Kara, H., Bonhomme, F., 2000. Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Mol. Ecol.* 9, 457-467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00884.x>
- Lev Maor, G., Yearim, A., Ast, G., 2015. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* 31, 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.002>
- Li, E., Zhang, Y., 2014. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019133-a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>
- Li, H., Chen, D., Zhang, J., 2012. Analysis of Intron Sequence Features Associated with Transcriptional Regulation in Human Genes. *PLoS One* 7, e46784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046784>
- Li, J., Harris, R.A., Cheung, S.W., Coarfa, C., Jeong, M., Goodell, M.A., White, L.D., Patel, A., Kang, S.H., Shaw, C., Chinault, A.C., Gambin, T., Gambin, A., Lupski, J.R., Milosavljevic, A., 2012. Genomic hypomethylation in the human germline associates with selective structural mutability in the human genome. *PLoS Genet.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002692>
- Li, S., He, F., Wen, H., Li, J., Si, Y., Liu, M., He, H., Huang, Z., 2017a. Analysis of DNA methylation level by methylation-sensitive amplification polymorphism in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) subjected to salinity stress. *J. Ocean Univ. China* 16, 269-278. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3156-4>
- Li, S., He, F., Wen, H., Li, J., Si, Y., Liu, M., Huang, Y., Meng, L., 2017b. Low salinity affects cellularity, DNA methylation, and mRNA expression of igf1 in the liver of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiol. Biochem.* 43, 1587-1602. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0395-7>
- Lin, Y.M., Chen, C.N., Yoshinaga, T., Tsai, S.C., Shen, I.D., Lee, T.H., 2006. Short-term effects of hyposmotic shock on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 143, 406-415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.12.031>
- Lira-Medeiros, C.F., Parisod, C., Fernandes, R.A., Mata, C.S., Cardoso, M.A., Ferreira, P.C.G., 2010. Epigenetic Variation in Mangrove Plants Occurring in Contrasting Natural Environment. *PLoS One* 5, e10326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010326>
- Liu, S.-T.T., Horng, J.-L.L., Chen, P.-Y.Y., Hwang, P.-P.P., Lin, L.-Y.Y., 2016. Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: new insights into the salt-secreting mechanism. *Sci. Rep.* 6, 31433. <https://doi.org/10.1038/srep31433>
- Loder, J.W., van der Baaren, A., Yashayaev, I., 2015. Climate Comparisons and Change Projections for the Northwest Atlantic from Six CMIP5 Models. *Atmosphere-Ocean* 53, 529-555. <https://doi.org/10.1080/07055900.2015.1087836>

- Lorin-Nebel, C., Boulo, V., Bodinier, C., Charmantier, G., 2006. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 209, 4908-4922. <https://doi.org/10.1242/jeb.02591>
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., Maleszka, R., 2010. The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biol.* 8, e1000506. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000506>
- Macqueen, D.J., Johnston, I.A., 2014. A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132881. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2881>
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K.D., Tatusova, T., 2011. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 39, D52-D57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1237>
- Majewski, J., 2002. Distribution and Characterization of Regulatory Elements in the Human Genome. *Genome Res.* 12, 1827-1836. <https://doi.org/10.1101/gr.606402>
- Manzon, L.A., 2002. The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation: A Review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 291-310. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7746>
- Marshall, W., Bryson, S., 1998. Transport Mechanisms of Seawater Teleost Chloride Cells: An Inclusive Model of a Multifunctional Cell. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 119, 97-106. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(97\)00402-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(97)00402-9)
- Marshall, W.S., 2002. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264-283. <https://doi.org/10.1002/jez.10127>
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Luby, T., 2000. Control of epithelial Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 203, 1897-1905.
- Marshall, W.S., Grosell, M., 2006. Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. *Physiol. fishes* 3, 179-214.
- Marshall, W.S., Katoh, F., Main, H.P., Sers, N., Cozzi, R.R.F., 2008. Focal adhesion kinase and β1 integrin regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter in osmosensing ion transporting cells of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 150, 288-300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.013>
- Masroor, W., Farcy, E., Blondeau-Bidet, E., Venn, A., Tambutté, E., Lorin-Nebel, C., 2019. Effect of salinity and temperature on the expression of genes involved in branchial ion transport processes in European sea bass. *J. Therm. Biol.* 85, 102422. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102422>
- Masroor, W., Farcy, E., Gros, R., Lorin-Nebel, C., 2017. Effect of combined stress (salinity and temperature) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory processes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.019>
- Massicotte, R., Angers, B., 2012. General-Purpose Genotype or How Epigenetics Extend the Flexibility of a Genotype. *Genet. Res. Int.* 2012, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2012/317175>
- Mattick, J.S., 2001. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2, 986-991. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve230>
- Mazon, A.F., Nolan, D.T., Lock, R.A.C., Fernandes, M.N., Wendelaar Bonga, S.E., 2004. A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Toxicol. Vitro.* 18, 691-701. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.008>
- McCairns, R.J.S., Bernatchez, L., 2010. Adaptive divergence between freshwater and marine sticklebacks: insights into the role of phenotypic plasticity from an integrated analysis of candidate gene expression. *Evolution (N. Y.)* 64, 1029-1047. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00886.x>
- McCormick, S.D., 2011. Hormonal control of metabolism and ionic regulation | The Hormonal Control of Osmoregulation in Teleost Fish, *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00212-4>
- McCormick, S.D., 1995. 11 Hormonal Control of Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Chloride Cell Function, in: *Fish Physiology*. p. 285-315. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60250-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60250-2)
- McCormick, S.D., Bern, H.A., 1989. In vitro stimulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 256, 707-715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.3.r707>

- McCormick, S.D., Bradshaw, D., 2006. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.009>
- McCormick, S.D., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Éd.), 2013. *Fish Physiology: Euryhaline Fishes*, Volume 32, Academic P. ed.
- McCormick, S.D., Regish, A., O'Dea, M.F., Shrimpton, J.M., 2008. Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.03.024>
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2-15. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00024-7)
- Metzger, D.C.H., Schulte, P.M., 2018. The DNA Methylation Landscape of Stickleback Reveals Patterns of Sex Chromosome Evolution and Effects of Environmental Salinity. *Genome Biol. Evol.* 10, 775-785. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy034>
- Meyer, A., Van De Peer, Y., 2005. From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays* 27, 937-945. <https://doi.org/10.1002/bies.20293>
- Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., Sarropoulou, E., 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 153, 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.04.009>
- Morán, P., Marco-Rius, F., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., 2013. Environmental induced methylation changes associated with seawater adaptation in brown trout. *Aquaculture* 392-395, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.006>
- Mori, T., Hiraka, I., Kurata, Y., Kawachi, H., Kishida, O., Nishimura, K., 2005. Genetic basis of phenotypic plasticity for predator-induced morphological defenses in anuran tadpole, *Rana pirica*, using cDNA subtraction and microarray analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1138-1145. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.091>
- Moriyama, Y., Koshiba-Takeuchi, K., 2018. Significance of whole-genome duplications on the emergence of evolutionary novelties. *Brief. Funct. Genomics* 17, 329-338. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ely007>
- Motenko, H., Neuhauser, S.B., O'Keefe, M., Richardson, J.E., 2015. MouseMine: a new data warehouse for MGI. *Mamm. Genome* 26, 325-330. <https://doi.org/10.1007/s00335-015-9573-z>
- Naciri, M., 1999. Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Hered.* 90, 591-596. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.6.591>
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F., 2011. DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genet.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447>
- Nebel, C., Nègre-Sadargues, G., Blasco, C., Charmantier, G., 2005a. Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Anat. Embryol. (Berl.)* 209, 193-206. <https://doi.org/10.1007/s00429-004-0438-6>
- Nebel, C., Romestand, B., Negre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F., Charmantier, G., Nègre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F., Charmantier, G., 2005b. Differential freshwater adaptation in juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. *J. Exp. Biol.* 208, 3859-3871. <https://doi.org/10.1242/jeb.01853>
- Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., 2016. *Fishes of the World* Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Nordlie, F.G., 2009. Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: a review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 19, 481-564. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9131-4>
- Ohno, S., 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970--1999, in: *Seminars in cell & developmental biology*. p. 517-522.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer Science & Business Media, Berlin, Heidelberg, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-86659-3>
- Ohno, S., Wolf, U., Atkin, N.B., 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59, 169-187. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1968.tb02169.x>
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Korzan, W., Summers, C.H., Nilsson, G.E., 2007.

- Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 396-412.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.10.006>
- Parey, E., Louis, A., Cabau, C., Guiguen, Y., Crollius, H.R., Berthelot, C., 2020. Synteny-guided resolution of gene trees clarifies the functional impact of whole genome duplications. *Mol. Biol. Evol.*  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa149>
- Park, J., Peng, Z., Zeng, J., Elango, N., Park, T., Wheeler, D., Werren, J.H., Yi, S. V., 2011. Comparative Analyses of DNA Methylation and Sequence Evolution Using *Nasonia* Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3345-3354.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr168>
- Parks, S.K., Tresguerres, M., Goss, G.G., 2008. Theoretical considerations underlying Na<sup>+</sup> uptake mechanisms in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 411-418.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.03.002>
- Perry, S.F., Davie, P.S., Daxboeck, C., Ellis, A.G., Smith, D.G., 1984. 10 Perfusion Methods for the Study of Gill Physiology, *Fish Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60189-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60189-2)
- Perry, S.F., Shahsavarani, a, Georgalis, T., Bayaa, M., Furimsky, M., Thomas, S.L.Y., 2003. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 300, 53-62. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10309>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e - 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pickett, G.D., Pawson, M.G., 1994. *Sea Bass: Biology, exploitation and conservation* Vol. 12, Fish and F. ed. Chapman and Hall, London.
- Pickford, G.E., Phillips, J.G., 1959. Prolactin, a Factor in Promoting Survival of Hypophysectomized Killifish in Fresh Water. *Science (80- )*. 130, 454-455. <https://doi.org/10.1126/science.130.3373.454>
- Pierce, D.W., Gleckler, P.J., Barnett, T.P., Santer, B.D., Durack, P.J., 2012. The fingerprint of human-induced changes in the ocean's salinity and temperature fields. *Geophys. Res. Lett.* 39, n/a-n/a.  
<https://doi.org/10.1029/2012GL053389>
- Postlethwait, J.H., 2000. Zebrafish Comparative Genomics and the Origins of Vertebrate Chromosomes. *Genome Res.* 10, 1890-1902. <https://doi.org/10.1101/gr.164800>
- Postlethwait, J.H., Amores, A., Cresko, W., Singer, A., Yan, Y.-L., 2004. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* 20, 481-490.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.001>
- Prunet, P., Auperin, B., 1994. Prolactin receptors, in: Sherwood, N.M., Hew, C.L. (Éd.), *Molecular endocrinology of fish*. p. 367-391.
- Przeslowski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2122-2140.  
<https://doi.org/10.1111/gcb.12833>
- Putnam, N.H., Butts, T., Ferrier, D.E.K., Furlong, R.F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K., others, 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064.
- Quinlan, A.R., 2014. BEDTools: The Swiss-Army Tool for Genome Feature Analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 47, 11.12.1-11.12.34. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1112s47>
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., Manke, T., 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160-W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Rankin, J.C., Davenport, J., 1981. Animal osmoregulation.
- Rey, S., Ribas, L., Morera Capdevila, D., Callol, A., Huntingford, F.A., Pilarczyk, M., Kadri, S., Mackenzie, S., 2016. Differential responses to environmental challenge by common carp *Cyprinus carpio* highlight the importance of coping style in integrative physiology. *J. Fish Biol.* 88, 1056-1069.  
<https://doi.org/10.1111/jfb.12877>
- Richards, E.J., 2006. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 7, 395.
- Rossow, C.F., Duan, D., Hatton, W.J., Britton, F., Hume, J.R., Horowitz, B., 2006. Functional role of amino terminus in ClC-3 chloride channel regulation by phosphorylation and cell volume. *Acta Physiol.* 187, 5-19.  
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01550.x>



- Roth, M., Abnet, C., Hu, N., Wang, Q.-H., Wei, W.-Q., Green, L., D'Alelio, M., Qiao, Y.-L., Dawsey, S., Taylor, P., Woodson, K., 2006. p16, MGMT, RAR $\beta$ 2, CLDN3, CRBP and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Oncol. Rep.* <https://doi.org/10.3892/or.15.6.1591>
- Rottach, A., Leonhardt, H., Spada, F., 2009. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J. Cell. Biochem.* 108, 43-51. <https://doi.org/10.1002/jcb.22253>
- RStudio Team, 2019. RStudio: Integrated Development Environment for R.
- Sabriye, A.S., Reay, P.J., Coombs, S.H., 1988. Sea-bass larvae in coastal and estuarine plankton. *J. Fish Biol.* 33, 231-233. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05580.x>
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.008>
- Sakamoto, T., Uchida, K., Yokota, S., 2001. Regulation of the Ion-Transporting Mitochondrion-Rich Cell during Adaptation of Teleost Fishes to Different Salinities. *Zoolog. Sci.* 18, 1163-1174. <https://doi.org/10.2108/zsj.18.1163>
- Santos, C.R.A., Ingleton, P.M., Cavaco, J.E.B., Kelly, P.A., Edery, M., Power, D.M., 2001. Cloning, characterization, and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 32-47. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7553>
- Schartl, M., Walter, R.B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch, I., Chalopin, D., Volff, J.-N., Lesch, K.-P., others, 2013. The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. *Nat. Genet.* 45, 567.
- Schnell, S., Stott, L.C., Hogstrand, C., Wood, C.M., Kelly, S.P., Pärt, P., Owen, S.F., Bury, N.R., 2016. Procedures for the reconstruction, primary culture and experimental use of rainbow trout gill epithelia. *Nat. Protoc.* 11, 490-498. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.029>
- Schultz, E.T., McCormick, S.D., 2012. Euryhalinity in An Evolutionary Context, in: *Fish Physiology*. Elsevier Inc., p. 477-533. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00010-4>
- Scott, G.R., 2004. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *J. Exp. Biol.* 207, 3399-3410. <https://doi.org/10.1242/jeb.01130>
- Scott, G.R., Richards, J.G., Forbush, B., Isenring, P., Schulte, P.M., 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C300-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00054.2004>
- Scott, G.R., Schulte, P.M., 2005. Intraspecific variation in gene expression after seawater transfer in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 141, 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.05.002>
- Seale, A.P., Moorman, B.P., Stagg, J.J., Breves, J.P., Lerner, D.T., Grau, E.G., 2012a. Prolactin177, prolactin188 and prolactin receptor 2 in the pituitary of the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, are differentially osmosensitive. *J. Endocrinol.* 213, 89-98. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0384>
- Seale, A.P., Stagg, J.J., Yamaguchi, Y., Breves, J.P., Soma, S., Watanabe, S., Kaneko, T., Cnaani, A., Harpaz, S., Lerner, D.T., Grau, E.G., 2014. Effects of salinity and prolactin on gene transcript levels of ion transporters, ion pumps and prolactin receptors in Mozambique tilapia intestine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 206, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.020>
- Seale, A.P., Watanabe, S., Breves, J.P., Lerner, D.T., Kaneko, T., Gordon Grau, E., 2012b. Differential regulation of TRPV4 mRNA levels by acclimation salinity and extracellular osmolality in euryhaline tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.020>
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 401-429. <https://doi.org/10.1007/BF00042888>
- Shih, T.-H., Horng, J.-L., Hwang, P.-P., Lin, L.-Y., 2008. Ammonia excretion by the skin of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Am. J. Physiol. Physiol.* 295, C1625-C1632. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00255.2008>
- Shih, T.-H., Horng, J.-L., Liu, S.-T., Hwang, P.-P., Lin, L.-Y., 2012. Rhcg1 and NHE3b are involved in ammonium-dependent sodium uptake by zebrafish larvae acclimated to low-sodium water. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R84-R93. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00318.2011>
- Siepielski, A.M., Morrissey, M.B., Buoro, M., Carlson, S.M., Caruso, C.M., Clegg, S.M., Coulson, T., DiBattista, J., Gotanda, K.M., Francis, C.D., Hereford, J., Kingsolver, J.G., Augustine, K.E., Kruuk, L.E.B., Martin, R.A., Sheldon, B.C., Sletvold, N., Svensson, E.I., Wade, M.J., MacColl, A.D.C., 2017. Precipitation drives global

- variation in natural selection. *Science* (80- ). 355, 959-962. <https://doi.org/10.1126/science.aag2773>
- Simpson, V.J., Johnson, T.E., Hammen, R.F., 1986. Caenorhabditis elegans DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Res.* 14, 6711-6719.
- Sinha, A.K., AbdElgawad, H., Zinta, G., Dasan, A.F., Rasoloniriana, R., Asard, H., Blust, R., De Boeck, G., 2015. Nutritional Status as the Key Modulator of Antioxidant Responses Induced by High Environmental Ammonia and Salinity Stress in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *PLoS One* 10, e0135091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135091>
- Souche, E.L., Hellems, B., Babbucci, M., MacAoidh, E., Guinand, B., Bargelloni, L., Chistiakov, D.A., Patarnello, T., Bonhomme, F., Martinsohn, J.T., Volckaert, F.A.M.M., 2015. Range-wide population structure of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Biol. J. Linn. Soc.* 116, 86-105. <https://doi.org/10.1111/bij.12572>
- Stevens, A., Begum, G., Cook, A., Connor, K., Rumball, C., Oliver, M., Challis, J., Bloomfield, F., White, A., 2010. Epigenetic Changes in the Hypothalamic Proopiomelanocortin and Glucocorticoid Receptor Genes in the Ovine Fetus after Periconceptional Undernutrition. *Endocrinology* 151, 3652-3664. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0094>
- Strömqvist, M., Tooke, N., Brunström, B., 2010. DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*)-Sex and tissue differences and effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol exposure. *Aquat. Toxicol.* 98, 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.023>
- Strydom, N.A., 2015. Patterns in larval fish diversity, abundance, and distribution in temperate South African estuaries. *Estuaries and coasts* 38, 268-284.
- Sumner, S., Pereboom, J.J., Jordan, W.C., 2006. Differential gene expression and phenotypic plasticity in behavioural castes of the primitively eusocial wasp, *Polistes canadensis*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 19-26. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3291>
- Takai, D., Jones, P.A., 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3740-3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>
- Takei, Y., Hiroi, J., Takahashi, H., Sakamoto, T., 2014. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R778-R792. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00104.2014>
- Takei, Y., Hwang, P.-P., 2016. Homeostatic Responses to Osmotic Stress, in: *Fish Physiology*. p. 207-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00006-0>
- Takei, Y., McCormick, S.D., 2012. Hormonal Control of Fish Euryhalinity, *Fish Physiology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00003-7>
- Talavera, G., Castresana, J., 2007. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Syst. Biol.* 56, 564-577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tan, M. pu, 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.005>
- Tang, C.-H.H., Hwang, L.-Y.Y., Shen, I.-D. Da, Chiu, Y.-H.H., Lee, T.-H.H., 2011. Immunolocalization of chloride transporters to gill epithelia of euryhaline teleosts with opposite salinity-induced Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase responses. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 709-724. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9471-6>
- Tang, C.H., Hwang, L.Y., Lee, T.H., 2010. Chloride channel CLC-3 in gills of the euryhaline teleost, *tetraodon nigroviridis*: Expression, localization and the possible role of chloride absorption. *J. Exp. Biol.* 213, 683-693. <https://doi.org/10.1242/jeb.040212>
- Tang, C.H., Lee, T.H., 2007a. The novel correlation of carbonic anhydrase II and anion exchanger 1 in gills of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 307, 411-418. <https://doi.org/10.1002/jez.391>
- Tang, C.H., Lee, T.H., 2007b. The effect of environmental salinity on the protein expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 521-528. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.679>
- Thomas, F., Lefevre, T., Raymond, M., 2010. *Biologie évolutive*.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P., 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* 14, 178-192.

<https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>

- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P.-A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R.S.T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F. a M., Bargelloni, L., Power, D.M., Bonhomme, F., Canario, A.V.M., Reinhardt, R., 2014. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nat. Commun.* 5, 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>
- Tingaud-Sequeira, A., Calusinska, M., Finn, R.N., Chauvigné, F., Lozano, J., Cerdà, J., 2010. The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol. Biol.* 10, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-38>
- Tipsmark, C.K., Baltzegar, D.A., Ozden, O., Grubb, B.J., Borski, R.J., 2008. Salinity regulates claudin mRNA and protein expression in the teleost gill. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1004-1014. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00112.2007>
- Tipsmark, C.K., Breves, J.P., Seale, A.P., Lerner, D.T., Hirano, T., Grau, E.G., 2011. Switching of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isoforms by salinity and prolactin in the gill of a cichlid fish. *J. Endocrinol.* 209, 237-244. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0495>
- Tresguerres, M., Katoh, F., Orr, E., Parks, S.K., Goss, G.G., 2006. Chloride Uptake and Base Secretion in Freshwater Fish: A Transepithelial Ion-Transport Metabolon? *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 981-996. <https://doi.org/10.1086/507658>
- Tse, W.K.R.F., Au, D.W.T., Wong, C.K.C., 2007. Effect of osmotic shrinkage and hormones on the expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gill pavement cells of freshwater adapted Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Biol.* 210, 2113-2120. <https://doi.org/10.1242/jeb.004101>
- Uchida, K., Kaneko, T., Miyazaki, H., Hasegawa, S., Hirano, T., 2000. Excellent Salinity Tolerance of Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Elevated Chloride Cell Activity in the Branchial and Opercular Epithelia of the Fish Adapted to Concentrated Seawater. *Zoolog. Sci.* 17, 149-160. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.149>
- Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.* 276, 193-200. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19961015\)276:3<193::AID-JEZ3>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19961015)276:3<193::AID-JEZ3>3.0.CO;2-I)
- Van De Peer, Y., Maere, S., Meyer, A., 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* 10, 725-732. <https://doi.org/10.1038/nrg2600>
- Vandeputte, M., Gagnaire, P. -A. A., Allal, F., 2019. The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Anim. Genet.* 50, 195-206. <https://doi.org/10.1111/age.12779>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, ilip, Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, rank, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 34-1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Varriale, A., Bernardi, G., 2006. DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene* 385, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.05.031>
- Varsamos, S., Connes, R., Diaz, J.P., Charmantier, G., 2001. Ontogeny of osmoregulation in the European sea bass. *Mar. Biol.* 138, 909-915. <https://doi.org/10.1007/s002270000522>
- Varsamos, S., Diaz, J.-P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., Connes, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. *J. Exp. Zool.* 293, 12-26. <https://doi.org/10.1002/jez.10099>
- Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G., 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 141, 401-429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.013>
- Venturini, G., Cataldi, E., Marino, G., Pucci, P., Bronzi, P., Cataudella, S., others, 1992. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces, Perciformes) during acclimation trials to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 103, 451-454.
- Vessey, J.P., Shi, C., Jollimore, C.A.B., Stevens, K.T., Coca-Prados, M., Barnes, S., Kelly, M.E.M., 2004. Hyposmotic activation of ICl<sub>swell</sub> rabbit nonpigmented ciliary epithelial cells involves increased CIC-3

- trafficking to the plasma membrane. *Biochem. Cell Biol.* 82, 708-718. <https://doi.org/10.1139/o04-107>
- Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity (Edinb.)*. 94, 280-294. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800635>
- Waddington, C.H., 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1, 18-20.
- Wan, Z.Y., Xia, J.H., Lin, G., Wang, L., Lin, V.C.L.L., Yue, G.H., 2016. Genome-wide methylation analysis identified sexually dimorphic methylated regions in hybrid tilapia. *Sci. Rep.* 6, 35903. <https://doi.org/10.1038/srep35903>
- Wang, J.-T., Li, J.-T., Zhang, X.-F., Sun, X.-W., 2012. Transcriptome analysis reveals the time of the fourth round of genome duplication in common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics* 13, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-96>
- Watanabe, S., Itoh, K., Kaneko, T., 2016. Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: Exploring with an improved gill incubation system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.04.024>
- Waymouth, C., 1972. Construction of Tissue Culture Media, Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-598301-3.50008-8>
- Wedderburn, S.D., Bailey, C.P., Delean, S., Paton, D.C., 2016. Population and osmoregulatory responses of a euryhaline fish to extreme salinity fluctuations in coastal lagoons of the Coorong, Australia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 168, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.015>
- Wen, A.Y., You, F., Sun, P., Li, J., Xu, D.D., Wu, Z.H., Ma, D.Y., Zhang, P.J., 2014. CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Biol.* 84, 193-205. <https://doi.org/10.1111/jfb.12277>
- Weng, C.F., Lee, T.H., Hwang, P.P., 1997. Immune localization of prolactin receptor in the mitochondria-rich cells of the euryhaline teleost (*Oreochromis mossambicus*) gill. *FEBS Lett.* 405, 91-94. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00162-2)
- Wheeler, H.L., 1904. Researches on pyrimidine derivatives: 5-Methylcytosine. *Am Chem J.* 31, 591-606.
- Whitehead, A., Roach, J.L., Zhang, S., Galvez, F., 2011. Genomic mechanisms of evolved physiological plasticity in killifish distributed along an environmental salinity gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6193-6198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017542108>
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2009. Environmental physiology of animals. John Wiley & Sons.
- Wilson, J.M., Laurent, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 293, 192-213. <https://doi.org/10.1002/jez.10124>
- Wilson, J.M., Laurent, P., Tufts, B.L., Benos, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Randall, D.J., 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J Exp Biol* 203, 2279-2296.
- Wilson, J.M., Whiteley, N.M., Randall, D.J., 2002. Ionoregulatory Changes in the Gill Epithelia of Coho Salmon during Seawater Acclimation. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 237-249. <https://doi.org/10.1086/341817>
- Wittbrodt, J., Meyer, A., Schartl, M., 1998. More genes in fish? *BioEssays* 20, 511-515. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199806\)20:6<511::AID-BIES10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199806)20:6<511::AID-BIES10>3.0.CO;2-3)
- Wong, A.P.S., Bindoff, N.L., Church, J.A., 1999. Large-scale freshening of intermediate waters in the Pacific and Indian oceans. *Nature* 400, 440-443. <https://doi.org/10.1038/22733>
- Wood, C.M., Pärt, P., 1997. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. *J. Exp. Biol.* 200, 1047-1059.
- Woods, I.G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D.K., Nix, R., Kelly, P.D., Chu, F., Postlethwait, J.H., Talbot, W.S., 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15, 1307-1314. <https://doi.org/10.1101/gr.4134305>
- Wright, P. A., Wood, C.M., 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *J. Exp. Biol.* 212, 2303-2312. <https://doi.org/10.1242/jeb.023085>
- Wright, Patricia A., Wood, C.M., 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *J. Exp. Biol.* 212, 2303-12. <https://doi.org/10.1242/jeb.023085>
- Wu, S.-C., Horng, J.-L., Liu, S.-T., Hwang, P.-P., Wen, Z.-H., Lin, C.-S., Lin, L.-Y., 2010. Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae. *Am. J. Physiol. Physiol.* 298, C237-C250. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00373.2009>
- Yada, T., Hyodo, S., Schreck, C.B., 2008. Effects of seawater acclimation on mRNA levels of corticosteroid receptor genes in osmoregulatory and immune systems in trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 622-627.

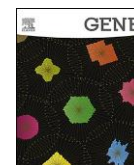
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.009>

- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., Liang, G., 2014. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* 26, 577-590.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>
- Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., He, Q.Y., 2012. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* 16, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Zadunaisky, J.A., Cardona, S., Au, L., Roberts, D.M., Fisher, E., Lowenstein, B., Cragoe, E.J., Spring, K.R., 1995. Chloride transport activation by plasma osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. *J. Membr. Biol.* 143, 207-217. <https://doi.org/10.1007/BF00233449>
- Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., Zilberman, D., 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science (80- )*. 328, 916-919. <https://doi.org/10.1126/science.1186366>
- Zhang, X., Ho, S.-M., 2011. Epigenetics meets endocrinology. *J. Mol. Endocrinol.* 46, R11-32.  
<https://doi.org/10.1677/jme-10-0053>
- Zhang, Y., Long, Z., Li, Y., Yi, S., Shi, Y., Ma, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Liu, X., Meng, Z., Huang, X., Cheng, C.H.K., Lin, H., 2010. The second prolactin receptor in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, tissue distribution and gene expression. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 283-295.  
<https://doi.org/10.1007/s10695-009-9355-1>
- Zhou, B., Kelly, S.P., Ianowski, J.P., Wood, C.M., 2003. Effects of cortisol and prolactin on Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport in cultured branchial epithelia from FW rainbow trout. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, 1305-1316. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00704.2002>
- Ziller, M.J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L.T.Y., Kohlbacher, O., De Jager, P.L., Rosen, E.D., Bennett, D.A., Bernstein, B.E., Gnirke, A., Meissner, A., 2013. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477-481. <https://doi.org/10.1038/nature12433>
- Zimmer, A.M., Shir-Mohammadi, K., Kwong, R.W.M.M., Perry, S.F., 2020. Reassessing the contribution of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhe3b to Na<sup>+</sup> uptake in zebrafish (*Danio rerio*) using CRISPR/Cas9 gene editing. *J. Exp. Biol.* 223, jeb215111. <https://doi.org/10.1242/jeb.215111>



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

Research paper

Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax*Eva Blondeau-Bidet<sup>a</sup>, Junya Hiroi<sup>b</sup>, Catherine Lorin-Nebel<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> MARBEC, Université Montpellier, UM-CNRS-IRD-IFREMER, cc 092, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, Cedex 05, France<sup>b</sup> Department of Anatomy, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Teleost  
Osmoregulation  
Ion transporters  
Na<sup>+</sup> uptake  
NHE3  
NCC2

## ABSTRACT

Ion uptake mechanisms are diverse in fish species, certainly linked to duplication events that have led to the presence of a multitude of paralogous genes. In fish, Na<sup>+</sup> uptake involves several ion transporters expressed in different ionocyte subtypes. In the European sea bass *Dicentrarchus labrax*, several key transporters potentially involved in Na<sup>+</sup> uptake have been investigated in seawater (SW) and following a 2 weeks freshwater (FW) acclimation. Using gel electrophoresis, we have shown that the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger 3 (*nhe3*, *slc9a3*) is expressed in gills and kidney at both salinities. Quantitative realtime PCR analysis showed a significantly higher *nhe3* expression in fresh water (FW) compared to SW. Its apical localization in a subset of gill ionocytes in freshwater-acclimated fish supports the role of NHE3 in Na<sup>+</sup> uptake. Interestingly, NHE3-immunopositive cells also express basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 (NKCC1) and are mainly localized in gill lamella. Among the three *nhe2* (*slc9a2*) paralogs, only *nhe2c* shows differential branchial expression levels with higher mRNA levels in SW than in FW. The increased branchial expression of the ammonia transporter *rhcg1* (Rhesus protein), *nhe3* and cytoplasmic carbonic anhydrase (*cac*) in FW could indicate the presence of a functional coupling between ion transporters to form a Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> exchange complex. Acid-sensing ion channel 4 (*asic4*) seems not to be expressed in sea bass gills. Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter (*ncc2a* or *ncc-like*) is about three times more expressed in FW compared to SW suggesting coupled Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> uptake in a subset of gill ionocytes. Besides the main pump Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, branchial NCC2a and NHE3 may be key players in ion uptake in sea bass following a long-term freshwater challenge.

## 1. Introduction

The gill is a key organ involved in Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in freshwater-acclimated fish contributing to the maintenance of body fluid ionic homeostasis. As multifunctional organ, the fish gill is also a crucial organ responsible for acid-base balance and nitrogen excretion (Dymowska et al., 2012; Hwang et al., 2011; Hwang and Lin, 2013). Among teleost species, a diversity of ionocyte subtypes have been identified in fresh water (FW) notably in zebrafish *Danio rerio*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, medaka *Oryzias latipes* and Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Dymowska et al., 2012; Hsu et al., 2014; Hwang, 2009). Apical Na<sup>+</sup> uptake mechanisms have been thoroughly discussed in teleosts in the last decade and implicate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchangers (NHEs), Na<sup>+</sup> channels (acid-sensing ion channels, ASICs) energized by an electrical gradient generated by apical V-type H<sup>+</sup> ATPase (VHA) and/or Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporters (fish-specific NCC2/

NCC-like (*slc12a10*) coupled to basolateral NKA and chloride channels (Hwang et al., 2011; Kumai and Perry, 2012). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers (SLC9A family) are considered as main actors in apical Na<sup>+</sup> uptake, acid excretion, and can be functionally coupled to ammonia excretion in fish gill ionocytes. In freshwater-type ionocyte models of several species, NHE2 and/or NHE3 have been shown to localize in apical membranes to lead to an acid-trapping mechanism facilitating NH<sub>4</sub><sup>+</sup> excretion via basolateral RHBG and apical RHCG1. Extracellular NH<sub>3</sub> then combines with H<sup>+</sup> to form NH<sub>4</sub><sup>+</sup> covering the gill boundary layer, which leads to an increase in pH and favors the functioning of NHE (2/3) to take up Na<sup>+</sup> in exchange for H<sup>+</sup> (Cooper et al., 2013; Shih et al., 2012; Weihrauch et al., 2009). In the zebrafish cell model (HR cell), NHE3b, VHA and RHCG1 seem to colocalize in apical membranes and basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is weakly expressed (Shih et al., 2008; Yan et al., 2007). NHE (2/3) has also been identified in PNA<sup>+</sup> ionocytes of rainbow trout (for a review, see Dymowska et al., 2012). NHE2a has

**Abbreviations:** ASIC, acid-sensing ion channel; CAC, cytoplasmic carbonic anhydrase; EF1 $\alpha$ , elongation factor 1 $\alpha$ ; ENaC, epithelial Na<sup>+</sup> channel; FAU, ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion gene; NBC, sodium bicarbonate cotransporter; NCC, Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter; NHE, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger; NKA, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase; NKCC, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter; RHBG/RHCG, rhesus glycoproteins; VHA, V-type H<sup>+</sup> ATPase

\* Corresponding author.

E-mail address: [Catherine.lorin@umontpellier.fr](mailto:Catherine.lorin@umontpellier.fr) (C. Lorin-Nebel).<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.006>

Received 4 October 2018; Received in revised form 12 December 2018; Accepted 2 January 2019

Available online 11 January 2019

0378-1119/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



been shown in cuboidal cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, the cell type responsible for Na<sup>+</sup> uptake (Edwards et al., 2010; Laurent et al., 2006). As VHA is expressed in basolateral membranes of killifish cuboidal cells, Na<sup>+</sup> uptake seems not to be coupled to active proton excretion in this species (Katoh et al., 2003). There is also evidence that NHE2 and NHE3 are expressed in gill ionocytes of teleosts maintained in seawater (SW), playing critical roles in acid secretion (Chen et al., 2017; Claiborne et al., 1999; Liu et al., 2016; Weihrauch et al., 2009). In many teleost species, *nhe3* mRNA expression is high in FW compared to SW (Bollinger et al., 2016; Hiroi et al., 2008; Inokuchi et al., 2008; Watanabe et al., 2008) except in the climbing perch *Anabas testudineus*, where the opposite pattern has been shown with increased *nhe3* mRNA and NHE3 protein expression in SW (Chen et al., 2017). In this latter species, NKA  $\alpha$ 1c-immunoreactive ionocytes express NHE3 and RHC2 in basolateral membranes and lack apical RHC1, the exact function of these cells remains to be determined. Several paralogs have been identified in teleosts for *nhe* (1, 2, 3) probably due to putative genome duplication events (Glasauer and Neuhauss, 2014; Meyer and Van de Peer, 2005). Two or three *nhe2* paralogous genes have been identified in *F. heteroclitus*, *Takifugu rubripes*, *Gasterosteus aculeatus*, and the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecemspinosus* but functional differences remain to be analyzed (Edwards et al., 2010). Contrary to NHE2 and 3, NHE1 has been shown to be expressed in basolateral membranes and is mainly involved in pH homeostasis and cell volume regulation of epithelial and non-epithelial cells (Tse et al., 1993). Its expression increases following exposure to environmental hypercapnia in SW of several species and has been considered as protein involved in H<sup>+</sup> excretion to compensate for intracellular acidosis (Edwards et al., 2005).

Another Na<sup>+</sup> uptake model involves an apical Na<sup>+</sup> channel electrochemically coupled to the apical VHA. As epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaC) present in mammals are not present in teleost genomes, including the European sea bass, another Na<sup>+</sup> channel might be present in apical membranes of ionocytes to take up Na<sup>+</sup> in Na<sup>+</sup>-poor environments. The presence of apical ASIC4 (acid-sensing ion channel 4) has been shown in gill ionocytes of two teleost species, the rainbow trout (in PNA<sup>+</sup> ionocytes) (Dymowska et al., 2014) and zebrafish (in HR cells) (Dymowska et al., 2015). Zebrafish HR cells express NHE3b in apical membranes suggesting colocalization of VHA, NHE3b and ASIC4 in this cell type (Guh and Hwang, 2017). ASIC4 could thus, beside NHE3b, be part of a secondary Na<sup>+</sup> uptake mechanism in these cells.

Coupled Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> uptake has been suggested to occur through Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporters from the SLC12 family. Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporters are called *ncc1* (*slc12a3*) or *ncc2* (or *ncc-like*) (*slc12a10*). The latter have been analyzed in different teleost species (Breves et al., 2014; Hiroi et al., 2008; Hsu et al., 2014; Inokuchi et al., 2017; Takei et al., 2014; Wang et al., 2009). Among different paralogs belonging to the *ncc2* family, zebrafish *slc12a10.2* was specifically expressed in the gills and its expression is stimulated in a low-Cl<sup>-</sup> environment and not in a low-Na<sup>+</sup> environment (Wang et al., 2009). Hwang's group also showed that *slc12a10.1* seems to be predominantly expressed in the kidney and not in the gills of this species. In Mozambique tilapia *O. mossambicus* however, branchial *ncc2* (*slc12a10*) was highly expressed in FW compared to SW (Inokuchi et al., 2008). In another tilapia species, *Oreochromis niloticus*, *ncc2* (*slc12a10.2*) has been shown to be activated by prolactin (Breves et al., 2014).

In the European sea bass *Dicentrarchus labrax*, Na<sup>+</sup> uptake mechanisms as well as ionocyte subtypes have not been clearly identified in FW. Sea bass are euryhaline species that undertake seasonal migrations to low-salinity habitats like estuaries and lagoons and thus have to be able to rapidly activate efficient ion uptake and/or ion secretion mechanisms according to salinity. Several studies have shown that sea bass are able to tolerate FW for several weeks (Bodinier et al., 2009; Bossus et al., 2013; Lorin-Nebel et al., 2006). In late juveniles maintained in FW for two weeks, plasma Na<sup>+</sup>, contrary to plasma Cl<sup>-</sup>, was maintained constant without a significant decrease, suggesting efficient

Na<sup>+</sup> uptake and reabsorption at the gill and kidney levels (Masroor et al., 2018). There is evidence of increased branchial *nka a1a* (*atp1a1a*) expression (Blondeau-Bidet et al., 2016), the predominant NKA  $\alpha$ 1 isoform in sea bass gills, contributing to increased NKA activity in FW (Masroor et al., 2018; Nebel et al., 2005). To our knowledge, no data are available on the presence and induction of diverse ion transporters favoring Na<sup>+</sup> uptake in sea bass gills in FW. This raises the question if sea bass gills present an ionocyte subtype that would be involved in proton-facilitated ammonia excretion and Na<sup>+</sup> uptake as shown in other species that experience low-salinity environments during their life cycle.

The objectives of the present study are to i) characterize main Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchangers (NHEs) in sea bass osmoregulatory organs; ii) identify transporters potentially involved in branchial Na<sup>+</sup> uptake and iii) identify a new ionocyte subtype in European sea bass gills, the NHE3-type ionocyte.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental conditions

European sea bass *Dicentrarchus labrax* were obtained from the Ifremer Station at Palavas-les-Flots (Hérault, France). Two batches of fish were used in these experiments. For quantitative real-time PCR and immunocytochemistry (batch 1), the sampled fish average fork length was 20.77 ± 1.32 cm (mean ± SD) and average weight was 86.87 ± 20.23 g. For identification of paralogous genes in the main osmoregulatory tissues (gills, kidney and posterior intestine) (batch 2), the sampled fish average fork length was 12.32 ± 1.70 cm (mean ± SD) and weight was 21.62 ± 9.92 g.

Fish were brought to the Montpellier University and maintained for one week in 3500 L tanks containing natural seawater (SW) from the Mediterranean sea at 38‰ and 18 °C, pH = 7.78 under a 12 h light/12 h dark photoperiod. Fish were then transferred to smaller 200 L tanks either containing dechlorinated tap water (FW) or SW and were maintained in this salinity until sampling. Fish were respectively maintained in SW and FW for 2 weeks (medium term, batch 1) or 4 months (long term, batch 2) before sampling. Ionic composition (in mEq·L<sup>-1</sup>) of the FW was Na<sup>+</sup> (0.12), K<sup>+</sup> (0.04), Ca<sup>2+</sup> (5.70), Mg<sup>2+</sup> (0.29), Cl<sup>-</sup> (0.98), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.06) and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0.61) and pH = 8.58. Water was aerated and mechanically/biologically filtered (Eheim System, Lens, Pas-de-Calais, France). Temperature, salinity, oxygen and nitrogen levels were checked regularly. 10% of the water in each tank was changed regularly using a siphon tube. The tank was then immediately refilled with water at the same salinity (either SW or dechlorinated FW) and temperature. Fish were fed with fish granules (Aphymar feed, Mèze, Hérault, France) until 2 days before sampling. At the end of the experiment, fish were anesthetized in a solution of phenoxy-2-ethanol (0.24 mL·L<sup>-1</sup>) (batch 1) or benzocaine (1 mL·L<sup>-1</sup>) (batch 2) prior to any manipulation. The experiments were conducted according to the guidelines of the European Union (directive 86/609) and of the French law (decree 87/848) regulating animal experimentation.

### 2.2. Phylogenetic analysis and protein structure

Phylogenetic analyses of *nhe2* (*slc9a2*) (Fig. 1), *ncc* (*slc12a3*) (Fig. 2) and *nhe3* (*slc9a3*) (Fig. 1S) have been performed. Nucleotide sequences of different teleosts and mammals were obtained at Ensembl or NCBI (Tables 1, 2, Table 1S). Sea bass sequences were obtained from the sea bass genome project (Tine et al., 2014). Multiple nucleotide alignments were performed with MUSCLE V3.8.31 (Edgar, 2004) and ambiguous regions were removed with Gblocks V0.91b (Talavera and Castresana, 2007). Best model of evolution was selected using Modelgenerator V.85 (Keane et al., 2006) following the corrected Akaike Information Criterion (with four discrete gamma categories) and used to construct

phylogenetic trees. Phylogenetic trees were inferred using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program (v3.1/3.0 aLRT) (Guindon and Gascuel, 2003) with the General Time Reversible (GTR) model of substitution (Tavaré, 1986) with discrete-gamma distributed rate variation and with the transversional model (TVM) (Posada, 2003) with discrete-gamma distributed rate variation and estimated proportion of invariable sites, combined to the best “Nearest Neighbor Interchange” (NNI). The trees were generated and robustness of the phylogeny assumption was evaluated by the approximate likelihood test (aLRT) SH-like branch support and by bootstrapping procedure from 1000 data set replicates. As outgroup species, we used sequences of chicken (*Gallus gallus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human (*Homo sapiens*) for phylogenetic analyses on *nhe3*. Multiple protein sequence alignment and amino acid identities (in %) were performed with MUSCLE V3.8.31 (Edgar, 2004) implemented in Geneious® 9.1.8 software (Biomatters). The prediction of membrane topology was performed with PolyPhobius (Käll et al., 2005). The prediction of potential N-glycosylation was done using ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>).

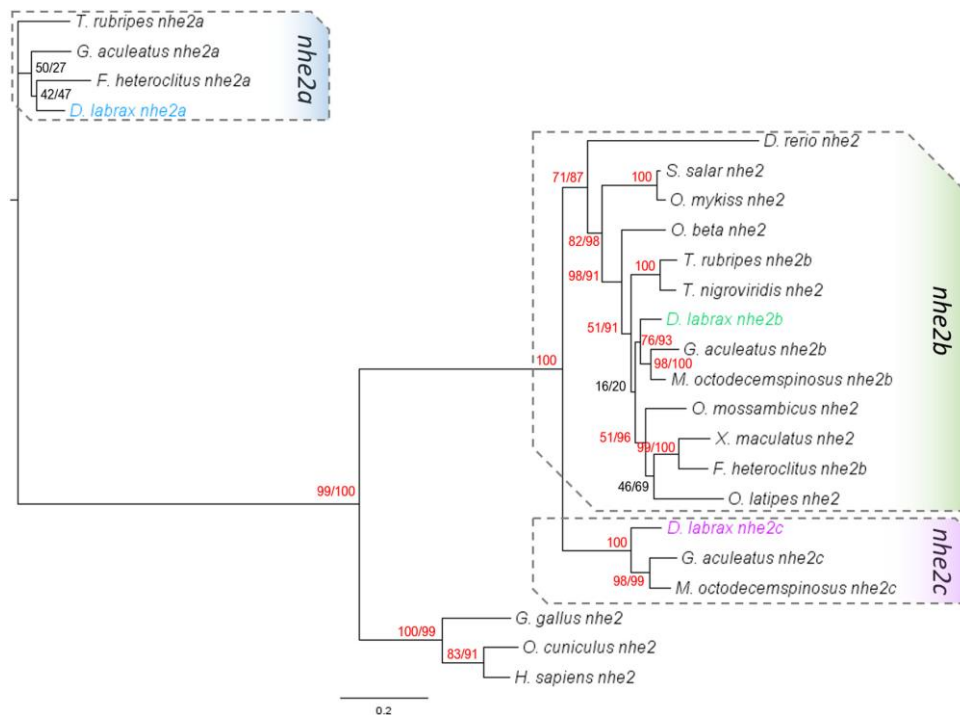
### 2.3. RNA extraction and complementary DNA (cDNA) synthesis

Total RNA was extracted from gills, kidney and posterior intestine using Trizol® reagent and processed according to the manufacturer's instructions. RNA quantity was assessed by measuring the A260/A280 ratio using the NanoDrop® ND-1000 V3300 Spectrophotometer (Nanodrop Technology Inc., Wilmington, DE, USA) and RNA integrity was checked using an Agilent Bioanalyzer 2100 equipped with an RNA Nano Chip (Agilent Technologies, CA, USA). RNA Integrity Numbers

(RIN) were > 7. One microgram of total RNA was treated with DNase I amplification grade (Invitrogen™, Life Technologies) and the first strand of complementary DNA (cDNA) was generated using Random Primers oligonucleotides (Invitrogen™) and the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen™), following the manufacturer's guidelines. PCR products were sequenced by Sanger sequencing in order to validate the identity of the amplified sequences in comparison with the sea bass genome.

### 2.4. Tissue distribution analysis using RT-PCR

Tissue distribution of *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1β-like* (*slc9a1β-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) and *nhe3* (*slc9a3*) were examined in gills (first right gill arch), posterior intestine and posterior kidney of sea bass. cDNA of 4 animals per salinity (SW and FW) were pooled in equal amounts. For PCR amplification, 1 μL of diluted cDNA (at 1/10 for *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1β-like* (*slc9a1β-like*), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) and at 1/20 for *nhe3* (*slc9a3*)) was used as template in a final reaction volume of 25 μL containing 5 μL (1 ×) of 5 × Green GoTaq® Flexi Buffer, 0.5 μL (0.2 mM) of dNTP mix (10 mM each), 0.13 μL (1.25 units) of GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA), 2 μL (2 mM) of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μL (0.2 μM) of each primer (Table 3) and 15.87 μL of nuclease-free water. Conditions used in the PCR were as follows: 2 min denaturation at 95 °C followed by 35 cycles (95 °C for 30 s, 61 °C for 45 s and 72 °C for 1 min) followed by a final elongation step at 72 °C for 4 min. The resulting PCR products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.5 μg/mL GelRed® (Biotium, USA) and viewed under UV light on a Gel Doc 1000 system (Bio-Rad, UK).



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of *nhe2* (*slc9a2*). Phylogram of maximum likelihood relationships between *nhe2a*, *nhe2b* and *nhe2c* nucleotide sequences of representative acanthomorph and salmonid species. Branch lengths represent the degree of divergence, with the scale bar indicating the distance representing 0.2 substitutions per position. Bootstrap values (in %) and SH-like aLRT values are indicated for each node if different (in red color if confident). The blue frame mainly comprises sequences of teleost *nhe2a*. The green frame mainly comprises sequences of acanthomorph *nhe2b* and salmonid *nhe2b*. The purple frame mainly comprises sequences of teleost *nhe2c*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

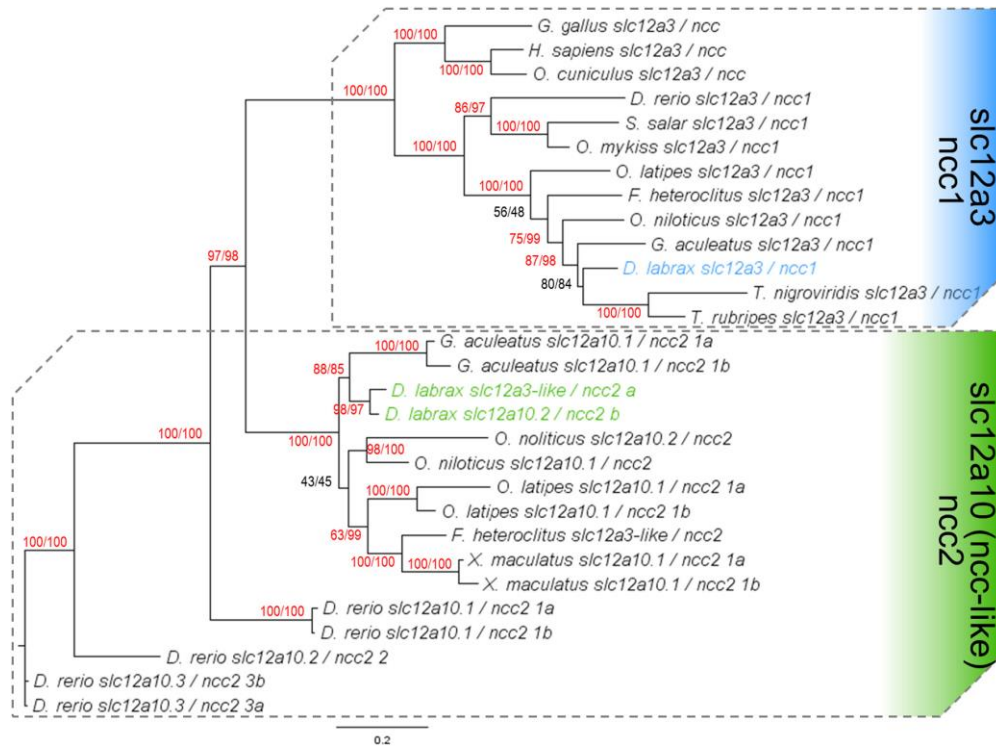


Fig. 2. Phylogenetic tree of *ncc* (*slc12a3*), *ncc2a* (*slc12a3*-like) and *ncc2b* (*slc12a10.2*). Phylogram of maximum likelihood relationships between *ncc1* and *ncc2* nucleotide sequences of representative acanthomorph and salmonid species. Branch lengths represent the degree of divergence, with the scale bar indicating the distance representing 0.2 substitutions per position. Bootstrap values (in %) and SH-like aLRT values are indicated for each node if different (in red color if confident). The blue frame mainly comprises sequences of teleost *ncc1*. The green frame mainly comprises sequences of acanthomorph *ncc2*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**  
*nhe2* (*slc9a2*) nucleotide sequences used in phylogenetic analyses.

Nucleotide sequence ID	Fish species and gene
EF591983	<i>Danio rerio nhe2</i>
DLAgn_00111870	<i>Dicentrarchus labrax nhe2a</i>
DLAgn_00052750	<i>Dicentrarchus labrax nhe2b</i>
DLAgn_00136900	<i>Dicentrarchus labrax nhe2c</i>
AY818824	<i>Fundulus heteroclitus nhe2a</i>
EU886295	<i>Fundulus heteroclitus nhe2b</i>
NM_001285935	<i>Gallus gallus nhe2</i>
ENSGACT00000024567	<i>Gasterosteus aculeatus nhe2a</i>
ENSGACT00000003889.1	<i>Gasterosteus aculeatus nhe2b</i>
ENSGACT00000019807	<i>Gasterosteus aculeatus nhe2c</i>
NM_003048	<i>Homo sapiens nhe2</i>
AF159879	<i>Myoxocephalus octodecemspinosus nhe2b</i>
JN252127.1	<i>Myoxocephalus octodecemspinosus nhe2c</i>
NM_001130994	<i>Oncorhynchus mykiss nhe2</i>
HM134919	<i>Opsanus beta nhe2</i>
ENSONIT00000017898.1	<i>Oreochromis mossambicus nhe2</i>
XM_008253183	<i>Oryzias latipes nhe2</i>
ENSORLT00000015519.1	<i>Oryzias latipes nhe2</i>
XM_014174391	<i>Salmo salar nhe2</i>
XM_011610435	<i>Takifugu rubripes nhe2a</i>
XM_011608343	<i>Takifugu rubripes nhe2b</i>
ENSTNIT00000017095.1	<i>Tetraodon nigroviridis nhe2</i>
ENSXMAT00000011607.1	<i>Xiphophorus maculatus nhe2</i>

## 2.5. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Eight fish per salinity treatment were analyzed for gene expression studies. An Echo<sup>®</sup>525 liquid handling system (Labcyte Inc., San Jose, CA, USA) was used to dispense 0.75  $\mu$ L of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green I<sup>™</sup> Mix (Roche, Mannheim, Germany), 0.037  $\mu$ L of each primer (at 0.5  $\mu$ M), 0.21  $\mu$ L of ultra-pure water and 0.5  $\mu$ L of diluted cDNA into a 384-well reaction plate. Each sample was run in triplicate. The qRT-PCR conditions were as follows: denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 45 cycles of amplification (95  $^{\circ}$ C, 15 s), hybridization (60  $^{\circ}$ C, 5 s) and elongation (72  $^{\circ}$ C, 10 s), and a final step at 40  $^{\circ}$ C for 30 s. A melting curve program was performed to control the amplification specificity. Ultra-pure water was used as a no-template control in the qRT-PCR. Efficiencies were between 1.9 and 2.1 according to the considered primer pair.

The expression level was normalized using the expression of the elongation factor *ef1a* and ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion gene (*fau*). *ef1a* has been already successfully used in this species (Blondeau-Bidet et al., 2016) and *fau* was recommended for sea bass qRT-PCR normalization by Mitter et al. (2009). Relative expression levels were calculated using the comparative Ct method (threshold cycle number) by averaging the results normalized against both *fau* and *ef1a* (Pfaffl, 2001). Ct of both reference genes did not vary according to salinity conditions.

## 2.6. Immunocytochemistry

The first left gill arch of three animals per condition was fixed for

**Table 2**  
*ncc1* (*slc12a3*) and *ncc2* (*slc12a10*) sequences used in phylogenetic analyses and sequences analysis.

Sequence ID	Fish species and gene
ENSADART00000010998.9	<i>Danio rerio slc12a3/ncc1</i>
ENSADART00000023090.10	<i>Danio rerio slc12a10.1/ncc2 1b</i>
ENSADART000000077616	<i>Danio rerio slc12a10.1/ncc2 1a</i>
EF591989	<i>Danio rerio slc12a10.2/ncc2 2</i>
ENSADART00000042955.7	<i>Danio rerio slc12a10.3/ncc2 3a</i>
NM_001135131	<i>Danio rerio slc12a10.3/ncc2 3b</i>
DLAgn_00172790	<i>Dicentrarchus labrax slc12a3/ncc1</i>
DLAgn_00242670	<i>Dicentrarchus labrax slc12a10.2/ncc2 b</i>
DLAgn_00038210	<i>Dicentrarchus labrax slc12a3-like/ncc2 a</i>
XM_021318983.1	<i>Fundulus heteroclitus slc12a3/ncc1</i>
XM_021310632.1	<i>Fundulus heteroclitus slc12a3-like/ncc2</i>
ENSGALT00000004672.5	<i>Gallus gallus slc12a3/ncc</i>
ENSGACT000000003177.1	<i>Gasterosteus aculeatus slc12a3/ncc1</i>
ENSGACT000000025101.1	<i>Gasterosteus aculeatus slc10a10.1/ncc2 1b</i>
ENSGACT000000025114.1	<i>Gasterosteus aculeatus slc12a10.1/ncc2 1a</i>
NM_000339	<i>Homo sapiens slc12a3/ncc</i>
XM_021570104	<i>Oncorhynchus mykiss slc12a3/ncc1</i>
ENSONIT000000013415.1	<i>Oreochromis niloticus slc12a3/ncc1</i>
ENSONIT000000009934.1	<i>Oreochromis niloticus slc12a10.1/ncc2</i>
NM_001082649	<i>Oryzias latipes slc12a3/ncc</i>
ENSORL000000000509.1	<i>Oryzias latipes slc12a3/ncc1</i>
ENSORL000000023617.1	<i>Oryzias latipes slc12a10.1/ncc2 1a</i>
ENSORL000000025285.1	<i>Oryzias latipes slc12a10.1/ncc2 1b</i>
XM_014149142	<i>Salmo salar slc12a3/ncc1</i>
ENSTRUT000000023328.1	<i>Takifugu rubripes slc12a3/ncc1</i>
ENSTNIT00000008076.1	<i>Tetraodon nigroviridis slc12a3/ncc1</i>
ENSXMAT00000001059.1	<i>Xiphophorus maculatus slc12a10.1/ncc2 1a</i>
ENSXMAT00000000940.1	<i>Xiphophorus maculatus slc12a10.1/ncc2 1b</i>

48 h by immersion in Bouin's fixative. After rinsing in 70% ethanol, samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Paraplast (Sigma). Transverse sections (4 µm) were cut on a Leitz Wetzlar microtome, collected on poly-L-lysine-coated glass slides and stored at room temperature until the immunostaining procedure. For co-immunolabelling, sections were dewaxed (LMR and butanol), hydrated through a descending series of ethanol baths (from 100% to 50%) and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, Sigma). Slides were then immersed in a sodium citrate buffer (Tri-sodium citrate dihydrate in 0.05% Tween 20, pH 6) and placed in a microwave oven (at 80% power 2 times 1 min) to reveal antigenic sites. The slides were then incubated for 10 min in 0.02% Tween 20 in PBS supplemented with NaCl to 286.5 mM, pH 7.3. After saturation in 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS at room temperature for 20 min, the slides were rinsed twice with PBS. Primary labelling was performed overnight at 4 °C (NHE3) followed by three washes in PBS, then 2 h at room temperature (NKA and T4) in a wet chamber. The following primary antibodies diluted in 0.5% BSA-PBS were used: mouse monoclonal antibody (α5) anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase deposited to the DSHB by Fambrough, D.M. (DSHB Hybridoma Product α5) (Hybridoma Bank, University of Iowa) at 10 µg·mL<sup>-1</sup>, mouse T4 (SLC12A1/A2) antibody deposited to the DSHB by Lytle, C./Forbush III, B. (DSHB Hybridoma Product T4) at 7 µg·mL<sup>-1</sup> and rabbit polyclonal antibody raised against rainbow trout (*O. mykiss*) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger 3b (NHE3b) at 20 µg·mL<sup>-1</sup>. NHE3 antibody was raised against a cocktail of two peptides from rainbow trout NHE3b. The sequences of these peptides are 100% identical to sea-bass NHE3 (SLC9A3). NHE3 antibody was already used successfully in other teleost species (Christensen et al., 2012; Seo et al., 2013; Wright et al., 2016). Negative control slides without the primary antibody were also prepared. After three washes in PBS to remove unbound antibody, the sections were incubated for 1 h with the secondary antibodies at room temperature (anti-mouse Alexa Fluor®488 at 10 µg·mL<sup>-1</sup> and anti-rabbit Rhodamine at 4 µg·mL<sup>-1</sup>). Following 3 washes, nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) during 2 min, then washed 3 times and sections were mounted in an anti-

bleaching mounting medium (Immunohistomount, Santa Cruz Biotechnology). Observations were done with a Leica TCS SP2 confocal microscope of the MRI platform, at Montpellier University.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software Incorporated, La Jolla, CA 268, USA). Due to the small sample size ( $N = 8$ ), a non-parametric Mann-Whitney  $U$  test and a Kruskal-Wallis test were used for statistical comparisons. To determine differences between conditions, a post hoc test was performed. Data are presented as means  $\pm$  SEM unless noted otherwise, and the level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Identification of sea bass *nhe* paralogous genes and phylogeny

In the sea bass genome, we found several paralogous genes for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchangers (*slc9a*) among them two *nhe1* (*slc9a1*) (annotated *slc9a1* and *slc9a1β-like*), three *nhe2* (*slc9a2*) that we will call in this study *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*) and *nhe2c* (*slc9a2.3*) according to their phylogenetic position (Fig. 1) and only one *nhe3* (*slc9a3*) (Fig. 1S). Sea bass NHE3 is highly homologous to other NHE3 of the longhorn sculpin *M. octodecemspinosus*, the stickleback *G. aculeatus*, and the climbing perch (*A. testudineus*) (81%, 78% and 76% respectively).

Maximum likelihood analysis generated a tree of the three *D. labrax nhe2* subtypes against sequences of selected acanthomorph and salmonid species. Analysis of teleost genomes revealed the presence of one, two (*nhe2a* and *b* in *F. heteroclitus* and *T. rubripes*, *nhe2b* and *nhe2c* in *M. octodecemspinosus*) or three (*nhe2a*, *b* and *c* in *G. aculeatus*) *nhe2* subtypes (Edwards et al., 2010). *D. labrax nhe2a*, *nhe2b* and *nhe2c* group with other *nhe2a*, *nhe2b* and *nhe2c* sequences (Fig. 1). The human (*H. sapiens*), chicken (*G. gallus*) and rabbit (*O. cuniculus*) branched at the basis of the teleost *slc9a2* paralog clade with respect to their phylogenetic position. NHE2b and NHE2c amino acid sequences of *D. labrax* exhibited a percentage identity of 79%, whereas NHE2a showed a lower percentage identity with NHE2b and NHE2c (48% and 46%, respectively).

### 3.2. Characterization of sea bass *ncc1/ncc2* paralogous genes and phylogeny

Three *ncc1/ncc2* genes have been identified in the sea bass genome called *slc12a3*, *slc12a3-like* and *slc12a10.2*. *Slc12a3* (*ncc1*, 3081 bp) could not be detected in sea bass gills in this study (not shown). A sequence of 486 bp was identified for *slc12a10.2* (*ncc2b*), that is phylogenetically very close to *slc12a3-like* (2802 bp) and other teleost *slc12a10* (*ncc2*) sequences (Fig. 2). We thus propose that sea bass *slc12a3-like* can be considered as *ncc2* compared to our phylogenetic tree conducted on *slc12a10/slca12a3* sequences (Takei et al., 2014; Wang et al., 2009). The tree shows two clades, the *slc12a3/ncc1* clade and the fish-specific *slc12a10/ncc2* clade. All teleost species examined have only one *slc12a3/ncc1* gene, grouped in the same clade (blue frame, Fig. 2). The *slc12a10* and *slc12a3-like* sequences of sea bass were very close and belonged to the *ncc2* clade (green frame in Fig. 2).

The identity of the sea bass NCC1 and NCC2 (a, b) amino acid sequences were confirmed by comparison with sequences of teleost species. Interestingly, sea bass NCC1 showed a low percentage identity with sea bass NCC2a and NCC2b (48% and 30%, respectively). Sea bass NCC1 was highly homologous to NCC1 of killifish *F. heteroclitus* and stickleback *G. aculeatus* (81% and 79% respectively). Sea bass NCC2 a and b showed an amino acid sequence identity of 72% and 82%, respectively, with the killifish ortholog, NCC2.

Prediction of the transmembrane topology revealed the existence of 12 potential transmembrane-spanning segments (Fig. S2) as previously



**Table 3**

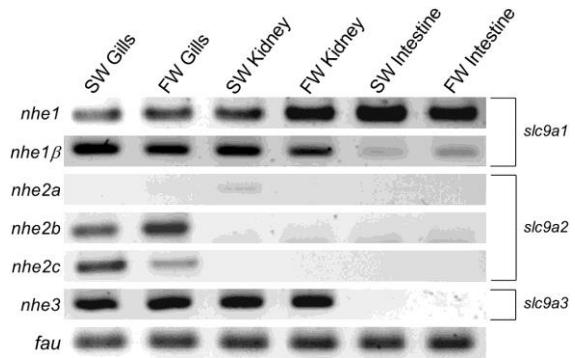
Primer sequences used for RT-PCR and qPCR in this study. ND: not determined. F: forward primer; R: reverse primer. Sequence ID indicate ID genome sequences from the sea bass genome or Genbank identification numbers when available.

Sequences ID	Target gene	Primer name	Sequence (from 5' to 3')	Amplicon Size	Efficiency
DLAgn_00057430	<i>slc9a1/nhe1</i>	NHE1 F NHE1 R	TATCCACAAGTCCCACACC CAAGAGGAAGCCAAGGGAGA	296	1.98
DLAgn_00204440	<i>slc9a1-β/nhe1-β</i>	NHE1-β F NHE1-β R	ACGGGGTTAATATGCGGGCTT CAAGTTTCATGAGCAGGGCC	232	1.97
DLAgn_00052750	<i>slc9a2/nhe2b</i>	NHE2b F NHE2b R	CTGTGATCGAGCGGTTTG TCAAACACACTCAGCACAGC	108	1.95
DLAgn_00136900	<i>slc9a2/nhe2c</i>	NHE2c F NHE2c R	CGTTTCACCCACAATGTCCG GGGAATTGGCATTCTGGTGC	337	1.99
DLAgn_00204050	<i>slc9a3/nhe3</i>	NHE3 F NHE3 R	GGATACCTCGCTACCTGAC AAGAGGAGGGTGAGGAGGAT	251	1.98
DLAgn_00080120	<i>slc12a2/nkcc1</i>	NKCC1 F NKCC1 R	TCAGCTCACAGTTCAAGGCC GCCGCTATGGACTCCACAA	102	2.08
DLAgn_00038210	<i>slc12a3-like/ncc2a</i>	NCC2a F NCC2a R	ATGATGGAGCTCTTCGAGCC GCTGCTCTCATCACCTTCTGT	278	1.94
DLAgn_00076370	<i>atp6v1a/vha-a</i>	VHA-A F VHA-A R	GGCAGTCACATCACAGGAGG CCAGCTCCATCACACATCG	154	1.98
DLAgn_00018050	<i>atp6v1b2/vha-b</i>	VHA-B F VHA-B R	TTGCCATAGTCTTCGACGCC CTTCTCGCACTGGTAGGCC	194	1.90
KP400258	<i>atp1a1.a/nka α1a</i>	NKA α1a F NKA α1a R	CCTCAGATGGCAAGGAGAAG CCCTGCTGAGATCGGTTC	146	1.89
KP400259	<i>atp1a1.b/nka α1b</i>	NKA α1b F NKA α1b R	AGCAGGGCATGAAGAACAAG CCTGGGCTGCGTCTGAGG	204	1.99
DLAgn_00078080	<i>cac (cahz)</i>	CAC F CAC R	CAGGACCAAGTATCCTGC CCCTCCACCTTGCTCCCT	227	2.01
DLAgn_00082210	<i>slc4a4/nbc1</i>	NBC1 F NBC1 R	ACAGAGCACGGAACACACGG CGTCCACAGCCAGCAGTTTCG	182	1.96
DLAgn_00222650	<i>rhbg</i>	RHBG F1 RHBG R1	CCTCATGGTGACCCGAATCC GCCTGCACTCTGTCCACATA	218	1.97
DLAgn_00166370	<i>rhcg1</i>	RHCG1 F1 RHCG1 R1	TCAGGGAATTGTGTGACCGC AGAATCAAGTCCACGCTGGG	118	2.01
DLAgn_00157760	<i>rhcg2</i>	RHCG2 F1 RHCG2R1	TGGCTACCTGTTGTACACGC GGATGCTGGGGCTTTATA	105	1.99
FM004681	<i>fau</i>	FAU-F FAU-R	GACACCAAGGTTGACAAGCAG GGCATTGAAGCACTTAGGAGTTG	150	2.07
AJ866727	<i>ef1α</i>	EF1-F EF1-R	GGCTGGTATCTCTAAGAACG CTCCAGCATGTTGTCTCC	239	2.09
DLAgn_00049060	<i>asic4</i>	ASIC4F ASIC4R	CATCTTCGTCTCTGGTCGCC GCTCTGAATGAAGAGGCGAC	149	1.84
DLAgn_00111870	<i>slc9a2/nhe2a</i>	NHE2a F NHE2a R	CTAGAGCCAGGTCATTGCC GGCGTGTCCACAATACAGGA	244	ND

reported in zebrafish and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) NCCs (Wang et al., 2009 and Gamba et al., 1993). The search for potential *N*-glycosylation sites showed 2 highly conserved sites (Asn 364 and Asn 551) among all the analyzed NCCs (see yellow highlighting, Fig. S2). The *N*-glycosylation site at position 411 in fish NCC1 and mammalian NCC seems to be absent in fish NCC2 sequences. In fish NCC2, two other *N*-glycosylation sites are present (Asn 409 and Asn 418) close to this region. At position 433, the *N*-glycosylation site was only conserved in mammalian NCC and teleost NCC2 sequences whereas Asn 789 was conserved in mammal NCC only. We have identified several amino acids conserved only among mammal NCC and fish NCC1 sequences (Fig. S2, red boxes). Several amino acids are conserved only among the teleost NCC1 and NCC2 sequences (Fig. S2, blue boxes). We also identified conserved amino acids between mammal and fish NCC2 sequences (Fig. S2, green boxes).

### 3.3. mRNA expression patterns of *nhe* paralogs in osmoregulatory tissues

Tissue distribution of *nhe* paralogs were compared in gills, posterior kidney and posterior intestine/rectum in SW and FW after 4 months of salinity acclimation with *fau* as the internal control (Fig. 3). *Nhe1* (*slc9a1*) was expressed in the all osmoregulatory tissues analyzed, notably in the posterior intestine/rectum and FW kidney. *Nhe1β*-like (*slc9a1β*-like) was expressed in gills and kidney in SW and FW. *Nhe2b* (*slc9a2.2*) and *nhe2c* (*slc9a2.3*) were specifically expressed in the gill tissue and present at both salinities. *Nhe3* (*slc9a3*) was highly expressed

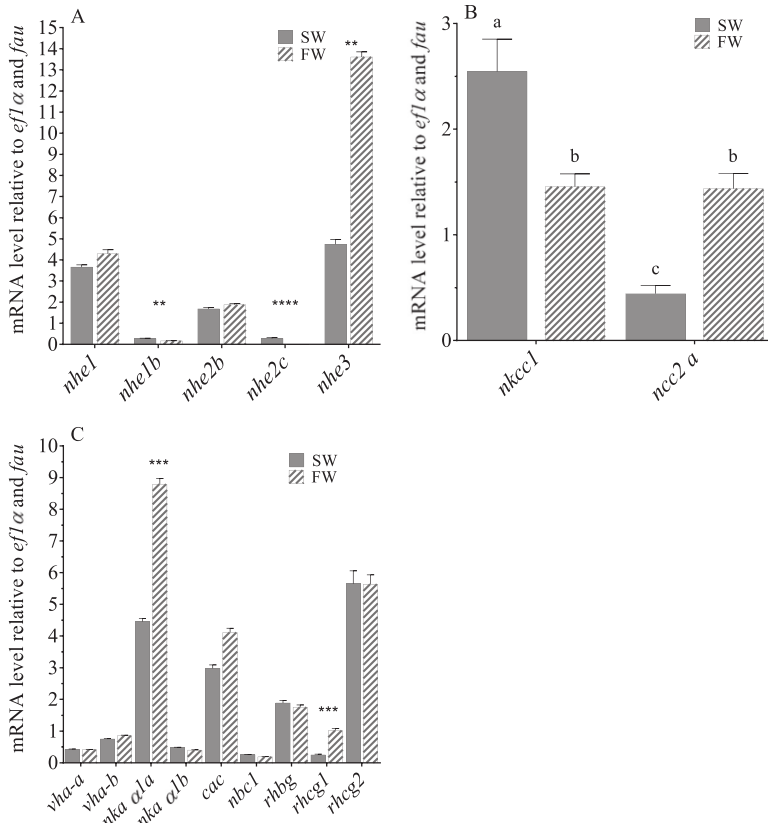


**Fig. 3.** Tissue distribution analysis of *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1β*-like (*slc9a1β*-like), *nhe2a* (*slc9a2.1*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) and *nhe3* (*slc9a3*) in *D. labrax* acclimated to sea water or fresh water for 4 months. *fau* was used as the internal control.

in the gills and posterior kidney at both salinities.

### 3.4. Gene expression

*Nhe* paralogous genes were quantified in SW and FW (Fig. 4A). Among them, *nhe2a* (*slc9a2.1*) showed a nearly not detectable band



**Fig. 4.** Relative expression of (A) *nhe1* (*slc9a1*), *nhe1 $\beta$ -like* (*slc9a1 $\beta$ -like*), *nhe2b* (*slc9a2.2*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) and *nhe3* (*slc9a3*), (B) *nkcc1* (*slc12a2*) and *ncc2a* (*slc12a3-like*) (C) *vha-a* (*atp6v1a*), *vha-b* (*atp6v1b2*), *nka a1a* (*atp1a1a*), *nka a1b* (*atp1a1b*), *cac*, *nbc1* (*slc4a4*) *rhbg*, *rhcg1* and *rhcg2* in gills of *D. labrax* juveniles exposed to SW and FW for two weeks. The expression has been normalized according to the expression of the elongation factor *ef1 $\alpha$*  and the ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion gene *fau*.  $N = 8$ . Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. For each gene, asterisks indicate significant differences between SW and FW (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). FW: fresh water; SW: seawater.

(Fig. 3) and has therefore not been quantified in sea bass gills. Significant expression differences between salinities were observed for *nhe1 $\beta$ -like* (*slc9a1 $\beta$ -like*), *nhe2c* (*slc9a2.3*) and *nhe3* (*slc9a3*) transcripts (Fig. 4A). *Nhe1 $\beta$ -like* (*slc9a1 $\beta$ -like*) and *nhe2c* (*slc9a2.3*) expressions were significantly higher in SW than in FW, respectively by 1.7-fold ( $p < 0.01$ ) and by 28-fold ( $p < 0.001$ ). Conversely, mRNA levels of *nhe3* (*slc9a3*) were significantly higher in FW than in SW, by 2.8-fold ( $p < 0.01$ ). The expression of *nhe3* (*slc9a3*) was high compared to *nhe2c* (*slc9a2.3*) mRNA levels, by 17-fold in SW ( $p = 0.024$ ) and by 1351-fold in FW ( $p < 0.0001$ ).

The relative expressions of *nkcc1* (*slc12a2*) and *ncc2a* (*slc12a3-like*) (Fig. 4B) were examined in SW and FW. mRNA levels of *nkcc1* (*slc12a2*) were significantly higher in SW than in FW, by 1.7-fold ( $p = 0.001$ ). The expression of *ncc2a* (*slc12a3-like*) showed the opposite trend, with a 3-fold overexpression in FW compared to SW ( $p = 0.0003$ ).

In the sea bass genome, two *rhcg* sequences have been identified, named *rhcg1* and *rhcg*. We renamed *rhcg* to *rhcg2* according to its phylogenetic position (not shown). Among the 17 different carbonic anhydrase genes detected in the sea bass genome, we quantified the *cahz* gene that grouped with the teleost CA2-like-a clade, as defined by Lin et al. (2008) including medaka CA2-like-a and trout cytoplasmic CAC (Esbaugh et al., 2005; Gilmour, 2012). CAC amino-acid sequence of *D. labrax* exhibited a percentage identity of 84% and 81% respectively with CA2-like-a of *O. latipes* and CAC of *O. mykiss*, respectively. The CAC sequence of *D. labrax* showed a lower homology with CA2-like-b of *O. latipes* and CAB of *O. mykiss* (70% and 78%, respectively). We considered this gene as the cytoplasmic carbonic anhydrase, and therefore we called it *cac* in this paper.

Relative expressions of branchial *vha-a* (*atp6v1a*), *vha-b* (*atp6v1b2*),

*nka a1a* (*atp1a1a*), *nka a1b* (*atp1a1b*), cytoplasmic carbonic anhydrase *cac*, sodium bicarbonate cotransporter *nbc1* (*slc4a4*), ammonia transporters (*rhbg*, *rhcg1* and *rhcg2*) are shown in Fig. 4C. Acid-sensing ion channel 4 gene (*asic4*) has also been tested as a potential  $\text{Na}^+$  uptake channel, but results fell outside the range of quantifiable values ( $\text{Ct} > 31$ ) and could not be interpreted. FW challenge induced *nka a1a* (*atp1a1a*) expression by 2-fold ( $p = 0.0006$ ) as well as the presumably apical ammonia transporter *rhcg1*, by 4-fold ( $p = 0.0001$ ). Expressions of both *vha* subunit-a and b (*atp6v1*) were low and did not change according to salinity. *Rhcg2* was well expressed at both salinities and *cac* showed a slightly but not significantly higher expression in FW ( $p = 0.06$ ). Transcript levels of reference genes *ef1 $\alpha$*  and *fau* did not change between salinities ( $p > 0.57$  and  $p > 0.87$ , respectively).

### 3.5. Immunolocalization

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase was coimmunostained with NHE3 to identify NHE3-immunopositive ionocytes in FW (Fig. 5). NHE3 was localized in apical membranes of ionocytes expressing NKA (Fig. 5A, B1, B2). NHE3-expressing cells were generally localized on lamella and showed a large apical surface (Fig. 5A). Few NHE3-immunopositive cells have been detected on filaments. Higher magnification images (Fig. 5B1, B2) showed that apical NHE3 is in contact with the surrounding water whereas basolateral surfaces of NHE3-expressing cells are in contact with blood.

We also used NHE3/T4 (NKCC1.2/NCC) coimmunostaining in SW (Fig. 6A1, A2) and FW gills (Fig. 6B1, B2, C1, C2). In SW, T4 immunostaining was detected in all ionocytes that are located on filaments and showed a strong basolateral staining (Fig. 6A1). NHE3 could



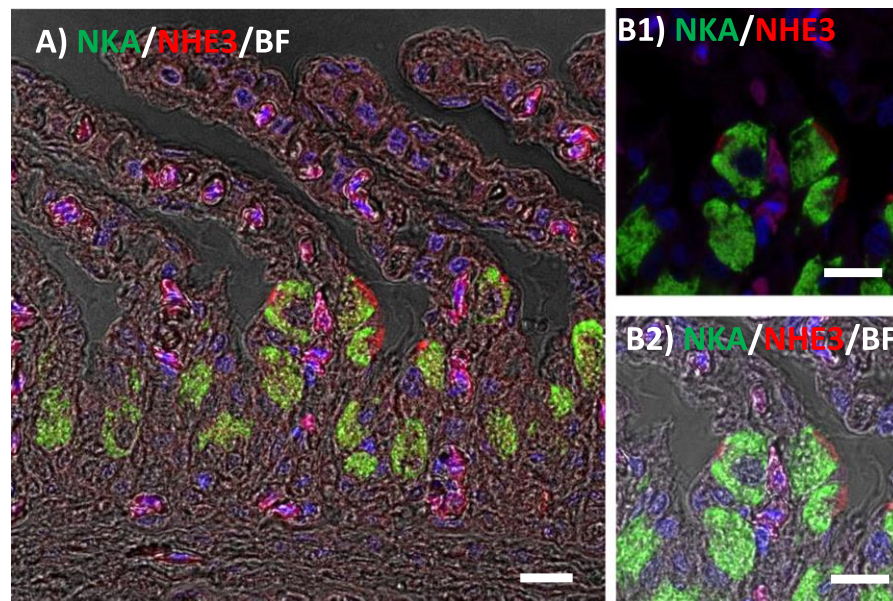


Fig. 5. Immunolocalization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) (green) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger 3 (NHE3) (red) in gills of 2-weeks acclimated *D. labrax* to fresh water using low (A) and high (B1, B2) magnifications of the gill epithelium. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note that NHE-expressing ionocytes are located on lamellae. BF: bright field. Scale: 10  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

not be detected at this salinity (Fig. 6A2). In FW, NHE3-immunopositive cells were also immunopositive for T4, but on basolateral membranes (Fig. 6B1, B2, C1, C2). Most ionocytes present on filaments showed a low basolateral T4 staining and no apical NHE3 (Fig. 6C2, arrow).

NKA/T4 (NKCC1.2/NCC) coimmunostained gills from freshwater-exposed sea bass showed intracellular colocalization of basolateral NKCC1 (T4) and NKA in some lamellar cells indicated in Fig. 7 (indicated by '\*'). These cells did not exhibit apical T4 immunolabelling. Another ionocyte subtypes was localized on the filament and at the base of the lamella with an apical T4 immunostaining, presumably NCC2. NCC2 cells, contrary to the previous described ionocyte subtype, did not show strong basolateral T4 (NKCC1). Two image from a z-stack were shown (Fig. 7A1, A2) showing several ionocytes with faint apical T4 staining identified by a number. Cells without number did not show clear apical T4 throughout the z-stack.

#### 4. Discussion

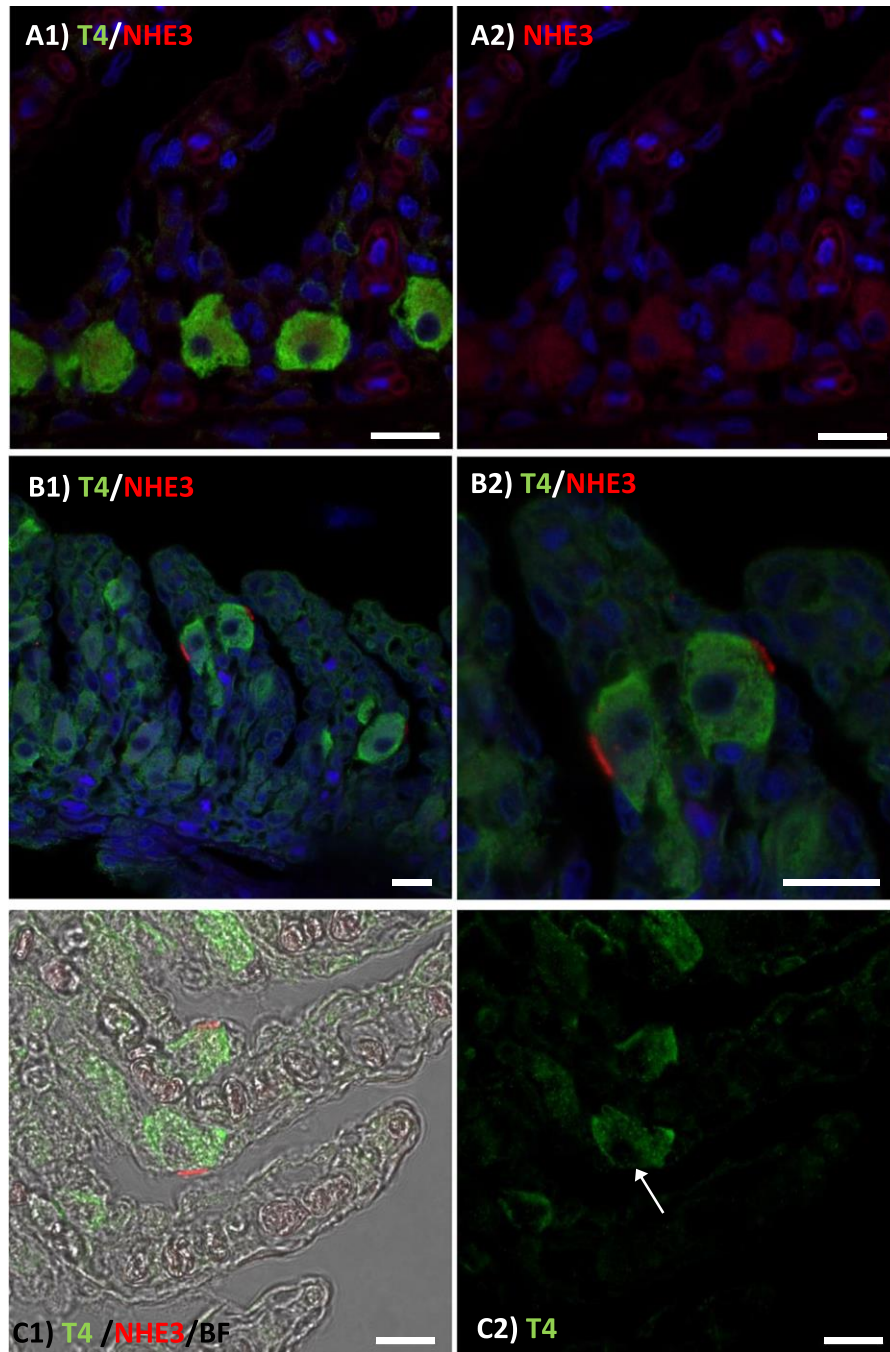
In the last decade, different sodium uptake pathways have been investigated in several teleost species (zebrafish, medaka, trout and tilapia notably) (Dymowska et al., 2012; Hwang, 2011) but it is important to complete ion uptake models in other ecologically relevant euryhaline species that encounter strong salinity fluctuations in their natural habitat as the European sea bass. The sea bass is an important species for aquaculture and fisheries and its genome has been fully sequenced, assembled and annotated (Tine et al., 2014). The sea bass is therefore an excellent model for analyzing osmoregulatory mechanisms at different salinities.

It is now admitted that  $\text{Na}^+$  uptake is strongly linked to acid-base regulation and nitrogen excretion in specific ionocyte subtypes (Weihrauch et al., 2009; Wright and Wood, 2009).  $\text{Na}^+$  uptake can also be coupled to  $\text{Cl}^-$  uptake in species that express  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporters from the NCC2 (SLC12A10) clades (Hiroi and McCormick, 2012; Hsu et al., 2014) or mediated by a  $\text{Na}^+$  channel coupled to apical VHA (Dymowska et al., 2012). The predominance of one mechanism of

ion uptake over the other is highly dependent on the environmental stimuli (ion strength, salinity, pH) and the considered species. Unlike zebrafish and trout, sea bass *asic4* seems not to be expressed in FW gills. Other ASICs should be analyzed in future to explore if other members of the ENaC/DEG (degenerin) family might be involved in  $\text{Na}^+$  uptake in sea bass gills.

##### 4.1. NHE3 as a key protein in gills of sea bass maintained in fresh water

We have shown for the first time in European sea bass that branchial *nhe3* is significantly more expressed following a FW transfer and its expression is much higher than all other *nhe* paralogous genes analyzed in this study, clearly showing its major role in sea bass gills, notably in FW. It has to be noted that *nhe3* is also highly expressed in the posterior kidney and could thus also have a role in renal  $\text{Na}^+$  re-uptake and acid secretion. Only one NHE3 isoform is present in the sea bass genome and it is highly homologous to NHE3 of species showing only one NHE3 paralogous protein and potentially sharing a common NHE3 function. Immunolocalization of NHE3 shows an apical localization in a subset of ionocytes that also express  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as previously shown in rainbow trout PNA<sup>+</sup> MRC, zebrafish HR cells and Mozambique tilapia type-III ionocytes (Hiroi et al., 2008; Hwang, 2011; Inokuchi et al., 2008). We have not detected NHE3 in apical membranes of gill ionocytes from SW fish unlike previous data obtained in other species like Japanese sea bass (Inokuchi et al., 2017).  $\text{NH}_4^+$ -dependent  $\text{Na}^+$  uptake has been identified in medaka, trout and zebrafish (Shih et al., 2012; Wright and Wood, 2009; Wu et al., 2010). In zebrafish HR cells, low-sodium water is a trigger for the differentiation of an apical protein complex involving NHE3b, RHCG1 and V-type  $\text{H}^+$ -ATPase (Shih et al., 2008). Our study shows that *vha* (*a* and *b* subunits) is not highly expressed and expression is not induced following FW challenge in sea bass gills. Sinha et al. (2015) however have shown that VHA activity is increased at low salinity (2.5‰) compared to SW. It is thus possible that posttranscriptional modifications activate VHA in sea bass FW gills. The involvement or not of VHA in the above-mentioned functional



**Fig. 6.** Immunolocalization of NKCC1/NCC (T4) (green) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger 3 (NHE3) (red) in gills of seawater (A1, A2) and freshwater (2 weeks) acclimated *D. labrax* (B1, B2, C1, C2). Nuclei were counterstained with Dapi (blue, A1, A2, B1, B2). (C2) The arrow indicates the absence of apical T4 staining in NHE3-type cells. (B1, C1) Note that NHE3-expressing cells show strong basolateral T4 staining. BF: bright field. Scale: 10  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



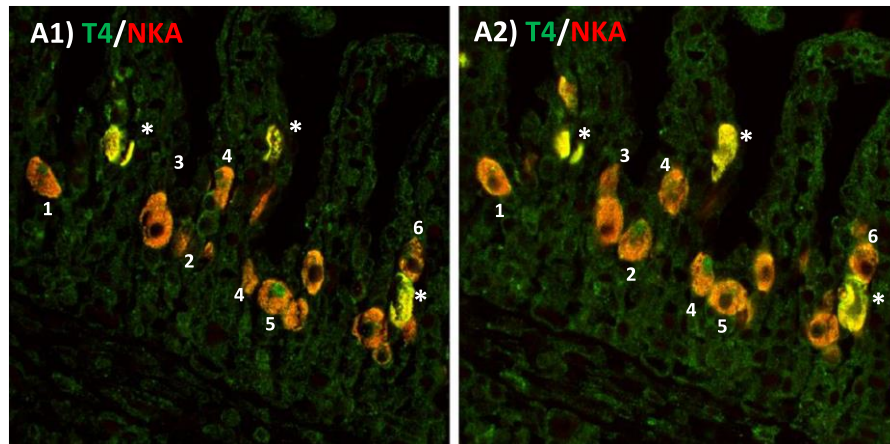


Fig. 7. Immunolocalization of NKCC1/NCC (T4) (green) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) (red) in gills of 2-weeks acclimated *D. labrax* to fresh water. At least two ionocyte subtypes with apical (numbered) and basolateral (\*) T4 staining are shown. A1, A2 images have been taken from a z-stack in order to identify NCC-type cells along the filament. Apical immunolabelling of T4 (numbered) is more or less visible across z-stack levels. Scale: 10  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

complex as well as its localization in ionocytes remain to be elucidated in sea bass.

Interestingly, expression of sea bass *rhcg1* and *nka a1a* increase significantly following FW challenge, however we do not know if RHCG1 is localized in NHE3-expressing cells as shown in other species (Nakada et al., 2007). Sea bass gill ionocyte density has previously been shown to increase significantly in FW compared to SW, notably due to an increase in lamellar ionocytes (Masroor et al., 2018). We have shown in this study that NHE3-immunopositive cells are essentially located on lamella. The slightly higher cytoplasmic carbonic anhydrase (*cac*) expression in FW gills could indicate an increased proton and bicarbonate supply for different transporters expressed in apical and basolateral membranes. Interestingly, NHE3-expressing cells also show basolateral T4 immunostaining which suggests the presence of NKCC1 in these cells as shown recently in the Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* (Inokuchi et al., 2017). In NHE3-expressing cells from the FW condition, T4 staining intensity is clearly lower than in ionocytes from fish maintained in SW condition. This may be linked to the lower branchial mRNA levels of *nkcc1* (*slc12a2*) in FW compared to SW. SW-type ionocytes may change their molecular setup and differentiate into FW-type cells expressing apical NHE3 and basal NKA and NKCC1. This hypothesis has been raised recently by Kaneko's group who reported in Japanese sea bass gills a transformation of SW-type cells to NHE3-type cells concomitant with a shift in their distribution from filaments to lamellae (Inokuchi et al., 2017). In this earlier study, 10 days acclimated fish were used, similarly to our study were 2 weeks-transferred fish were analyzed. In Japanese sea bass, NHE3-NKCC1 expressing cells were called intermediate cells whereas a small percentage of NHE3 cells without basolateral NKCC1 were considered as fully FW-type cells. We have previously reported in European sea bass the presence of intermediate cells in FW lamella expressing basal NKCC1 using the T4 antibody in a time-series study following FW transfer (Lorin-Nebel et al., 2006). If European sea bass gills transform SW-type ionocytes into NHE3-NKCC1 cells upon FW transfer, this would certainly contribute to the high capacity of sea bass to maintain constant  $\text{Na}^+$  levels in highly fluctuating salinities like Mediterranean lagoons.

Two *nhe2* paralogous genes are expressed in sea bass gills but their role in  $\text{Na}^+$  uptake seems minor as they are not highly expressed in FW. Among the other *nhe* paralogs (besides *nhe3*) that have been analyzed in this study (*nhe1*, *nhe1 $\beta$* -like, *nhe2a*, *nhe2b*, *nhe2c*), no induction has been detected in FW after the two-weeks salinity transfer. A time course

sampling would be necessary to fully address the question on what *nhe* paralogs are induced following a FW challenge. The ubiquitous expression of *nhe1* in all analyzed tissues suggests a minor role in trans-epithelial ion uptake and rather a role in acid removal from the cytoplasm and cell volume regulation as reported previously. No *nhe1* expression difference between SW and FW has been shown in the rainbow trout in different tissues including gills, kidney and anterior intestine (Genz et al., 2011). Few studies have quantified the expression of different *nhe2* paralogs, notably *nhe2c* (Edwards et al., 2010). We have identified three *nhe2* paralogous genes with only two of them well expressed in the gills, *nhe2b* and *nhe2c*. No expression has been detected in the posterior kidney and posterior intestine/rectum. This is also the case in the toadfish *Opsanus tau*, where *nhe2* has not been detected in posterior intestine, neither in the rectum (Esbaugh and Grosell, 2014). It has to be noted that only one toadfish *nhe2* has been investigated, that seems to play an important role in the desalinization process in the oesophagus (Esbaugh and Grosell, 2014). *Nhe2b* and more strikingly *nhe2c* expressions are low in sea bass gills and the involvement of NHE2 in apical  $\text{Na}^+$  uptake seems thus unlikely. In trout, high levels of apical NHE2 and NHE3 have been shown in PNA<sup>+</sup> MRC, a cell type rich in NKA, but lacking VHA (Ivanis et al., 2008). *Nhe2* sequence of trout is in the clade of sea bass *nhe2b*. Hypercapnia and increased cortisol levels seem to increase NHE2 levels in this species indicating a role in acid-base regulation (Ivanis et al., 2008). Despite its very low expression, sea bass *nhe2c* is about 28 times more expressed in SW than in FW suggesting its role in acid secretion as reported previously for several *nhe2/3* paralogs in SW (Chen et al., 2017; Claiborne et al., 1999; Liu et al., 2016). Contrary to trout *nhe2*, sea bass *nhe2b* and *nhe2c* are not expressed in the posterior kidney and intestine and *nhe2a* was not clearly detected in any osmoregulatory tissue. This is not the case in killifish, where NHE2a has been identified in cuboidal cells, the cell type expressing basolateral VHA and being involved in  $\text{Na}^+$  uptake (Edwards et al., 2010; Laurent et al., 2006).

#### 4.2. NCC2 in sea bass gills

We have shown here and in a previous study the presence of basolateral or apical T4 (NKCC1,2/NCC) immunostaining in gill ionocytes of sea bass transferred for two weeks to FW (Lorin-Nebel et al., 2006). In that earlier study, it has already been reported that following FW transfer, several ionocytes remain basolaterally immunostained. This

could indicate the presence of NKCC1. Other ionocyte subtypes present an apical staining, presumably NCC2. In this study we showed that apical NCC2 staining was present in several ionocytes located essentially on the filament. Compared to our previous study (Lorin-Nebel et al., 2006), apical immunostaining was less intense, which is probably due to different conditions used for colocalization studies with NKA. A specific NCC1 or NCC2 antibody is necessary to identify the specific paralogous NCC protein. NKCC1/NCC immunopositive ionocytes have been identified with the T4 antibody that recognizes a large epitope (38 kDa peptide fragment) partially common to several SLC12A isoforms including NKCC1, NKCC2, NCC1 and also NCC2. Apical staining using this antibody has further been shown in other teleost species in FW (Hiroi et al., 2008). In the sea bass genome, *slc12a3* (*ncc1*), *slc12a3-like* (*ncc2a*) and *slc12a10* (*ncc2b*) have been detected. *Slc12a3-like* was highly expressed in sea bass gills and was phylogenetically close to other *ncc2* sequences. We therefore called it *ncc2a* and quantified its expression in our study. The small size of the sequence of *slc12a10.2* (*ncc2b*) (486 bp) and its close phylogenetic position to *slc12a3-like* (*ncc2a*) suggests that these two genes may be splice variants or paralogous. *Ncc2a* was significantly higher expressed in FW than in SW, whereas *nkcc1* (*slc12a2*) shows a decreased expression in FW which suggests the differentiation of *ncc2a* expressing ionocytes in FW conditions.

## 5. Conclusion

We have shown for the first time in this study the presence of different ionocyte subtypes in sea bass gills in FW with a NHE3-expressing ionocyte subtype, localized on lamella and potentially involved in  $\text{Na}^+$  uptake. This NKA-rich cell expresses apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger (NHE3, SLC9A3) and basolateral T4, presumably NKCC1 (SLC12A2). This suggests a differentiation of a SW-type cell into a FW-type cell as a response to salinity changes that often occur in natural habitats. The presence in FW gills of ionocytes in the filament with high NKA immunostaining and apical T4 staining as well as the high branchial expression of *ncc2a* suggest the presence of another cell type expressing apical NCC2. It has not to be ruled out that other ionocyte subtypes exist in FW-acclimated sea bass as not all NKA-positive ionocytes showed apical NHE3 or NCC2. These other ionocyte subtypes remain to be characterized in European sea bass. The exact function of the two characterized ionocyte subtypes and the proteins they express in sea bass exposed to various environments will be investigated further in the future and will help to have a more comprehensive view on marine teleost salinity acclimation strategies.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.006>.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Thibaut L'Honoré for providing 4-months acclimated sea bass to fresh water as well as Waliullah Masroor for providing some sea bass gill slides and Emilie Farcy for providing *fau* primers. The authors also would like to thank Sophie Hermet for her help in the first immunostaining tests, Philippe Clair from the qPCR CEMEB platform as well as the Montpellier Ressources Imagerie (MRI) staff, Elodie Jublanc and Vicky Diakou, for their precious advice.

## References

- Blondeau-Bidet, E., Bossus, M., Maugars, G., Farcy, E., Lignot, J.-H., Lorin-Nebel, C., 2016. Molecular characterization and expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$  isoforms in the European sea-bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory tissues following salinity transfer. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1647–1664.
- Bodinier, C., Lorin-Nebel, C., Charmantier, G., Boulo, V., 2009. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile *Dicentrarchus labrax* exposed to seawater and freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 153, 345–351.
- Bollinger, R.J., Madsen, S.S., Bossus, M.C., Tipsmark, C.K., 2016. Does Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exhibit a gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase isoform switch during salinity change? *J. Comp. Physiol. B.* 186, 485–501.
- Bossus, M., Charmantier, G., Blondeau-Bidet, E., Valletta, B., Boulo, V., Lorin-Nebel, C., 2013. The ClC-3 chloride channel and osmoregulation in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Comp. Physiol. B.* 183, 641–662.
- Breves, J.P., Seale, A.P., Moorman, B.P., Lerner, D.T., Moriyama, S., Hopkins, K.D., Grau, E.G., 2014. Pituitary control of branchial NCC, NKCC and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase alpha-subunit gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Comp. Physiol. B.* 184, 513–523.
- Chen, X.L., Zhang, B., Chng, Y.R., Ong, J.L.Y., Chew, S.F., Wong, W.P., Lam, S.H., Ip, Y.K., 2017.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3 is expressed in two distinct types of ionocyte, and probably augments ammonia excretion in one of them, in the gills of the climbing perch exposed to seawater. *Front. Physiol.* 8, 880. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00880>.
- Christensen, A.K., Hiroi, J., Schultz, E.T., McCormick, S.D., 2012. Branchial ionocyte organization and ion-transport protein expression in juvenile alewives acclimated to freshwater or seawater. *J. Exp. Biol.* 215, 642–652.
- Claiborne, J.B., Blackston, C.R., Choe, K.P., Dawson, D.C., Harris, S.P., Mackenzie, L.A., Morrison-Shetlar, A.L., 1999. A mechanism for branchial acid excretion in marine fish: identification of multiple  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (NHE) isoforms in gills of two seawater teleosts. *J. Exp. Biol.* 202, 315–324.
- Cooper, C.A., Wilson, J.M., Wright, P.A., 2013. Marine, freshwater and aerially acclimated mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*) use different strategies for cutaneous ammonia excretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R599–R612.
- Dymowska, A.K., Hwang, P.P., Goss, G.G., 2012. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 282–292.
- Dymowska, A.K., Schultz, A.G., Blair, S.D., Chamot, D., Goss, G.G., 2014. Acid-sensing ion channels are involved in epithelial  $\text{Na}^+$  uptake in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C255–C265.
- Dymowska, A.K., Boyle, D., Schultz, A.G., Goss, G.G., 2015. The role of acid-sensing ion channels in epithelial  $\text{Na}^+$  uptake in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* 218, 1244–1251.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Edwards, S.L., Wall, B.P., Morrison-Shetlar, A., Sligh, S., Weakley, J.C., Claiborne, J.B., 2005. The effect of environmental hypercapnia and salinity on the expression of NHE-like isoforms in the gills of a euryhaline fish (*Fundulus heteroclitus*). *J. Exp. Zool.* A 303, 464–475.
- Edwards, S.L., Weakley, J.C., Diamanduros, A.W., Claiborne, J.B., 2010. Molecular identification of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoforms (NHE2) in the gills of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish Biol.* 76, 415–426.
- Esbaugh, A.J., Grosell, M., 2014. Esophageal desalination is mediated by  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  exchanger-2 in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 171, 57–63.
- Esbaugh, A.J., Perry, S.F., Bayaa, M., Georgalis, T., Nickerson, J., Tufts, B.L., Gilmour, K.M., 2005. Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution. *J. Exp. Biol.* 208, 1951–1961.
- Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M.A., ... Hebert, S.C., 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *PNAS* 90, 2749–2753.
- Genz, J., Esbaugh, A.J., Grosell, M., 2011. Intestinal transport following transfer to increased salinity in an anadromous fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 159, 150–158.
- Gilmour, K.M., 2012. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 184, 223–230.
- Glasauer, S.M., Neuhaus, S.C., 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Gen. Genomics.* 289, 1045–1060.
- Guh, Y.-J., Hwang, P.-P., 2017. Insights into molecular and cellular mechanisms of hormonal actions on fish ion regulation derived from the zebrafish model. *Gen. Comp. Endocrinol.* 251, 12–20.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Hiroi, J., McCormick, S.D., 2012. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 257–268.
- Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S., Hwang, P.-P., Kaneko, T., 2008. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *J. Exp. Biol.* 211, 2584–2599.
- Hsu, H.-H., Lin, L.-Y., Tseng, Y.-C., Horng, J.-L., Hwang, P.-P., 2014. A new model for fish ion regulation: identification of ionocytes in freshwater- and seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.* 357, 225–243.
- Hwang, P.P., 2009. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* 212, 1745–1752.
- Hwang, P.-P., 2011. Mechanisms of ion transport in freshwater fishes. In: Farrell, T., Stevens, D., Cech, J., Richards, J. (Eds.), *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2013. Gill ionic transport, acid-base regulation, and nitrogen excretion. In: Evans, D.H., Clairborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 205–233.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., Lin, L.Y., 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R28–R47.

- Inokuchi, M., Hiroi, J., Watanabe, S., Lee, K.M., Kaneko, T., 2008. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 151–158.
- Inokuchi, M., Nakamura, M., Miyaniishi, H., Hiroi, J., Kaneko, T., 2017. Functional classification of gill ionocytes and spatiotemporal changes in their distribution after transfer from seawater to freshwater in Japanese seabass. *J. Exp. Biol.* 220, 4720–4732.
- Ivanis, G., Esbaugh, A.J., Perry, S.F., 2008. Branchial expression and localization of SLC9A2 and SLC9A3 sodium/hydrogen exchangers and their possible role in acid-base regulation in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 211, 2467–2477.
- Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L., 2005. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics* 21, i251–i257.
- Katoh, F., Hyodo, S., Kaneko, T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 206, 793–803.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Kumai, Y., Perry, S.F., 2012. Mechanisms and regulation of Na<sup>+</sup> uptake by freshwater fish. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 249–256.
- Laurent, P., Chevalier, C., Wood, C.M., 2006. Appearance of cuboidal cells in relation to salinity in gills of *Fundulus heteroclitus*, a species exhibiting branchial Na<sup>+</sup> but not Cl<sup>-</sup> uptake in freshwater. *Cell Tissue Res.* 325, 481–492.
- Lin, T.Y., Liao, B.K., Horng, J.L., Yan, J.J., Hsiao, C.D., Hwang, P.P., 2008. Carbonic anhydrase 2-like a and 15a are involved in acid-base regulation and Na<sup>+</sup> uptake in zebrafish H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C1250–C1260.
- Liu, S.T., Horng, J.L., Chen, P.Y., Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2016. Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: new insights into the salt-secreting mechanism. *Sci. Rep.* 6, 31433.
- Lorin-Nebel, C., Boulo, V., Bodinier, C., Charmantier, G., 2006. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the sea-bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 209, 4908–4922.
- Masroor, W., Farcy, E., Gros, R., Lorin-Nebel, C., 2018. Effect of combined stress (salinity and temperature) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory processes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 215, 45–54.
- Meyer, A., Van de Peer, Y., 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 27, 937–945.
- Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., Sarrapoulou, E., 2009. Evaluation of candidate reference genes for qPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 153, 340–347.
- Nakada, T., Hoshijima, K., Esaki, M., Nagayoshi, S., Kawakami, K., Hirose, S., 2007. Localization of ammonia transporter Rhcg1 in mitochondria-rich cells of yolk sac, gill, and kidney of zebrafish and its ionic strength-dependent expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1743–R1753.
- Nebel, C., Romestand, B., Nègre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F., Charmantier, G., 2005. Differential freshwater adaptation in juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*: gill and urinary system involvement. *J. Exp. Biol.* 208, 3859–3871.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Posada, D., 2003. Using MODELTEST and PAUP\* to select a model of nucleotide substitution. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 5–6. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi060500>.
- Seo, M., Mekuchi, M., Teranishi, K., Kaneko, T., 2013. Expression of ion transporters in gill mitochondria-rich cells in Japanese eel acclimated to a wide range of environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 166, 323–332.
- Shih, T.H., Horng, J.L., Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2008. Ammonia excretion by the skin of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1625–C1632.
- Shih, T.-H., Horng, J.-L., Liu, S.-T., Hwang, P.-P., Lin, L.-Y., 2012. Rhcg1 and NHE3b are involved in ammonium-dependent sodium uptake by zebrafish larvae acclimated to low-sodium water. *Am. J. Physiol.* 302, R84–R93.
- Sinha, A.K., AbdElgawad, H., Zinta, G., Dasan, A.F., Rasoloniriana, R., Asard, H., Blust, R., De Boeck, G., 2015. Nutritional status as the key modulator of antioxidant responses induced by high environmental ammonia and salinity stress in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *PLoS One* 10, e0135091.
- Takei, Y., Hiroi, J., Takahashi, H., Sakamoto, T., 2014. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R778–R792.
- Talavera, G., Castresana, J., 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56, 564–577.
- Tavare, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life Sci.* 17, 57–86.
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P.-A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R.S.T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferer, F., Guinand, B., Bierre, N., Volckaert, F.A.M., Bargelloni, L., Power, D.M., Bonhomme, F., Canario, A.V.M., Reinhardt, R., 2014. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nat. Commun.* 5, 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>.
- Tse, M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Counillon, L.T., Pouyssegur, J., Donowitz, M., 1993. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *J. Membr. Biol.* 135, 93–108.
- Wang, Y.F., Tseng, Y.C., Yan, J.J., Hiroi, J., Hwang, P.P., 2009. Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1650–R1660.
- Watanabe, S., Niida, M., Maruyama, T., Kaneko, T., 2008. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 expressed in apical membrane of gill mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish. Sci.* 74, 813–821.
- Weihrauch, D., Wilkie, M.P., Walsh, P.J., 2009. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *J. Exp. Biol.* 212, 1716–1730.
- Wright, P.A., Wood, C.M., 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of rhesus (Rh) glycoproteins. *J. Exp. Biol.* 212, 2303–2312.
- Wright, P.A., Wood, C.M., Hiroi, J., Wilson, J.M., 2016. (Uncommon) mechanisms of branchial ammonia excretion in the common carp (*Cyprinus carpio*) in response to environmentally induced metabolic acidosis. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 26–40.
- Wu, S.-C., Horng, J.-L., Liu, S.-T., Hwang, P.-P., Wen, Z.-H., Lin, C.-S., Lin, L.-Y., 2010. Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondria-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C237–C250.
- Yan, J.J., Chou, M.Y., Kaneko, T., Hwang, P.P., 2007. Gene expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in zebrafish H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na<sup>+</sup> and acidic environments. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293.

# Caractérisation moléculaire des transporteurs ioniques impliqués dans les mécanismes d'acclimatation aux changements de salinité chez le loup de mer, *Dicentrarchus labrax*.

Eva BLONDEAU-BIDET

## Résumé

---

Pour répondre aux modifications de la salinité, les organismes aquatiques vont devoir soit modifier leur comportement (éviter des milieux contraignants), soit mettre en place des mécanismes physiologiques permettant de tolérer les changements de leur environnement. L'euryhalinité est une des caractéristiques du loup européen, *Dicentrarchus labrax*, un téléostéen d'origine marine qui entreprend des migrations dès le stade juvénile entre la mer et les lagunes, où la salinité est très variable. Des juvéniles de loups originaires de la partie ouest de la Méditerranée ont été acclimatés à l'eau douce au laboratoire afin d'étudier leurs réponses par des approches *in vivo* et *in vitro*. L'objectif de cette étude était de compléter les connaissances sur les mécanismes de l'acclimatation à l'eau douce, notamment au niveau des branchies, en considérant différentes échelles allant de l'ADN aux protéines. Nous avons identifié des transporteurs clés impliqués dans l'absorption ionique dans les branchies de loups en eau douce et en eau de mer, en quantifiant l'expression de gènes préalablement identifiés dans la littérature. L'analyse des transcrits par qPCR de ces transporteurs, couplée à l'immunolocalisation des protéines transmembranaires intervenant dans l'absorption ionique, telles que l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (NKA), le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC) et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE3), nous a permis d'établir un premier modèle d'ionocyte en eau douce comportant au-moins deux sous-types cellulaires. Par une approche *in vitro*, nous avons étudié les réponses à court terme à l'échelle des transcrits en analysant les effets découplés d'une diminution de salinité et de l'ajout d'une hormone, la prolactine, sur des filaments branchiaux isolés. Nous avons ainsi identifié certains transporteurs dont l'expression était directement activée par une diminution de l'osmolalité en dehors de tout contrôle hormonal. Par ailleurs, afin d'étudier les effets d'une dessalure, les profils de méthylation de l'ADN à partir de branchies de loups exposés à l'eau douce et à l'eau de mer pendant 14 jours, ont été établis grâce à la technique du séquençage du génome complet après traitement au bisulfite. L'annotation fonctionnelle a mis en avant que de nombreux gènes différenciellement méthylés sont impliqués dans les mécanismes de l'osmorégulation, tels que le transport ionique, la formation de jonctions serrées et le contrôle hormonal. Ces données suggèrent un rôle fonctionnel de la méthylation de l'ADN sur les changements d'expression des gènes impliqués dans l'acclimatation à l'eau douce. Ce travail de recherche basé sur une approche mécanistique apporte de nouveaux éléments de compréhension des processus d'acclimatation suite à une diminution de salinité chez le loup. La suite du projet concernera l'analyse du transcriptome, qui nous permettra d'établir un lien entre la méthylation de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes.

**Mots clés :** salinité, osmorégulation, téléostéens, *Dicentrarchus labrax*, branchie, ionocyte, expression de gènes, méthylation de l'ADN.