

Université catholique de Louvain
École de biologie



Université de Namur
Département de biologie



Effets de la salinité et de la sélection
sur la reprogrammation et l'expression de l'ADN
aux premiers stades de vie chez différents groupes de
pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*)

De Pooter Simon

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteur : Patrick Kestemont (URBE)
Encadrement scientifique : Dang Quang Hieu (URBE-CTU)

Année académique 2021 – 2022

Résumé

Cette étude porte sur les capacités épigénétiques du pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) confronté à un stress salin. Des poissons ont été exposés à des salinités de 0 (groupe Freshwater ; Fw) et 10 psu. Le groupe à 10 psu a été divisé en deux : un groupe contrôle (C) et un groupe, où à trois reprises, les poissons plus gros que la médiane ont été sélectionnés (S). Des géniteurs furent choisis aléatoirement parmi les trois groupes. Leurs œufs furent exposés à des salinités de 0 et 2,5 psu jusqu'au 6^{ème} jour post éclosion (6 dph). L'expression de gènes liés à la méthylation, à l'osmolarité et à la croissance fut étudiée à différents stades de développement du groupe Fw. Aucun poisson Fw n'a survécu après l'éclosion à la condition 2,5 psu. L'expression des gènes liés à la méthylation et à la croissance augmente en fonction de la salinité pour les deux autres groupes à 6dph. La période de reprogrammation de l'ADN au sein de cette espèce fut également déterminée au moment de la fertilisation.

1. Introduction

Le poisson chat asiatique *Pangasianodon hypophthalmus* est une ressource financière importante pour le Vietnam : le chiffre d'affaires à l'exportation atteint 2,3 milliards de dollars US en 2019 (FAO 2020). Il est principalement élevé dans le delta du Mekong. La montée des eaux qui résulte du réchauffement climatique impactera sa production à la suite d'une augmentation de la salinité de son milieu de vie (Nguyen et al. 2014). Par ailleurs, la construction de nouveaux barrages en amont modifie l'hydrologie du Mékong en réduisant fortement le débit surtout en saison sèche, aggravant ainsi la salinisation du delta (Binh et al. 2020). Une solution pour faire face à cette situation consiste à faire de la sélection de *P. hypophthalmus* afin de le rendre plus résistant à ces nouvelles conditions de vie et lui donnant ainsi des meilleures capacités de croissance. C'est dans ce but qu'a débuté le projet Pangagen, un partenariat entre des universités belges (UNamur et ULiège) et vietnamienne (Can Tho University). Le projet vise à apporter des solutions aux problèmes auxquels le poisson chat sera confronté, comme expliqué plus haut, afin de permettre aux

producteurs locaux de rester compétitifs face aux nouveaux acteurs internationaux.

L'objectif principal du projet est d'obtenir des souches de poisson plus résilientes aux changements environnementaux avec des meilleures capacités de croissance tout en produisant une chair de qualité. Afin d'arriver à cela, une meilleure compréhension du génome est nécessaire. Notre étude s'inscrivant dans ce cadre afin de mieux comprendre son fonctionnement épigénétique sur 2 générations.

Nous avons étudié la variation du taux de méthylation de l'ADN pendant les premiers stades de vie du *P. hypophthalmus* ainsi que l'expression des gènes dans des conditions de stress salin, ce qui n'avait jamais été réalisé à ce jour. Une étude du taux de méthylation développemental a déjà été menée chez le killifish des mangroves *Kryptolebias marmoratus* (Fellous et al. 2018). La longue période de reprogrammation de la méthylation de l'ADN observée pendant le développement du *K. marmoratus* peut représenter une fenêtre critique relativement prolongée particulièrement sensible aux signaux environnementaux. Étant donné le fait que ces poissons vivent dans des environnements de mangrove très instables,

cette longue période de reprogrammation pourrait permettre d'assimiler les signaux environnementaux au niveau épigénétique pendant l'embryogenèse et ainsi *ipso facto* augmenter la diversité phénotypique et faciliter ainsi l'expression de nouveaux phénotypes dans des lignées caractérisées par un faible niveau de diversité génétique. Il a été démontré que la reprogrammation de la méthylation de l'ADN représente une fenêtre critique extrêmement sensible au stress environnemental (Fellous et al. 2018). Le poisson chat asiatique aussi présente une diversité génétique assez faible (So et al. 2006). Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN se fait principalement via le transfert d'un groupe méthyle à la position 5 des résidus de cytosine via les protéines de la famille de l'ADN (cytosine-5) - méthyltransférases (Dnmt), pour former la 5-méthylcytosine (5 mC) et ce, dans les dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine) (Moore et al. 2013). Ces dinucléotides se retrouvent dans des régions du génome riches en CpG appelées îlots CpG (Gardiner-Garden et Frommer 1987). Ces îlots gardent un niveau de méthylation constant dans les tissus somatiques de l'organisme, avec un taux de méthylation faible dans les régions se trouvant dans des housekeeping genes alors que ceux situés ailleurs sont très méthylés (Smith et al. 2012). Mais, durant le développement embryonnaire, ce niveau de méthylation global varie avec un niveau minimum durant le stade morula suivi par une reméthylation jusqu'à la Mid Blastula Transition (MBT) où le niveau de méthylation aura atteint le niveau des tissus adultes (Geiman et Muegge 2009, Fang et al. 2013, Labbé et al. 2017, Greenberg et Bourc'his 2019). Il existe trois orthologues de la Dnmt chez les vertébrés (Dnmt1,

Dnmt3a et Dnmt3b). La première, Dnmt1 assure la conservation de la méthylation des séquences au fil des générations de cellules en méthylant les nouveaux brins d'ADN produits durant la mitose.

Les deux autres orthologues, Dnmt3a et Dnmt3b catalysent la méthylation de novo (Chédin 2011). Dnmt1 est la plus exprimée et la plus abondante dans l'organisme, Dnmt3a a une préférence pour agir sur l'ADN non méthylé alors que Dnmt3b agit de part égale sur l'ADN non méthylé et hémi-méthylé (Vassena et al. 2005). De plus, Dnmt3b a une spécificité pour les îlots CpG inférieure à celle de Dnmt3a (Gao et al. 2020a). Les études suggèrent que la régulation des protéines Dnmt est assez complexe et multifactorielle, et que de plus, des problèmes de régulation de ces protéines interviennent dans certaines maladies (Kinney et Pradhan 2011). Nous étudions aussi les gènes *tet3* et *mecp2*, intervenant respectivement dans la déméthylation de l'ADN (Ito et al. 2011) et dans l'expression de gènes méthylés (Yasui et al. 2007).

Ces modifications de l'expression des gènes peuvent même être transmises à la génération suivante, permettant ainsi une adaptation plus rapide aux changements environnementaux que s'il fallait attendre l'apparition d'une mutation bénéfique dans le génome (Chong et Whitelaw 2004). Mais, pour ce faire, il faut que les modifications épigénétiques passent les deux périodes de reprogrammation de l'ADN qui interviennent dans la lignée germinale et dans l'embryon précoce, effaçant les marques épigénétiques afin de rendre les gamètes totipotents et d'établir ensuite les profils de méthylation de l'ADN du fœtus via une reméthylation à l'aide des enzymes Dnmt3a et Dnmt3b. Des résultats similaires ont été observés chez *Mus musculus* (Razin

et Shemer 1995) et le poisson zèbre *Danio rerio* (Mhanni et McGowan 2004) pour lesquels l'ADN subit une déméthylation globale rapidement après la fécondation et est ensuite reméthylé.

L'objectif général de ce mémoire est d'étudier chez *P. hypophthalmus* la reprogrammation épigénétique dont les mécanismes sont encore inconnus afin de mettre en évidence un potentiel impact de la salinité et de la sélection sur le développement larvaire et les capacités de croissance, ainsi que l'éventuelle interaction entre ces 2 effets.

Les expériences se divisent en 2 parties : la première porte sur des poissons chats élevés dans de l'eau douce et non issus du processus de sélection dont on étudie tous les stades du développement ; dans la seconde, les différents groupes de larves exposés ou non à la salinité sont étudiés mais seulement au 6^{ème} jour après l'éclosion (6dph).

Ce travail poursuit trois objectifs spécifiques. Le premier consiste en l'étude de l'évolution du niveau de méthylation au cours du développement chez des poissons chats élevés dans de l'eau douce et non issus du processus de sélection afin de la comparer à d'autres espèces animales pour en identifier le potentiel de reprogrammation épigénétique.

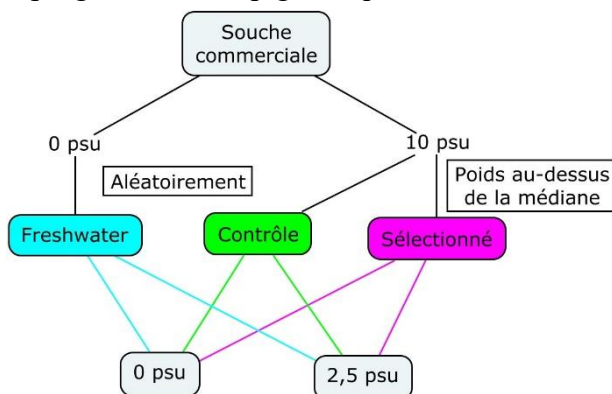


Figure 1: Design expérimental

Le deuxième objectif est l'étude de l'expression des gènes de la méthylation au cours du développement chez ces mêmes poissons.

Le troisième objectif spécifique consiste en l'étude de l'expression des gènes de la méthylation, de l'osmorégulation et de la croissance au 6^{ème} jour post éclosion chez des poissons chats issus ou non d'un processus de sélection, ayant vécu ou non dans de l'eau salée.

Nous avons pour hypothèses : i) que les larves se développant dans des conditions à 2,5 psu (practical salinity unit) expriment plus les gènes liés à l'osmorégulation et à la méthylation que celles se développant dans des conditions à 0 psu, ii) que les larves issues du processus de sélection expriment différemment ces gènes-là par rapport aux larves non issues du processus de sélection et iii) que les gènes de croissance s'expriment différemment chez les larves du groupe choisi en fonction du poids par rapport à celles du groupe choisi aléatoirement.

2. Matériel et méthodes

2.1 Animaux d'expérimentation

Les œufs de *P. hypophthalmus* proviennent de la ferme Viet-Uc, province d'An Giang et ont été acheminés à l'université de Can Tho (CTU) où les expériences ont eu lieu. Les œufs furent fertilisés et élevés dans des réservoirs cylindriques d'1 m³ avec une densité d'un millier de larves par réservoir.

2.2 Design expérimental

Trois groupes d'œufs de 2^{ème} génération furent utilisés dans l'étude, provenant d'une souche commerciale classique. Deux groupes sont issus d'un processus de sélection, à 10 psu : d'une part le groupe Sélection (S) où l'on a, à 3 reprises, enlevé les poissons les moins gros (poids

au-dessous de la valeur médiane), les poissons restants produisant la seconde génération ; d'autre part des poissons choisis au hasard au cours du processus pour former la souche contrôle (C) afin de vérifier l'effet du critère de choix des poissons basé sur la masse.

Le groupe Freshwater (Fw) fut créé en élevant les poissons de 1^{ère} génération dans de l'eau à 0 psu. (fig.1). Une fois les œufs de ces trois groupes récoltés, ils ont chacun été soumis à 2 traitements : 0 ou 2,5 psu (Salinité F1). Les prélèvements furent effectués sur des poissons à différents stades de vie et jusqu'à 6dph (Annexe 1). Un réservoir par condition fut utilisé. Les échantillons ainsi constitués au Vietnam furent congelés et conservés à -77°C. Les analyses furent effectuées à l'UNamur en Belgique. Les études portaient sur la variation de l'expression des gènes de la méthylation durant le développement jusqu'à 6 dph ainsi que l'évolution du niveau de méthylation total de l'ADN sur ce même laps de temps. Une autre étude s'est faite sur la variation d'expression de gènes en fonction des conditions expérimentales à 6 dph.

2.3 Analyse de l'expression des gènes

2.3.1 Gènes étudiés

Pour la première étude, les gènes étudiés furent ceux de la méthylation : la famille *dnmt*, *tet3*, *mecp2* ainsi que *actb*, le gène de référence. Pour la 2^{ème} étude, les gènes étudiés furent les mêmes que ceux de la première étude, à cela se sont ajoutés des gènes de la croissance (*igf1* et *gh1*) et de l'osmorégulation (*nk1a* et *slc12a1*). D'autres gènes furent envisagés (*tet1*, *ghrb*, *dnmt3bb1*, *rpl27*) mais la faible qualité des

amorces lors des pré-tests les ont exclus des études.

2.3.2 Extraction de l'ARN

L'ARN fut extrait des différents échantillons via la méthode au Trizol (Rio et al. 2010). L'ADN génomique et l'ARN total de chaque échantillon ont été extraits conformément aux instructions du fabricant. L'ADN génomique et l'ARN total ont été quantifiés à l'aide d'un appareil Nanodrop (NanoDrop 2000c) et conservés à -20°C jusqu'à une analyse plus approfondie. La qualité fut contrôlée via la réalisation de gel d'agarose conformément aux instructions de l'UNamur (0,5µl de SyberSafe pour 10 ml de TAE 0,5x).

Les gels d'agarose ont permis d'observer la contamination des échantillons par de l'ADN. Vu la faible concentration en acide nucléique de certains échantillons, il a été décidé de ne pas traiter l'ADN de ces échantillons, même si cela aurait permis d'enlever les éventuelles contaminations.

2.3.3 Conception des amorces RT-qPCR

Les amorces ont été définies via le NCBI (US National Center for Biotechnology Information). Nous avons utilisé des amorces de maximum 200pb de taille de produit exon-exon afin d'éviter d'amplifier une éventuelle contamination par de l'ADN lors de l'amplification (tableau 1). Les amorces furent définies également sur base des séquences prédites et commandées auprès de IDT (<https://eu.idtdna.com/pages>).

Tableau 1: Liste des amorces

Gène	Séquence (5'→3')	Direction	Taille du produit	Modèle de PCR d'entrée
<i>mecp2</i>	AGCGGCGATCCATCATTCCG	Forward	149	XM_026927959.2
	GAAGGCTTTCCTTCTGGGTTGA	Reverse		
<i>dnmt3ba</i>	GACACCTGAGCTTGAAAAGCA	Forward	199	XM_026920992.2
	GGCAAAAACATGCCCCTGAG	Reverse		
<i>dnmt3aa</i>	GACGCACAGCCAAGTTCGAT	Forward	187	XM_034301944.1
	GCCAGACGACTCATGTTGGA	Reverse		
<i>dnmt3ab</i>	TAATCCAGCACGGAAAGAGGG	Forward	130	XM_034307930.1
	ACCCATGGCCACTACGTTTT	Reverse		
<i>actb</i>	CCCAAACCTTAAGTTCAGCCA	Forward	130	XM_026929614.2
	CGACCCACAATGGATGGGAA	Reverse		
<i>dnmt1</i>	TCTCCCAGCACATCAAAGGG	Forward	146	XM_026929737.2
	TTGCGCTTGGGTACTCTTGA	Reverse		
<i>dnmt3ab3</i>	GGTGATGCCATCCAACACGG	Forward	90	XM_034307931.1
	CTCACACTGTGTCAGTCATGCGAT	Reverse		
<i>dnmt3ba4</i>	TGGAATTGCCACAGGCTACC	Forward	188	XM_034306779.1
	GAAGGTCAAACGGTCCCCAT	Reverse		
<i>tet3</i>	GCCCCTCAGGCATACCAAAA	Forward	174	XM_026931142.2
	AAGAGTGCAAACCACAGTGC	Reverse		
<i>nka1a</i>	CCCAAGGGCAAGAAGGACAAG	Forward	211	XM_026931934.1
	ATTTGACCCATTCTGGGGTTGT	Reverse		
<i>slc12a1</i>	ACGTCGTTTTCTGGTAACGGT	Forward	167	XM_026912120.1
	TCCTGCAGTGAGGGTCTGAT	Reverse		
<i>igf1</i>	CCGGGGCTTTTATTTTCAGCAA	Forward		NM_001200295.1
	TCGTGGCGCTTTACCAGATT	Reverse		
<i>gh1</i>	CCAGCCTGGATGAGAACG	Forward	154	M63713
	GGGATCTCCTGCACTTGG	Reverse		

2.3.4 RT-qPCR

L'amplification s'est faite via une machine Quant Studio 5 en accord avec les consignes du fabricant et via l'utilisation de SYBR® Green Supermix (SsoAdvanced™).

Une droite de calibration a été effectuée via un pool de gènes dilué une première fois par 10 puis successivement par 3 jusqu'à 1/2430 pour l'analyse durant le temps de développement et par une dilution par 5 jusqu'à 1/6250 pour l'étude en fonction des conditions à 6 dph. Pour finir, un contrôle négatif ne contenant pas d'ARN fut utilisé. Nous avons commencé par tester les amorces des gènes que nous souhaitions étudier. Pour ce faire, nous avons calculé la pente du logarithme de la concentration et

la moyenne du nombre de cycles. Nous avons obtenu une mesure de l'efficacité des amorces via le calcul suivant : $(10^{-1/\text{pente}} - 1) * 100$. L'efficacité devait être comprise entre 85 et 130 afin que l'amorce soit considérée comme utilisable. De plus, l'écart-type sur le nombre de cycles devait être inférieur à 0,5 et le point de fusion ne devait présenter qu'un seul pic afin de s'assurer que les amorces ne formaient pas de dimères.

2.4 LUMA

La méthylation de l'ADN des échantillons du groupe freshwater à 0 psu fut analysée via la méthode de Mohsen et al. (2006) en utilisant un PyroMark 24 de chez Qiagen. Chaque échantillon a d'abord été dupliqué et digéré par des enzymes EcoRI et HpaII

ou EcoRI et MspI. La digestion s'est faite dans le Thermocycler (Westburg) à 37°C pendant 4h suivi d'une période d'inactivation des enzymes à 65°C pendant 20 min avant de laisser les échantillons refroidir à 10°C jusqu'à ce qu'ils soient sortis de la machine et ensuite conservés au frigo à 4°C jusqu'au pyroséquençage.

Afin de faire le pyroséquençage des gènes, nous avons utilisé la séquence GTGTGTCACACATGTGTGTGTGTGT. Le Cartridge a été rempli en suivant les instructions du plan de la machine. Le pyroséquençage fut effectué conformément aux consignes du fabricant et les données ont été analysées via le logiciel du constructeur.

2.5 Traitement des données

Les données issues de la RT-qPCR ont été traitées via Excel afin d'obtenir une expression normalisée qui sera utilisée dans l'analyse des résultats via le logiciel r Studio. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de la droite de calibration. Une fois les données obtenues, nous avons appliqué la formule suivante :

$$\text{Expression} = 10^{(Ct_{\text{moy}} - b) / a}$$

Avec Ct_{moy} : la moyenne des cycles de chaque échantillon

a : la pente

b : l'ordonnée à l'origine

Nous donnant le niveau d'expression du gène pour cette mesure, cette valeur sera normalisée en la divisant par le niveau d'expression de la β -actine (Actb), il est jugé que son expression n'est pas influencée de façon causale par le protocole expérimental (Fernandes et al. 2008, Gao et al. 2020b).

Nous avons supprimé de l'analyse toutes les mesures présentant un second point de fusion car l'amplification n'était dès lors pas spécifique et nous ne pouvions pas

certifier avoir amplifié la bonne séquence. L'amplification ayant été faite en dupliqua technique, il n'a pas été possible de discriminer les valeurs aberrantes entre 2 dupliquas et ils ont tous 2 été gardés pour l'analyse. Pour plus de détails voir Annexe 2. Nous n'avons pas utilisé la méthode $\Delta\Delta Ct$ (Livak et Schmittgen 2001) pour l'analyse de nos gènes car celle-ci fixe le niveau d'expression relatif du groupe contrôle à 1, notre design expérimental ne se prête pas à désigner un traitement comme étalon et de plus nous cherchons l'expression du gène en comparaison d'un housekeeping gene.

2.6 Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type d'au moins deux répétitions biologiques/techniques. Une ANOVA1 ($p < 0,05$), suivie d'un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$), a été réalisée sur le niveau de méthylation global de l'ADN CpG des stades de développement et des juvéniles. Une ANOVA1 ($p < 0,05$), suivie d'un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$), a été réalisée chez les poissons Fw 0 psu durant leur développement.

Une ANOVA2 ($p < 0,05$) de l'expression des gènes en fonction du niveau de salinité et de la souche a été réalisée et suivie d'un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Tous les modèles linéaires furent validés via l'analyse des résidus (Annexe 3). Une ANOVA1 ($p < 0,05$), suivie d'un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$), a aussi été réalisée sur le poids moyen des mères de chaque groupe (disponible à l'annexe 4).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel r Studio version 1.4.1103 et R 4.1.2 pour Windows 10 64 bit. Code disponible à l'annexe 5.

3. Résultats

L'ensemble des résultats et des analyses effectués sont disponibles en détail aux annexes 6 à 9.

3.1 Étude des poissons Fw à 0 psu

Expression des gènes liés à la méthylation
Parmi les gènes que nous avons analysés, ceux de la famille *dnmt* présentent des patterns similaires avec un début d'expression à la fin de la gastrulation (fig. 2 et 3) et une augmentation de l'expression au cours du temps avec un pic ($1,87 \pm 0,08$) lors du développement des somites pour *dnmt3aa* (fig. 2). A 6 dph, l'expression de ces gènes restait égale ou supérieure au gène de référence. Le gène *dnmt3ba4* commence à être exprimé au début de la période Blastula ($1,02 \pm 0,53$), son expression est maximale en début de gastrulation ($5,17 \pm 0,73$), il conserve un niveau d'expression 2 fois supérieur au gène de référence et ce jusqu'à l'éclosion, après quoi il n'est plus exprimé (fig. 3B). Le gène *dnmt1* est quant à lui très fortement exprimé au moment de la fécondation ($13,94 \pm 1,23$) ainsi qu'en début et fin de Blastula (respectivement $9,59 \pm 1,84$ et $4,40 \pm 0,50$), après quoi il est moins exprimé que le gène de référence ($0,59 \pm 0,31$) (fig. 3A). Le gène *mecp2* présente un profil d'expression similaire à celui de *dnmt1*, il est fortement exprimé au moment de la fécondation ($6,04 \pm 0,62$) ainsi qu'en début et fin de Blastula ($2,80 \pm 0,54$). Après ce stade, il est autant exprimé que le gène de référence (fig. 3C). L'expression de *tet3* ressemble à celle de *dnmt3aa* (même profil, même ordre de grandeur), si ce n'est que *tet3* commence à être exprimé plus tôt que *dnmt3aa*, en début de gastrulation ($0,54 \pm 0,06$) (fig. 3D). Sur les 40 échantillons pour *dnmt3ab*, 5 ont une

déviations standard (SD) supérieures à 0,5 et sur les 80 mesures de *dnmt3ba4*, 25 n'ont pas pu être utilisées à cause d'un second point de fusion à l'exception de 2 mesures servant pour la droite de calibration (Annexe 7).

Evolution du niveau de méthylation CpG au cours du développement larvaire

Nous avons observé une différence significative ($p < 10^{-4}$) du niveau de méthylation global CpG chez les larves. Le niveau de méthylation varie au cours du développement, le niveau minimum a été observé au stade de la fertilisation, c'est à ce stade que la variance est maximale ($40,73\% \pm 8,83$), la différence a été confirmée par un test de Tukey. Le niveau de méthylation croît continuellement au cours du développement avec une baisse non significative, confirmée par un test de Tukey, au moment du développement des somites ($60,44\% \pm 2,35$) comparé à la fin de la gastrulation ($64,30\% \pm 4,83$). Le niveau de méthylation le plus élevé ainsi que la variance la plus faible ont été observés 6 jours après l'éclosion ($73,96\% \pm 1,04$) (fig. 4).

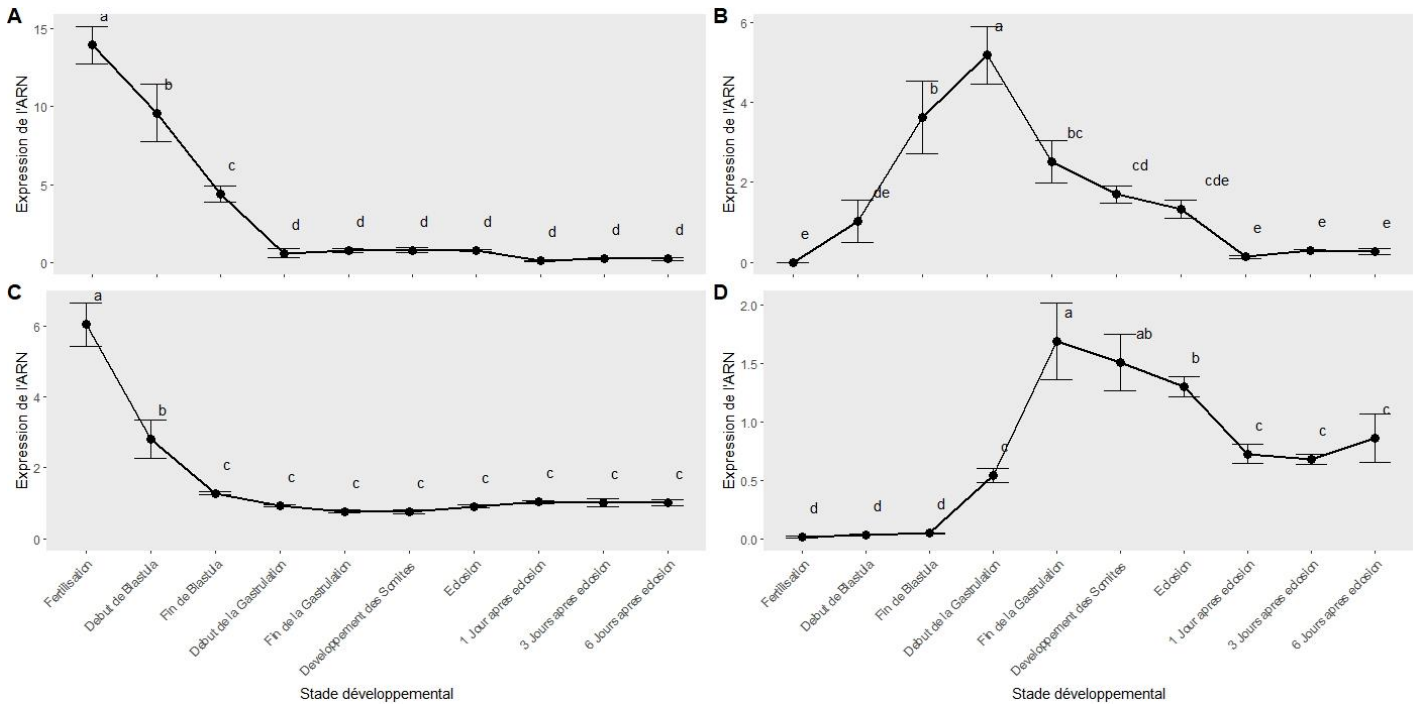


Figure 2 : Variation de l'expression des gènes A. *dnmt1*, B. *dnmt3ba4*, C. *mecp2*, D. *tet3* du groupe Freshwater à 0 psu durant le développement larvaire

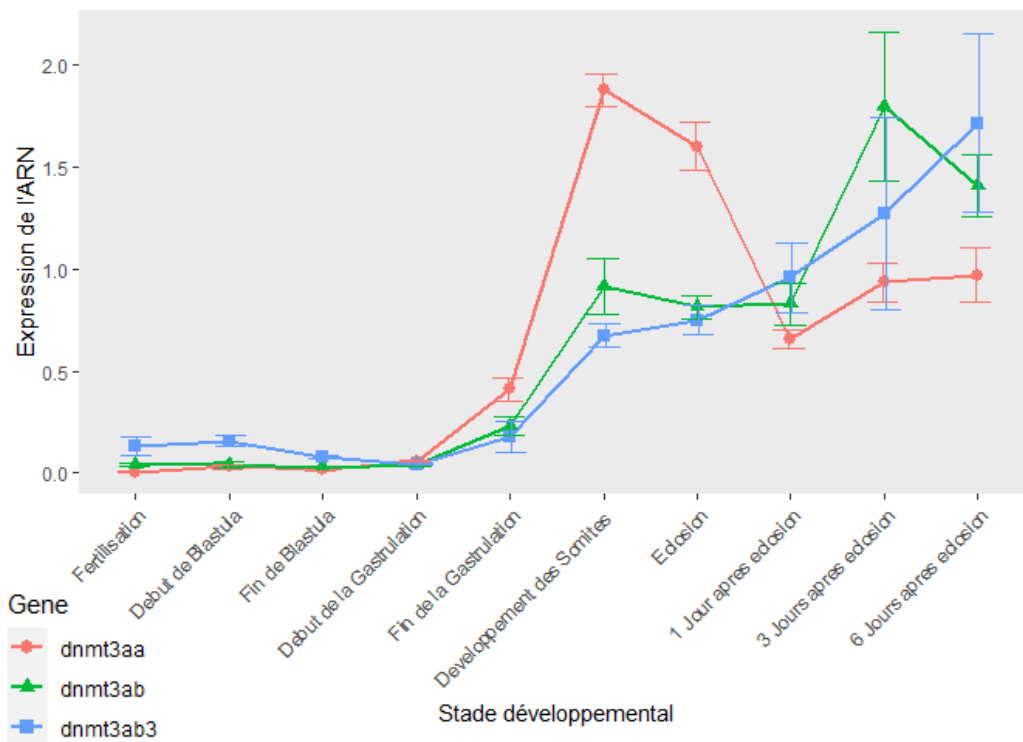


Figure 3: Variation de l'expression des gènes *dnmt3aa* du groupe Freshwater à 0 psu durant le développement larvaire.

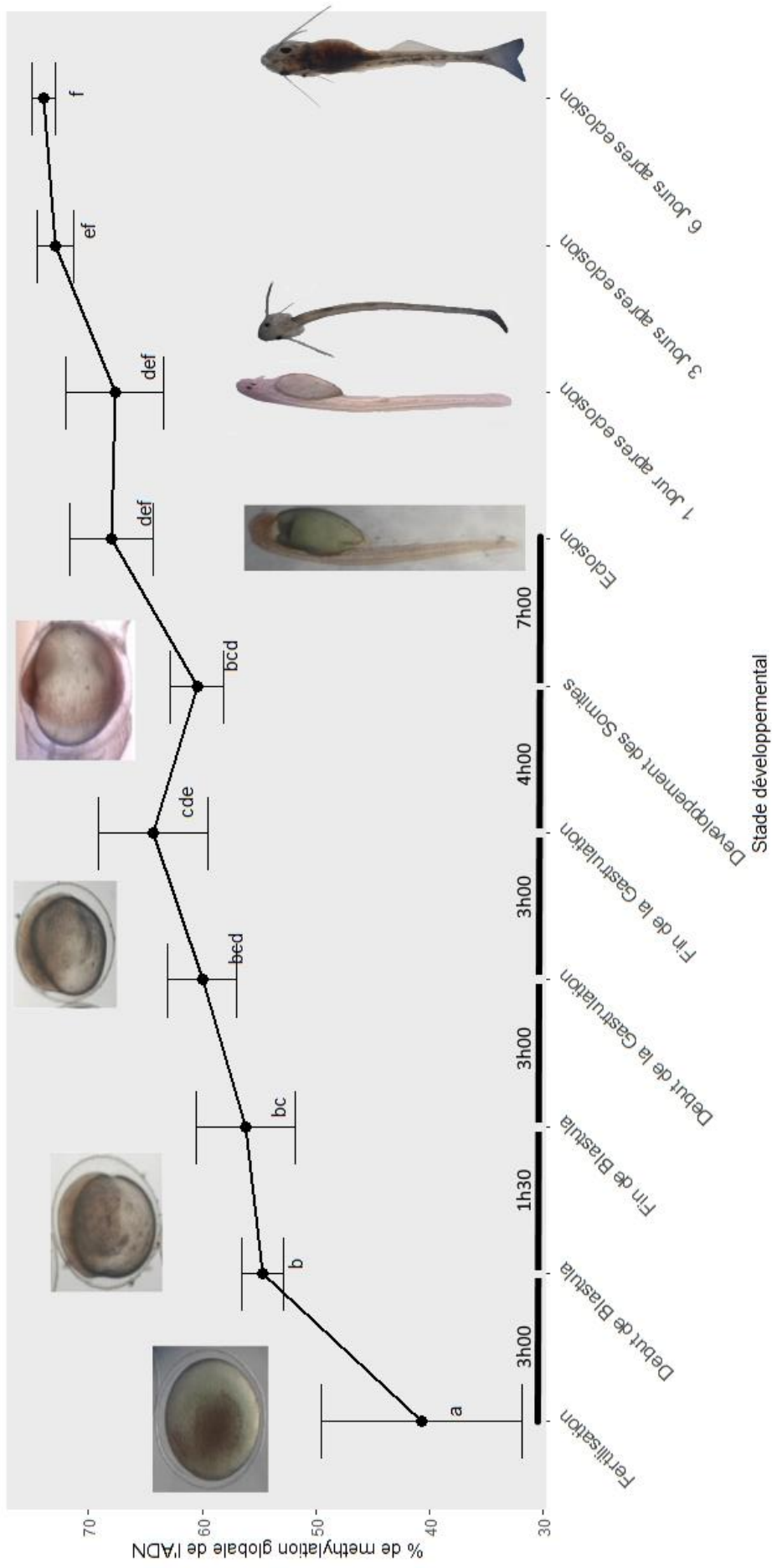


Figure 4: Evolution du niveau de méthylation globale chez *Pangasianodon hypophthalmus* avec le temps entre chaque stade
Photos issues de Okomoda et al. 2017

3.2 Etude des poissons à 6 dph

Aucun des poissons du groupe Fw ayant subi le traitement à 2,5 psu n'a survécu jusqu'à 6 dph. Ceux-ci sont morts durant les premiers jours suivant l'éclosion. Les analyses se porteront donc uniquement sur les 5 autres conditions et, de ce fait, il n'est pas possible de mesurer l'interaction entre la salinité et le groupe Fw.

Expression des gènes liés à la méthylation

Nous avons observé une expression du gène *tet3* proche de celle du gène témoin sans différence significative pour aucun des facteurs étudiés (valeur-p= 0,9172), les autres gènes montraient une différence significative pour au moins un facteur.

Les gènes *dnmt3aa*, *dnmt3ab*, *dnmt3ab3* et *dnmt3ba4* sont plus exprimés en fonction de la salinité F1 avec une augmentation relative de 0,09 ; 0,23 ; 0,19 ; 0,35 par unité psu et une valeur-p < 0,001 sauf *dnmt3aa* avec une valeur-p de 0,022.

Le gène *mecp2* est 25% exprimé en plus dans le groupe Fw que dans les 2 autres groupes avec une différence significative (valeur-p=0,045) à 0 PSU, cela a été confirmé par un test de Tukey.

Le gène *dnmt1* voit son expression relative augmentée de 0,41 avec le niveau de salinité F1 (valeur-p<10⁻⁴) ainsi qu'une augmentation de 0,42 dans le groupe Fw comparé aux 2 autres (valeur-p=0,0027). Une augmentation non significative du groupe S par rapport au groupe C a aussi été mesurée, ainsi que pour l'interaction entre le facteur salinité et groupe, p-valeur respective de 0,06 et 0,07 (fig. 5). Le test post hoc de Tukey n'a pas montré de différence entre les groupes pour *dnmt1*, *dnmt3aa*, *dnmt3ab*, *dnmt3ab3* et *tet3*. Pour

mecp2, notons une différence entre le groupe Fw et les 2 groupes issus du processus de sélection et pour *dnmt3ab4*, le test montre une différence entre C et Fw avec S non différent des 2 autres. Sur les 7 gènes étudiés, le facteur le plus impactant est le facteur salinité avec une différence significative pour 5 des 7 gènes. Le facteur groupe a un impact sur 2 gènes avec une différence entre les poissons issus du processus de sélection ou non. Aucune différence significative n'a été observée pour l'interaction ou entre les groupes S et C. Les gènes *mecp2*, *dnmt3ab3*, *dnmt3ab* et *dnmt3ab* présentent un nombre important de points de fusion et pour les 2 premiers, certains points n'ont pas pu être enlevés car servant pour la droite de calibration (Annexe 8).

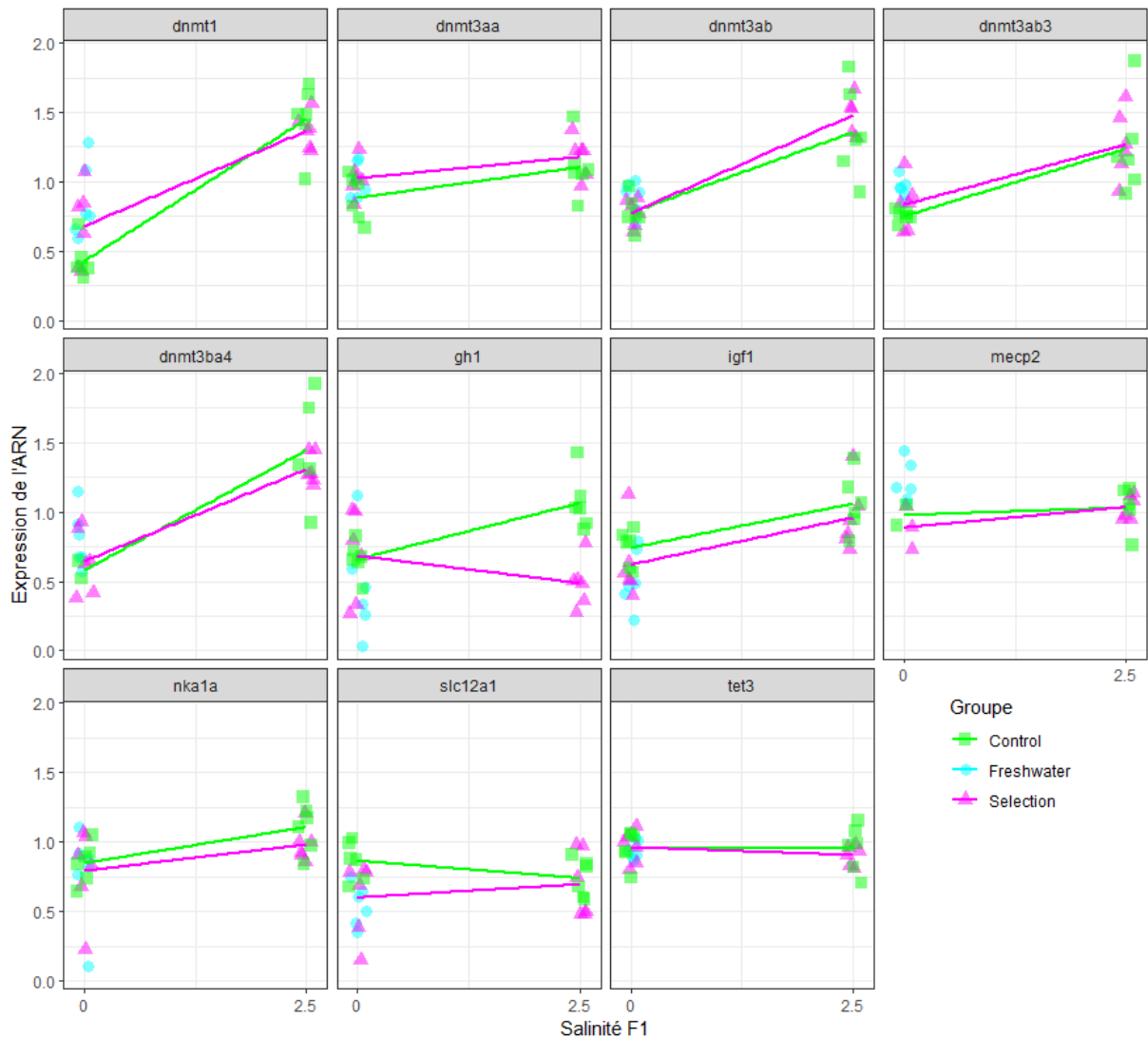


Figure 5 : Variation de l'expression des gènes étudiés en fonction des groupes Control, Freshwater et Selection à 0 et 2,5 psu durant le développement larvaire à 6 dph

Expression des gènes liés à l'osmorégulation

Le gène *slc12a1* présente un niveau d'expression plus élevé dans le groupe C par rapport aux 2 autres groupes : 0,32 plus élevé que Fw ($p=0,0086$) et 0,26 plus élevé que S ($p=0,028$). Le test de Tukey montre une différence entre C et Fw avec S non différent de Fw et C. Le gène *nka1* est plus exprimé en fonction de la salinité mais ne présente pas de différence significative (valeur- $p=0,0698$) et le test de Tukey n'a montré aucune différence entre les 3 groupes (fig. 5).

Expression des gènes liés à la croissance

Le gène *igf1* est surexprimé en condition 2,5 psu avec une augmentation de 0,13 par unité psu et une différence significative de p -valeur = 0,0165 ainsi qu'une diminution non significative du groupe Fw par rapport aux 2 autres (valeur- $p=0,0826$). Mais le test de Tukey a montré une différence significative entre ces groupes. L'expression du gène *gh1* varie en fonction de la salinité, elle augmente dans le groupe C de 0,16 par unité psu et diminue dans le groupe S de 0,08 avec une différence

significative pour le facteur salinité (valeur- $p=0,0109$) ainsi que pour l'interaction entre l'effet de la salinité et le groupe (valeur- $p=0,0079$). Le test de Tukey montre une différence entre le groupe C et les 2 autres groupes (fig. 5).

4. Discussion

Dans cette étude, nos 3 groupes d'œufs de 2^{ème} génération, issus ou non d'un processus de sélection, furent exposés à 2 niveaux de stress salins jusqu'au 6^{ème} jour post éclosion. Afin d'une part, mesurer le niveau global de méthylation et l'évolution de l'expression des gènes de la méthylation durant le développement embryonnaire au sein des individus qui sur les 2 générations ne furent jamais confrontés à la salinité et d'autre part, étudier les variations d'expression des gènes de la méthylation, de l'osmorégulation et de la croissance induites par la salinité et/ou la souche parentale.

En comparant l'évolution du niveau de méthylation CpG que nous avons mesuré dans notre étude, nous ne remarquons pas de période de diminution du niveau de méthylation global s'apparentant à une phase de déméthylation active chez *P. hypophthalmus* contrairement à ce qui a été observé chez diverses autres espèces de poissons et de mammifères (Mhanni et McGowan 2004, Bogdanovic et al. 2011, Anderson et al. 2013, Felous et Al. 2017, Wang et Bhandari 2019). A la place, nous avons une augmentation lente et régulière du niveau de méthylation, avec un niveau global hypométhylé (>0.5) durant la fertilisation, un niveau hyperméthylé (<0.50) au-delà et le taux final atteint à partir de l'éclosion (fig. 4).

Dans la littérature, il est rapporté que chez les mammifères, la méthylation atteint son

niveau le plus bas durant la phase de morula et réaugmente durant la transition vers le début de la blastula (Reik et al. 2001, Dean et al. 2003, Geiman et Muegge 2010) et que chez les poissons, le niveau de méthylation du zygote au moment de la fécondation est assez haut suite à la fusion d'un spermatoocyte hyperméthylé (<0.50) et d'un ovocyte hypométhylé (>0.5) (Labbé et al. 2017). Or, c'est à ce stade que nos échantillons sont au plus bas de leurs méthylations, mon hypothèse est que nos échantillons de ce stade-là manquent de précision et que les zygotes ont déjà commencé à se développer car, c'est durant la période 2 à 16 cellules que le niveau est au plus bas (Labbé et al. 2017), bien plus bas que durant la fertilisation et le début de la blastula. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi nous commençons avec un niveau de méthylation assez bas à la fertilisation ainsi que la grande variance dans nos données pour ce stade dû à la grande variation au sein du développement des zygotes échantillonnés. Pour éclaircir cela, une étude plus approfondie se concentrant sur la méthylation des gamètes et des zygotes durant les premiers stades est nécessaire. Nous observons néanmoins un pic d'expression d'ARN en fin de gastrulation pour le gène *tet3* impliqué dans la déméthylation (Wu et Zang 2017), un pic similaire pour *tet3* et *dnmt3aa* a été observé chez *O. latipes* en fin de blastula, à ce stade-là aucun de ces gènes n'est exprimé chez nos poissons. Pour cette espèce aussi, le niveau d'expression est maximum pour *dnmt3ba* en début de gastrulation et l'expression de *dnmt1* décroît après la fin de la blastula (Wang et Bhandari 2019). L'expression de *dnmt1*, *dnmt3aa* et *dnmt3ab* au cours du développement est similaire à ce qui a été observé chez *S. senegalensis* (Firmino et al. 2017).

L'expression de *mecp2* a été étudiée chez le poisson zèbre et montre une expression maximum durant la première heure post fécondation suivie par une diminution et un maintien à un niveau d'expression bas, similaire à ce que nous observons ici mais avec un niveau d'expression inférieur de moitié à celui du gène de la β -actine alors que chez le poisson chat ce niveau d'expression est 6 fois supérieur (Coverdale et al. 2004). Dans notre étude, le fait qu'aucun poisson du groupe Fw 2,5 psu n'ait survécu après l'éclosion montre un effet transgénérationnel de la salinité chez les poissons chats. Seuls les poissons de première génération qui ont été acclimatés à l'eau saline ont pu produire des larves capables de se développer en conditions de stress salin. Tous les gènes à 6 dph présentant une différence d'expression entre les conditions 0 et 2,5 psu ont une expression augmentant avec la salinité du milieu à l'exception de *gh1* chez qui les effets de la salinité diffèrent entre les groupes S et C, le groupe contrôle voit une augmentation de son expression alors que le groupe sélection subit une diminution de son expression (fig. 5), cela révèle un effet de notre processus de sélection en condition de stress salin. Les larves dont les parents ont été choisis pour leurs poids produisent moins de *gh1* à 6 dph que celles dont les parents ont été choisis aléatoirement. Nous sommes les premiers à observer un tel effet car aucune étude ne semble avoir été faite sur l'adaptation transgénérationnelle de l'expression d'un gène lors d'un processus de sélection basé sur le poids des individus. Cette analyse devrait être répliquée afin de confirmer ce résultat. Chez la daurade *Sparus aurata*, il a été montré que le niveau d'expression des *gh* était plus faible chez les poissons vivants dans une eau à faible salinité que chez ceux

vivants dans une eau salée (Laiz-Carrion et al. 2009). L'effet du groupe Fw comparé au 2 autres groupes montre une expression des gènes *dnmt1* et *mecp2* plus élevée pour ce groupe mais une plus faible expression de *slc12a1*. Pour ce gène-là, l'expression du groupe sélectionné est aussi diminuée par rapport au groupe contrôle. C'est le seul gène à montrer cela, ainsi les larves dont les géniteurs ont été choisis pour leurs poids expriment moins cette protéine, quelle que soit la salinité, tout comme les larves issues du groupe Fw ce qui est étonnant étant donné le rôle de cette protéine, on aurait pu s'attendre à ce qu'elle soit plus exprimée dans les 2 groupes du processus de sélection ainsi que dans les larves se trouvant à 2,5 psu (McCormick et al. 2003, Yang et al. 2011). L'expression des gènes liés à la méthylation que nous avons observée à 6 dph diffère de ce qui a été observé chez *O. latipes* en présence de Triclosan. Dans cette étude, les auteurs ont montré une diminution de l'expression de la majorité de leurs gènes avec le pesticide (*dnmt1*, *dnmt3aa*...), comme pour nous, certains de leurs gènes ne varient pas (*tet1*, *dnmt3ba*, *dnmt3bb*) et le seul qui est plus exprimé était *tet3* là où nous n'avons pas eu de variation. Dans notre étude, toute variation significative de l'expression des gènes liés à la présence d'un stress salin montrait une augmentation de l'expression (Song et al. 2020). Chez le poisson zèbre aussi, il a été montré qu'en condition de stress au cadmium et à la chaleur, l'expression de *dnmt1* et *dnmt3b* à 6 dph était augmentée corroborant ce que nous avons observé pour *dnmt1* et *dnmt3ab* (Park et al. 2020). Les 4 gènes *dnmt3* étudiés pour la seconde expérience présentent le même pattern, de plus, *dnmt3aa*, *dnmt3ab* et *dnmt3ab3* présentent aussi des patterns similaires pour la première expérience (fig. 1). Seul

dnmt3ba4 diffère pour la première expérience, cessant d'être exprimé en fin d'expérience. Les protéines Dnmt3b ont une spécificité au îlots CpG inférieure à celle des protéines Dnmt3a (Gao et al. 2020a) mais pas de préférence envers les formes de l'ADN non méthylé ou hémi-méthylé (Vassena et al. 2005). Ces spécificités pourraient expliquer la différence d'expression de ces formes, indiquant que les œufs auraient besoin de méthylé des séquences pauvres en îlots CpG ou bien de l'ADN hémi-méthylé. Le fait qu'*igf1* soit plus exprimé en condition 2,5 psu est cohérent avec ce qui a été observé chez *Sparus aurata*. Dans cette étude, ils n'ont pas trouvé de différences d'expression pour les *gh* (Mohammed-Geba et al. 2016). De plus, *Cynoglossus semilaevis* soumis à de l'eau à 15 psu voit aussi son niveau d'expression d'*igf1* augmenté après 7 jours mais celui-ci diminue après 60 jours (Siping et al. 2017). *Igf1* étant un indicateur de croissance, son augmentation indique que nos poissons à 2,5 psu présentent un potentiel de croissance possiblement plus élevé que ceux à 0 psu (Mohammed-Geba et al. 2016, Li et al. 2017). Le fait que les tests de Tukey montrent des différences entre les groupes là où l'ANOVA2 n'en montre pas (*dnmt1*, *dnmt3ba4*, ...) peut être expliqué par le fait que la variance entre les 3 groupes est utilisée par l'ANOVA2 pour les autres facteurs (notamment la salinité), là où le test de Tukey ne cherche qu'une différence entre les 3 groupes. Il serait intéressant de refaire des analyses sur *dnmt1*, *nka1a* et *igf1*. Ces 3 gènes n'ayant pas montré de différence non significative, il pourrait éventuellement s'agir de faux négatifs. Des analyses sur d'autres gènes seraient aussi à refaire : *dnmt3ba4*, *mecp2* et *dnmt3ab3*, ces gènes ayant eu beaucoup de points de fusion

et notamment sur les mesures de la droite de calibration, cela permettrait de confirmer les résultats obtenus. Toutes ces analyses seraient à faire en triplicatas afin de pouvoir discriminer les valeurs aberrantes avec une $SD > 0,5$.

En conclusion, sur nos 3 hypothèses de départ, notre étude n'a pas montré d'augmentation des gènes étudiés liée à l'osmorégulation mais une augmentation de ceux liés à la méthylation et la croissance. Les gènes *dnmt1* et *mecp2* étaient moins exprimés chez les larves non issues du processus de sélection contrairement à *slc12a1*. Chez les larves issues du processus de sélection, celles dont les parents furent sélectionnés pour leurs poids, en conditions 2,5 psu, expriment moins *gh1* que les larves dont les parents furent choisis aléatoirement. Ces résultats préliminaires nous apprennent que notre processus de sélection permettra d'augmenter la viabilité des larves face au changement climatique mais il semblerait que le fait de choisir les poissons les plus gros ait un impact négatif sur la croissance de leurs rejetons. Cependant, il faut nuancer cela par le fait que nous ne l'ayons observé que sur 1 des 2 gènes étudiés à 6dph. Des études plus approfondies sont nécessaires avant de pouvoir définitivement y répondre et ainsi trouver des solutions concrètes pour les éleveurs vietnamiens.

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon promoteur de mémoire, Patrick Kestemont. Je le remercie de m'avoir permis de participer à ce projet qui je l'espère portera ses fruits dans les prochaines années.

J'adresse mes sincères remerciements à mon encadrant Dang Quang Hieu, ainsi qu'à Frédéric Silvestre et Jérôme Lambert.

Leurs expériences, leurs conseils furent très enrichissants, de même que leurs réponses à mes nombreuses questions tout au long de ce quadrimestre.

Un grand merci également à Timoté Van Oost Moinhos qui a partagé avec moi de longues sessions de remplissage de plaques

PCR, ainsi qu'à tous les membres de l'URBE et les relecteurs de mon mémoire que je ne pourrais pas citer ici.

Et enfin, toute ma gratitude à mes très chers parents, Philippe et Marie, ma sœur Julie et mes amis Thibault, Kévin, Benjamin et les autres, pour leurs encouragements.

Références

- Andersen, I. S., Lindeman, L. C., Reiner, A. H., Østrup, O., Aanes, H., Aleström, P., & Collas, P. (2013). Epigenetic marking of the zebrafish developmental program. *Current Topics in Developmental Biology*, 104, 85-112.
- Binh, D. V., Kantoush, S., & Sumi, T. (2020). Changes to long-term discharge and sediment loads in the Vietnamese Mekong Delta caused by upstream dams. *Geomorphology*, 353, 107011.
- Bogdanović, O., Long, S. W., van Heeringen, S. J., Brinkman, A. B., Gómez-Skarmeta, J. L., Stunnenberg, H. G., Jones, P. L., & Veenstra, G. J. C. (2011). Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. *Genome Research*, 21(8), 1313-1327.
- Chédin, F. (2011). The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 101, 255-285.
- Chong, S., & Whitelaw, E. (2004). Epigenetic germline inheritance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(6), 692-696.
- Coverdale, L. E., Martyniuk, C. J., Trudeau, V. L., & Martin, C. C. (2004). Differential expression of the methyl-cytosine binding protein 2 gene in embryonic and adult brain of zebrafish. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 153(2), 281-287.
- Dean, W., Santos, F., & Reik, W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(1), 93-100.
- Fang, X., Corrales, J., Thornton, C., Scheffler, B. E., & Willett, K. L. (2013). Global and gene specific DNA methylation changes during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 166(1), 99-108.
- FAO (2020) GLOBEFISH Highlights January 2020 ISSUE, with Jan. – Sep. 2019 Statistics – a quarterly update on world seafood markets. Globefish Highlights no. 1–2020. Rome
- Fellous, A., Labeled-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A.-S., Earley, R. L., & Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecology and Evolution*, 8(12), 6016-6033.
- Fernandes, J. M. O., Mommens, M., Hagen, Ø., Babiak, I., & Solberg, C. (2008). Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 23-32.

- Firmino, J., Carballo, C., Armesto, P., Campinho, M. A., Power, D. M., & Manchado, M. (2017). Phylogeny, expression patterns and regulation of DNA Methyltransferases in early development of the flatfish, *Solea senegalensis*. *BMC Developmental Biology*, *17*, 11.
- Gao, L., Emperle, M., Guo, Y., Grimm, S. A., Ren, W., Adam, S., Uryu, H., Zhang, Z.-M., Chen, D., Yin, J., Dukatz, M., Anteneh, H., Jurkowska, R. Z., Lu, J., Wang, Y., Bashtrykov, P., Wade, P. A., Wang, G. G., Jeltsch, A., & Song, J. (2020). Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. *Nature Communications*, *11*(1), 3355.
- Gao, Y., Gao, Y., Huang, B., Meng, Z., & Jia, Y. (2020). Reference gene validation for quantification of gene expression during ovarian development of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Scientific Reports*, *10*(1), 823.
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, *196*(2), 261-282.
- Geiman, T. M., & Muegge, K. (2010). DNA methylation in early development. *Molecular Reproduction and Development*, *77*(2), 105-113.
- Greenberg, M. V. C., & Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(10), 590-607.
- Infante, C., Matsuoka, M. P., Asensio, E., Cañavate, J. P., Reith, M., & Manchado, M. (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, *9*(1), 28.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*, *333*(6047), 1300-1303.
- Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., & Ekström, T. J. (2006). LUMA (LUMinometric Methylation Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research*, *312*(11), 1989-1995.
- Kinney, S. R. M., & Pradhan, S. (2011). Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *101*, 311-333.
- Labbé, C., Robles, V., & Herraes, M. P. (2017). Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture*, *472*, 93-106.
- Laiz-Carrión, R., Fuentes, J., Redruello, B., Guzmán, J. M., Martín del Río, M. P., Power, D., & Mancera, J. M. (2009). Expression of pituitary prolactin, growth hormone and somatolactin is modified in response to different stressors (salinity, crowding and food-deprivation) in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, *162*(3), 293-300.
- Li, S., He, F., Wen, H., Li, J., Si, Y., Liu, M., Huang, Y., & Meng, L. (2017). Low salinity affects cellularity, DNA methylation, and mRNA expression of *igf1* in the liver of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *43*(6), 1587-1602.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.

- McCormick, S. D., Sundell, K., Björnsson, B. T., Brown, C. L., & Hiroi, J. (2003). Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 24), 4575-4583.
- Mhanni, A. A., & McGowan, R. A. (2004). Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Development Genes and Evolution*, 214(8), 412-417.
- Mohammed-Geba, K., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., & Mancera, J. M. (2016). Molecular endocrine changes of Gh/Igf1 axis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) exposed to different environmental salinities during larvae to post-larvae stages. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(4), 1177-1186.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38.
- Nguyen, A. L., Dang, V. H., Bosma, R. H., Verreth, J. A. J., Leemans, R., & De Silva, S. S. (2014). Simulated Impacts of Climate Change on Current Farming Locations of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*; Sauvage) in the Mekong Delta, Vietnam. *AMBIO*, 43(8), 1059-1068.
- Okomoda, V. T., Koh, I. C. C., Hassan, A., Amornsakun, T., & Shahreza, M. S. (2017). Embryonic and larvae development of reciprocal crosses between *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(4), 321-327.
- Paria, A., Dong, J., Babu, P. S., Makesh, M., Chaudhari, A., Thirunavukkarasu, A. R., Purushothaman, C. S., & Rajendran, K. V. (2016). Evaluation of candidate reference genes for quantitative expression studies in Asian seabass (*Lates calcarifer*) during ontogenesis and in tissues of healthy and infected fishes. *IJEB Vol.54(09) [September 2016]*.
- Park, K., Han, E. J., Ahn, G., & Kwak, I.-S. (2020). Effects of combined stressors to cadmium and high temperature on antioxidant defense, apoptotic cell death, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of The Total Environment*, 716, 137130.
- Razin, A., & Shemer, R. (1995). DNA methylation in early development. *Human Molecular Genetics*, 4(suppl_1), 1751-1755.
- Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1089-1093.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439.
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., & Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 484(7394), 339-344.
- So, N., van Houdt, J. K. J., & Volckaert, F. A. M. (2006). Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. *Fisheries Science*, 72(3), 469-476.
- Song, X., Wang, X., & Bhandari, R. K. (2020). Developmental abnormalities and epigenetic alterations in medaka (*Oryzias latipes*) embryos induced by triclosan exposure. *Chemosphere*, 261, 127613.

- Vassena, R., Dee Schramm, R., & Latham, K. E. (2005). Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 72(4), 430-436.
- Wang, X., & Bhandari, R. K. (2019). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming of medaka embryo. *Epigenetics*, 14(6), 611-622.
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 18(9), 517-534.
- Yang, T., Gu, B., Xu, G., Shi, Y., Shen, H., Rao, R., & Mzuka, H. L. (2019). Identification of candidate reference genes for qRT-PCR normalization studies of salinity stress and injury in *Onchidium reevesii*. *PeerJ*, 7, e6834.
- Yang, W.-K., Kang, C.-K., Chen, T.-Y., Chang, W.-B., & Lee, T.-H. (2011). Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 181(7), 953-964.
- Yasui, D. H., Peddada, S., Bieda, M. C., Vallerio, R. O., Hogart, A., Nagarajan, R. P., Thatcher, K. N., Farnham, P. J., & Lasalle, J. M. (2007). Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19416-19421.
- Zheng, W., & Sun, L. (2011). Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 638-645.